

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GEORGIA KAROLINE KOSMALA

TOLERÂNCIA A SALINIDADE EM UMA POPULAÇÃO COSTEIRA DE *Taricha granulosa* (CAUDATA : SALAMANDRIDAE)

CURITIBA

2013

GEORGIA KAROLINE KOSMALA

TOLERÂNCIA A SALINIDADE EM UMA POPULAÇÃO COSTEIRA DE *TARICHA*
GRANULOSA (CAUDATA : SALAMANDRIDAE)

Projeto de monografia apresentado como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas no curso de graduação de Bacharel em Ciências Biológicas, do Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Maurício Osvaldo Moura

Co-orientador: Edmund Brodie Jr.

CURITIBA

2013

*Aos meus pais, que me ensinaram a importância da boa educação, bom senso,
boa ética e bom humor em todos os aspectos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiro e mais importante, agradeço meus pais e minha família, que sempre colocaram a minha educação acima de tudo, me apoiaram e incentivaram a ser o melhor que eu posso ser.

Agradeço o meu orientador, Mauricio Osvaldo Moura, a quem eu carinhosamente considero meu pai científico, pela inacreditável fé que deposita no meu potencial como bióloga e em mim como pessoa. Pelo bom humor diário, pela igualdade, respeito e amizade com que trata todos (brincadeiras e hierarquias a parte).

Ao meu co-orientador Edmund Brodie Jr, que deu um salto no escuro ao receber uma aluna estrangeira e desconhecida, e inconscientemente me abriu portas que eu mesma não via como possibilidades. Em especial, agradeço pelos muitos conselhos e por me ajudar a entender o tipo de profissional que eu pretendo ser, o caminho que eu pretendo seguir.

Agradeço os meus colegas de laboratório, a quem hoje vejo como amigos, por todo o apoio. Sou grata pelos conselhos, pelas inúmeras ajudas com códigos impossíveis, pelas conversas esclarecedoras, pelos cafezinhos deliciosos que me mantiveram acordada (e por me iniciarem nesse vício), pelas oportunidades, paciência, tempo e atenção gastos tentando me ensinar, ou por simplesmente me ouvir tagarelado infinitamente.

Aos mais amados Isabela, Letícia, Rodrigo e Raphael, que incrivelmente me aturam a incontáveis anos, e nunca me abandonaram sabendo que eu não me aguento sozinha. Vou protocolar o pedido de canonização de vocês junto com esse trabalho. E a todos os meus amigos que, de perto ou de longe, me apoiaram nessa pequena grande jornada.

O amor por todas as criaturas vivas é o atributo mais nobre do homem.
— *Charles Darwin*

RESUMO

Ações antropogênicas têm causado a alteração de ambientes naturais em diversos graus e formas (direta ou indiretamente). Em países com invernos onde a neve é constante o advento das estradas traz uma inesperada alteração química no ambiente, com a aplicação de toneladas de sal de degelo todos os anos, que se dissolve na neve derretida e se distribui facilmente no solo e águas de ambientes circundantes. Esse aumento da concentração de salinidade natural causa grandes impactos negativos na fauna local, em especial nos anfíbios, que são extremamente suscetíveis a alterações de osmorregulação. Neste estudo, foi testado o efeito de diferentes concentrações de salinidade em *Taricha granulosa* (Amphibia, Caudata), espécie de distribuição costeira no oeste dos Estados Unidos. Foram utilizados adultos de 3 populações: Soap Creek (SC), população que não tem contato com alta salinidade natural; Hunter Creek Fresh (HF), população de ambiente originalmente dulcícola, mas que vêm apresentando salinidade aumentada; e Hunter Creek Tidal (HT), população que sofre influência das variações de salinidade causadas pela maré. Foi testado o efeito da salinidade em ovos e em larvas recém-eclodidas e nos níveis de corticosterona total (hormônio do estresse) de larvas de diferentes idades. Concentrações relativamente altas de salinidade (1.5 ppt e 2.0 ppt) causaram uma redução no tempo de eclosão, no estágio de desenvolvimento embrionário ao eclodir e no tamanho da larva ao eclodir. Ainda, observou-se que a população de origem dos ovos tem efeito nessas variáveis, sendo que os indivíduos oriundos de SC apresentaram tamanho, estágio, tempo de eclosão e índice de crescimento menores. Não houve um efeito direto da concentração de salinidade na quantidade de hormônio total nos indivíduos, mas foi observado um efeito da salinidade dependente do comprimento do indivíduo, o que indica que o tamanho do indivíduo quando exposto a salinidade influencia o estresse sofrido pelo mesmo, provavelmente pela capacidade osmorregulatória do animal. Conclui-se que concentrações de salinidade mais altas que a natural do ambiente têm efeito negativo no desenvolvimento de larvas de *T. granulosa*.

Palavras-chave: *Taricha granulosa*, salinidade, efeitos negativos, corticosterona

ABSTRACT

Anthropogenic actions have been causing alterations in natural environments to several degrees and ways (directly and indirectly). In countries where snow is constant during winters the advent of roads brings an unexpected chemical alteration to the environment, with the application of tons of deicing salt every year, which dissolve in the melted snow and spread easily in the soil and water of surrounding environments. This increase in the natural concentration of salt causes great negative impacts in the local fauna, especially in amphibians, that are extremely susceptible to osmoregulation alterations. In this study, we tested the effect of different salt concentrations in *Taricha granulosa* (Amphibia, Caudata), a species of coastal distribution in western United States. We used adults from 3 populations: Soap Creek (SC), a population that has no contact with natural high salinity; Hunter Creek Fresh (HF), a population from an originally fresh water environment, but that has been presenting increased salinity; and Hunter Creek Tidal (HT), a population that is under influence of salinity variations caused by tides. We tested the effect of salinity in eggs and recently hatched larvae and in the total corticosterone levels (stress hormone) in larvae of different stages. Relatively high salt concentrations (1.5 ppt and 2.0 ppt) caused a decrease in the time to hatch, developmental stage at hatching and larvae size at hatching. Also, we observed that the origin population of the eggs has an effect in these variables, and individuals from SC had smaller size, stage, time to hatch and growth index. There was no direct effect of salinity concentration in the amount of total hormone in the individuals, which indicates that the size of the larvae when exposed to salt influences the stress suffered by it, probably due to its osmoregulation capacity. In conclusion, salt concentrations higher than the natural for the environment have negative effects in the development of *T. granulosa* larvae.

Keywords: *Taricha granulosa*, salinity, negative effects, corticosterone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – <i>Taricha granulosa</i>	16
FIGURA 2 – LOCAIS DE AMOSTRAGEM EM HUNTER CREEK.....	17
FIGURA 3 – HUNTER CREEK FRESH.....	17
FIGURA 4 – HUNTER CREEK TIDAL.....	18
FIGURA 5 – LOCAL DE AMOSTRAGEM SOAP CREEK.....	19
FIGURA 6 – SOAP CREEK.....	19
FIGURA 7 – LOCAIS DE AMOSTRAGEM EM OREGON.....	20
FIGURA 8 – EXPERIMENTO 1.....	22
FIGURA 9 – EXPERIMENTO 2.....	23
FIGURA 10 – EXPERIMENTO 3.....	24
FIGURA 11 – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA LARVAL.....	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1 (POR TRATAMENTO).....	26
TABELA 2 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1 (POR POPULAÇÃO).....	27
TABELA 3 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2 (POR TRATAMENTO).....	29
TABELA 4 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2 (POR POPULAÇÃO).....	29
TABELA 5 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO 3 (POR POPULAÇÃO).....	30
TABELA 6 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO 3 (POR TRATAMENTO).....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 ÁREA DE AMOSTRAGEM.....	16
2.2 FASE EXPERIMENTAL.....	20
2.3 ANÁLISE DE DADOS.....	24
3 RESULTADOS	26
3.1 EFEITO DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE OVOS.....	26
3.2 EFEITO DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS.....	28
3.3 EFEITO DA SALINIDADE NOS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA EM LARVAS.....	30
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e a ampla distribuição de populações humanas resultam em modificações expressivas na paisagem natural. Os impactos antropogênicos podem ter efeitos diretos (destruição de habitat, caça, inviabilização de ambientes) ou indiretos (introdução de espécies exóticas, erosão de solo consequência da agricultura, fragmentação de ambientes) (Trombulak & Frissell 2000, Riitters & Wickham 2003) e resultar em mudanças químicas e/ou físicas no ambiente. Por exemplo, o derramamento de resíduos industriais em águas e solos e uso intenso de nutrientes e recursos naturais pode comprometer a composição química e pH do ambiente, impactando a fauna e flora local (Sodhi & Ehrlich 2010).

Dentre as mudanças antropogênicas de impacto direto, a construção e manutenção de estradas têm produzido grandes impactos ambientais (Riitters & Wickham 2003). Todo e qualquer tipo de estrada, das mais rústicas e pouco utilizadas às mais elaboradas e altamente trafegadas, pode afetar ecossistemas aquáticos e terrestres de diversas formas, como com o aumento da mortalidade pela construção da estrada, aumento da mortalidade por colisão com veículos, modificação de comportamento animal, alteração física do ambiente, alteração química do ambiente, dispersão de espécies exóticas e aumento da alteração e uso de habitats naturais por humanos (Trombulak & Frissell 2000). De uma maneira geral, há uma relação bastante significativa entre as espécies e ambientes afetados e a distância das estradas próximas (Forman 2000).

Alterações químicas no ambiente têm um impacto direto e normalmente imediato na fauna e flora local, podendo causar desde alterações de comportamento até respostas fisiológicas nas espécies. Uma das alterações químicas ambientais mais impactantes resultantes da presença de estradas é o escoamento de contaminantes como metais pesados e poluentes orgânicos e inorgânicos. Esses compostos atingem o solo e são facilmente dispersados através da lixiviação podendo chegar a lençóis freáticos e águas superficiais (Kaushal *et al* 2005, Hopkins *et al* 2013).

Sais de diferentes tipos são poluentes comuns na América do Norte e em outros países com ocorrências de neve. Estima-se que 14 toneladas de sal de degelo, principalmente NaCl e MgCl₂, sejam aplicadas anualmente em estradas durante o inverno na América do Norte (Environment Canada 2001). Como o sal é facilmente

dissolvido na neve, o derretimento distribui facilmente esse composto nos ambientes circundantes (água e solo). Em algumas áreas, concentrações altas de cloreto, como 4000mg/L, foram relatadas em lagos e pântanos próximos a estradas (Environment Canada 2001). O aumento destes íons cloreto, componente principal de muitos sais, no solo e em águas superficiais têm efeitos subletais e letais na vegetação e em animais aquáticos (Kaushal *et al* 2005).

A presença de níveis anormais de salinidade têm um efeito bastante expressivo na fisiologia de vertebrados e invertebrados. Pequenas variações de salinidade têm efeitos deletérios de pequena magnitude em comunidade microbianas. Contudo, interações entre fatores físicos e a salinidade criam situações não-naturais (como a estratificação) que levam a impactos significativos. Macrófitas aquáticas e microalgas podem ser sensíveis a salinidades letais de 1000 a 2000 mg/ L, além de apresentarem respostas sub-letais ao aumento reduzido de sal, como perda de vigor e redução de diversidade. Plantas ripárias também são sensíveis a salinidade, com efeitos letais ocorrendo com concentrações de sal acima de 2000 mg/L e sub-letais abaixo disso. No entanto ainda existem variações na resposta entre populações e efeitos sinérgicos entre salinidade e charcos (Hart *et al* 1991).

Os Invertebrados são os organismos mais sensíveis a variações na concentração da salinidade, com efeitos adversos aparecendo em concentrações baixas como 1000 mg/L. Os organismos mais sensíveis são, moluscos (gastrópodes pulmonados), efêmeropteros, tricópteros, plecópteros, libélulas, blatódeos e heterópteros (Hart *et al* 1991).

Contrastando com esses efeitos, peixes dulcícolas parecem ser tolerantes a concentrações de salinidade maiores do que 10000 mg/L, embora alevinos possam ser mais sensíveis que adultos e ovos possam ser mais sensíveis que alevinos (Hart *et al* 1991). Ovos e larvas de anfíbios podem servir como indicadores de sensibilidade ao aumento da concentração de salinidade em pântanos. Em relação aos répteis, as tartarugas dulcícolas são o grupo mais afetado por altas concentrações de sal, embora a presença de glândulas de sal funcionais possam diminuir esse risco. As aves aquáticas variam em sua tolerância a salinidade. Embora muitas espécies se alimentem em corpos de água salobra, há indícios de diminuição no sucesso reprodutivo em locais com concentrações de sal acima de 3000 mg/L. Esse efeito negativo na reprodução ocorre pela ação na osmorregulação nos recém-nascidos e pelo efeito indireto da diminuição de itens-alimentares destas aves. (Hart *et al* 1991).

Anfíbios são organismos extremamente sensíveis a condições ambientais, devido a sua alta capacidade e dependência de osmorregulação, respiração através de sua pele e pelo ciclo de vida intimamente relacionado a ambientes aquáticos (Shoemaker & Nagy 1977, Wells 2010). A alta salinidade já foi descrita como um grande causador de efeitos negativos em anfíbios. Em estudo com o anuro *Incilius nebulifer*, foi observado uma redução da sobrevivência de embriões (sucesso de eclosão), de larvas até o estágio de metamorfose, diminuição do tempo de desenvolvimento e aumento na massa e do comprimento dos membros posteriores das larvas como resposta ao aumento da concentração de sal. Todas essas respostas afetam a dinâmica de população das fases larvais e, portanto, podem ser prejudiciais para os indivíduos em fase adulta (Alexander *et al* 2012). Apesar de anfíbios serem conhecidamente sensíveis a salinidade, alguns são capazes de suportar aridez e hipersalinidade, o que sugere a possibilidade de adaptação fisiológica (Shoemaker & Nagy 1977).

Embora o efeito negativo sobre características de história de vida sejam respostas comuns, o nível de sensibilidade varia entre espécies. Dessa forma, *Ambystoma maculatum* e *Rana sylvatica* foram consideradas como muito sensíveis a salinidade. Já, *Pseudoeurycea crucifer* e *Rana clamitans* como moderadamente sensíveis e *Bufo americanus* como pouco sensíveis a salinidade (Collins & Russell 2009). Seis tipos de produtos de descongelamento de gelo de estradas foram testados em *Rana sylvatica* (ureia, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, acetato de potássio, cloreto de cálcio e acetato de cálcio-magnésio), dos quais acetato de potássio, acetato de cálcio-magnésio e cloreto de cálcio apresentaram maior toxicidade e ureia, cloreto de sódio e cloreto de magnésio apresentaram menor toxicidade, em maior ou menor grau (Harless *et al* 2011). A presença de sal no ambiente diminuiu a sobrevivência de embriões de *Ambystoma maculatum*, e aumentou a incidência de deformidades na mesma espécie e em *Rana sylvatica* (Karraker & Ruthig 2009). Em resumo, concentrações de salinidade superiores as encontradas em ambiente natural (não antropizado) dulcícola causam efeitos diversos adversos (alta mortalidade, deformidade, alterações no crescimento e desenvolvimento) em espécies de anfíbios como *Rana sylvatica*, *Xenopus laevis*, *Bufo americanus*, *Rana clamitans*, *Rana temporaria* (Padhye & Ghate 1992, Viertel 1999, Dougherty & Smith 2006, Sanzo & Hecnar 2006, Langhans *et al* 2009, Petranka & Doyle 2010)

Enquanto anuros são um grupo importante para se testar e determinar quais as respostas a efeitos antropogênicos e salinidade, pouco foi descrito sobre os efeitos de salinidade em salamandras. Os poucos estudos conhecidos se restringiam a *Ambystoma maculatum* (Turtle 2000, Karraker *et al* 2008, Karraker & Ruthig 2009, Karraker & Gibbs 2011, Brady 2012). Contudo, recentemente, os efeitos da salinidade foram estudados em larvas de uma população de *Taricha granulosa* naturalmente não exposta a sal (Hopkins *et al* 2012 a e b, Hopkins *et al* 2013). Nesses estudos foi descrito a ocorrência de deformidades no desenvolvimento de larvas e o potencial adaptativo de *T. granulosa* a salinidade. Os sais de desgelamento $MgCl_2$ e NaCl possuem efeitos bastante similares, embora em geral NaCl tenha causado efeitos mais negativos do que $MgCl_2$. A mortalidade dos ovos de *T. granulosa* foi maior conforme as maiores concentrações de salinidades testadas. Maiores concentrações de salinidade reduziram o tempo de eclosão dos ovos sobreviventes, afetando o desenvolvimento das larvas. Altas concentrações de NaCl aumentaram significativamente a probabilidade de larvas eclodirem com deformidades severas (letais e subletais) (Hopkins *et al* 2012 a, Hopkins *et al* 2013). Ainda, foi descrito um potencial adaptativo de tolerância a salinidade para a espécie, dependendo significativamente da fêmea progenitora, e houve forte interação entre a “familiaridade” (fêmea de origem) e a concentração de salinidade utilizada (Hopkins *et al* 2012 b).

Considerando esse potencial adaptativo descoberto e os efeitos do sal no sistema fisiológico, foi levantada a hipótese de que a presença de sal possa causar uma resposta em forma de estresse no organismo. Ainda, foi questionada a possibilidade de indivíduos normalmente expostos a certos níveis de salinidade responderem em um menor nível de estresse devido a adaptações a essas condições de concentração de sal. Assim, Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto que alta salinidade (níveis de salinidade encontrados naturalmente em água salobra/marinha) tem na sobrevivência e no desenvolvimento embrionário de larvas de *T. granulosa* em condições laboratoriais. Foi formulada a hipótese de que larvas originadas de populações expostas durante várias gerações a quantidades de sal mais elevadas poderiam apresentar maior tolerância a salinidade, enquanto que larvas de populações historicamente dulcícolas seriam significativamente mais sensíveis às mesmas concentrações de sal. O estudo também teve como objetivo determinar se concentrações elevadas de sal causam estresse endócrino às larvas de

T. granulosa. A principal hipótese neste caso foi que a presença de sal causaria estresse adaptativo às larvas, sendo mais expressivo em indivíduos tradicionalmente expostos a menores quantidades de sal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÁREAS DE AMOSTRAGEM

Durante Maio de 2012, época reprodutiva para a espécie, fêmeas adultas grávidas de *Taricha granulosa* (FIGURA 1) foram coletadas no rio Hunter Creek, em Curry County, Oregon (FIGURA 2). A paisagem possui dois tipos claros e diferentes de habitat: uma porção mais dulcícola, na região montante do rio (FIGURA 3), e uma porção bastante salobra, na região jusante do rio (foz) (FIGURA 4). Por esse motivo, foram coletados exemplares de ambas as localidades, nomeadas como populações diferentes, embora possam ser consideradas somente sub-populações. As populações foram identificadas como Hunter Fresh (a montante – 42°22'10.44"N, 124°24'15.49"W) e Hunter Tidal (foz - 42°23'19.60"N, 124°25'21.54"W). A amostragem foi feita por busca ativa, redes submersas e armadilhas para peixes.



FIGURA 1: *Taricha granulosa* EM UM DOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM.

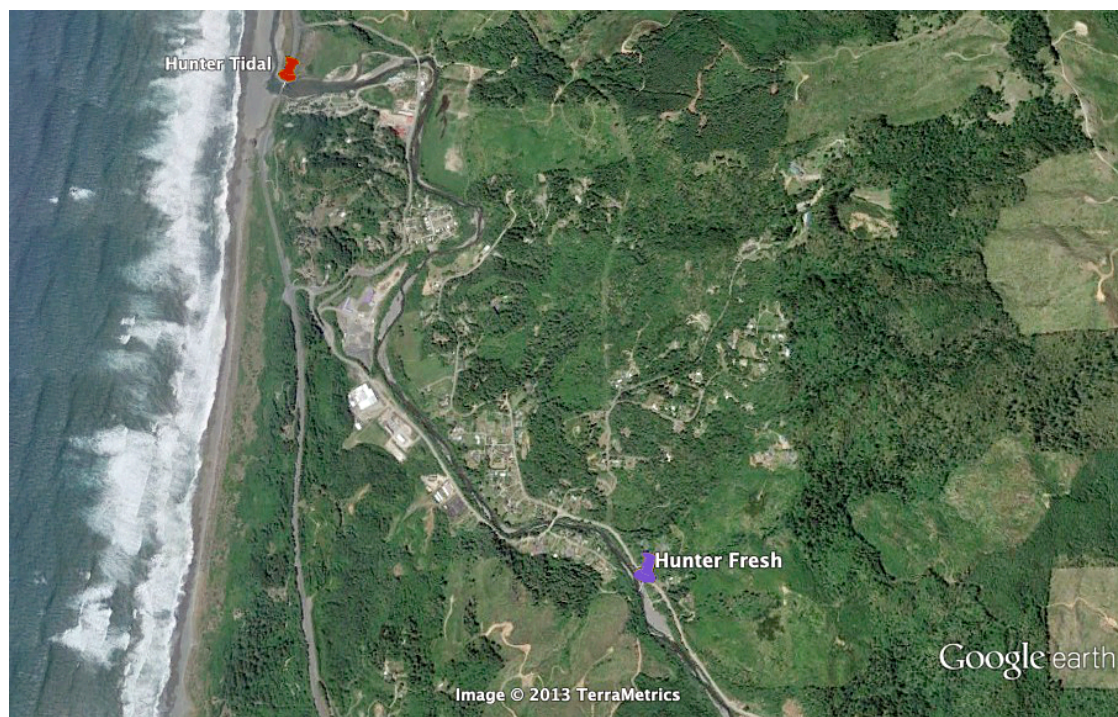


FIGURA 2: LOCAIS DE AMOSTRAGEM DAS SUAS POPULAÇÃO EM HUNTER CREEK, IDENTIFICADAS COMO FRESH (HF, A MONTANTE EM ROXO) E TIDAL (HT, NA FOZ EM VERMELHO). FONTE: Google Earth.



FIGURA 3: MONTANTE DE HUNTER CREEK, ONDE FÊMEAS DA POPULAÇÃO FRESH (HF) FORAM COLETADAS.



FIGURA 4: FOZ DE HUNTER CREEK, ONDE FÊMEAS DA POPULAÇÃO TIDAL (HT) FORAM COLETADAS.

Ainda, foram utilizadas fêmeas coletadas previamente no rio Soap Creek ($44^{\circ}44'1.25''N$, $123^{\circ}16'3.65''W$), em Benton County (FIGURA 5). Esta localidade se caracteriza por poças não naturais, distantes da costa e, portanto, absolutamente dulcícola, sem contato com águas oceânicas (FIGURA 6). A prole dos indivíduos desta população, identificada como Soap Creek, foi utilizada para comparação. Tal prática é vantajosa pois a população foi estudada recentemente (Hopkins *et al* 2012 a e b e 2013) , e assim foram estimadas previsões para os exemplares das novas populações do estudo.



FIGURA 5.: LOCAL DE AMOSTRAGEM EM SOAP CREEK (SC), NAS POÇAS ARTIFICIAIS. FONTE: Google Earth.



FIGURA 6: ÁREA DE AMOSTRAGEM EM SOAP CREEK.

Após a coleta, os animais foram transportados à Utah State University (Universidade do Estado de Utah) em Logan, Utah, e mantidos individualmente em recipientes plásticos com água filtrada, em uma câmara fria a 5°C e ciclo de luz de 12 horas. Os experimentos foram realizados com a prole destes indivíduos.

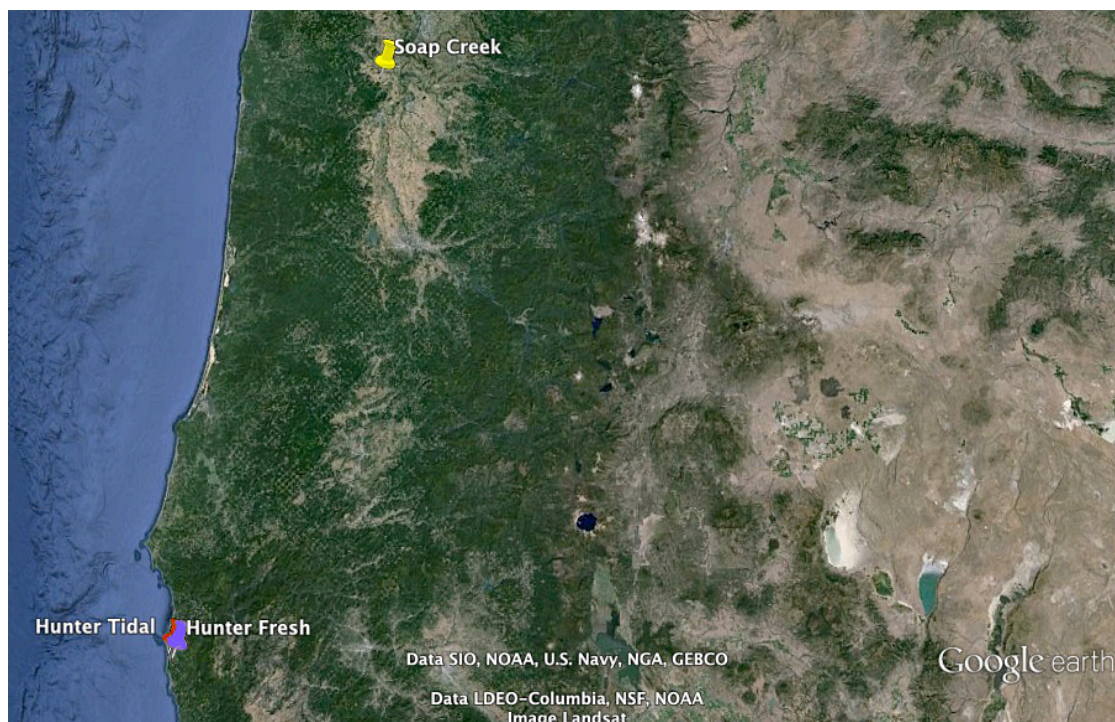


FIGURA 7: PORÇÃO COSTEIRA DE OREGON, ONDE PODEM SER OBSERVADOS OS TRÊS PONTOS DE AMOSTRAGEM DE ADULTOS DE *T. GRANULOSA*, SC (AMARELO), HF (ROXO) E HT (VERMELHO). FONTE: Google Earth.

A salinidade local foi medida em diversos pontos do rio e das poças com um medidor de salinidade e condutividade. Com isso, foi possível relacionar a presença de indivíduos expostos a maiores ou menores níveis de salinidade, e estipular os limites superior e inferior de salinidade local.

2.2 FASE EXPERIMENTAL

A experimentação deste estudo foi dividida em 3 momentos: primeiramente, foram estudadas somente os ovos de *T. granulosa* e o efeito da salinidade sobre os mesmos (experimento 1). Em seguida, foi realizado um experimento para averiguar o efeito da salinidade nas larvas da espécie (experimento 2). Finalmente, foi realizado

um experimento para observar o efeito da salinidade nos níveis hormonais das larvas, mas especificamente corticosterona, hormônio cuja liberação é mediada por situações de estresse em que o animal se encontra (experimento 3).

Em laboratório (Brodie/ French Lab, Utah State University, Logan, UT), os ovos depositados foram coletados e imediatamente submetidos a tratamentos com solução salina. Para testar o efeito da salinidade na sobrevivência e desenvolvimento embrionário de *T. granulosa* foi desenhado um experimento (experimento 1) com quatro tratamentos (concentrações) replicados sete vezes para cada uma das 3 populações (FIGURA 8). Em cada replica foram usados três ovos. As concentrações utilizadas foram 0 (controle), 1.0, 1.5 e 2.0 ppt (partes por mil) de NaCl. Os ovos foram agrupados de acordo com a fêmea de origem e a data de oviposição, de modo que em cada placa foram colocados três ovos de uma mesma fêmea, ovopositados em um mesmo dia. Os níveis de água foram observados diariamente e a salinidade foi mantida constante com adição de água destilada quando necessário (quando o nível de água da placa se encontrasse abaixo do desejado). Essa medida foi necessária pois, com o pequeno volume de solução salina nas placas, a perda de água por evaporação implicaria num aumento significativo na salinidade, podendo exercer maiores efeitos sobre os ovos do que o esperado/ natural. Ainda, a completa evaporação da solução resultaria em ressecamento e morte prematura dos ovos. Os ovos foram observados diariamente até a eclosão das larvas. Ovos não eclodidos foram retirados da placa para evitar qualquer efeito sobre os ovos sobreviventes. As larvas recém-nascidas foram medidas utilizando lupa com ocular milimétrica e seu estágio de desenvolvimento foi estimado segundo os estágios de desenvolvimento larval descrito por Harrison (1969). Eventuais deformidades, como presença de tumores ou subdesenvolvimento também foram registradas e avaliadas quanto ao grau de deformidade (scores de 1 a 4, sendo 1 pouco expressivas e 4 extremamente severas e frequentemente fatais).

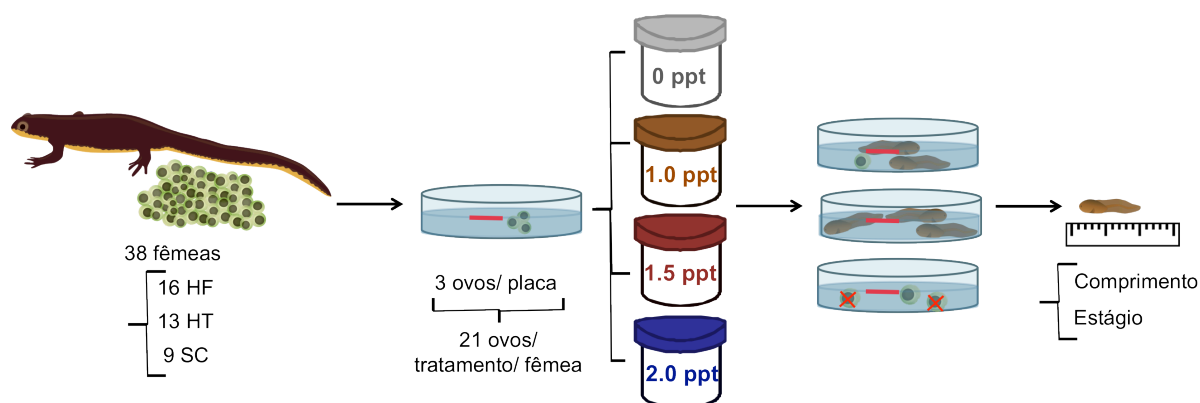


FIGURA 8: DESENHO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 1. A LINHA VERMELHA NAS PLACAS DE PETRI MARCAM O NÍVEL DE ÁGUA MANTIDO DURANTE TODOS OS EXPERIMENTOS. FONTE: O autor.

Dentre as larvas utilizadas no experimento, aquelas que se desenvolveram em solução 0 ppt (controle), ou seja, não foram afetadas por salinidade, foram imediatamente transportadas para novas placas de petri para serem usadas em um novo experimento (experimento 2). Para testar o efeito da salinidade na sobrevivência das larvas durante os primeiros dias de desenvolvimento pós-eclosão, foi desenhado um experimento com 3 tratamentos, replicados 10 vezes para cada população (FIGURA 9). Em cada réplica, foi utilizada somente uma larva, identificada de acordo com a fêmea de origem e a data de eclosão. As concentrações utilizadas foram 0 (controle), 1.5 e 2.0 ppt. As larvas foram mantidas nas placas por 15 dias após sua eclosão. Ao fim desse período, as larvas foram novamente medidas e avaliadas em seu estágio de desenvolvimento. Novas anormalidades e/ ou mortalidades foram registradas. Larvas sobreviventes tratadas com solução 0 ppt foram movidas para tanques com vegetação e alimento para desenvolvimento, sendo mantidas para novos experimentos. Todas as larvas não aptas para serem utilizadas em experimentos subsequentes foram anestesiadas em finquel 1% e sacrificadas em formaldeído, de acordo com a aprovação do comitê de ética local.

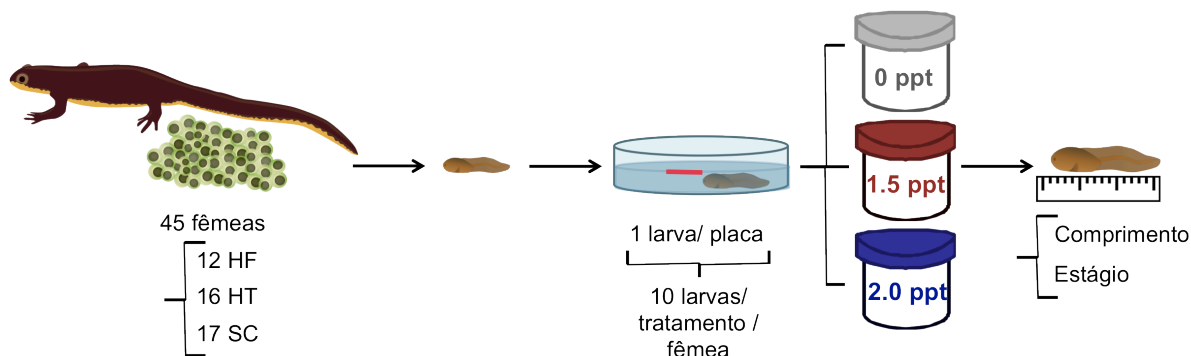


FIGURA 9: DESENHO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 2. FONTE: O autor.

Foram calculados índices de crescimento e desenvolvimento larval a partir das medidas obtidas, utilizando as fórmulas:

$$IX = (X_1 - X_0)/t$$

Onde IX = Índice de Crescimento (mm/dias) , X_0 = Comprimento inicial (mm) , X_1 = Comprimento final (mm), t = Tempo de duração do experimento (15 dias) e;

$$IS = (S_1 - S_0)/t$$

Onde IS = Índice de Desenvolvimento (estágios/dias), S_0 = Estágio inicial, S_1 = Estágio final, t = Tempo de duração do experimento (15 dias).

Após 2 meses, as larvas sobreviventes dos primeiro e segundo experimento foram retiradas dos tanques para serem utilizadas em um experimento final (experimento 3). O último experimento foi desenhado com 2 tratamentos, replicados 15 vezes para cada população (FIGURA 10). As concentrações utilizadas foram 0 (controle) e 5 ppt. As larvas foram identificadas e separadas somente de acordo com a população de origem da fêmea. Ainda, as larvas foram classificadas visualmente em grandes (B) ou pequenas (S), para que fosse possível analisar se o tamanho do animal influenciaria na quantidade de corticosterona encontrada. As larvas foram submetidas a estresse por confinamento (restrição espacial), mantidas individualmente, por 6 horas, em novas placas de petri de 3.5 cm de diâmetro, com 4 ml de solução. Após esse período, as larvas foram medidas (comprimento total) e pesadas, e congeladas instantaneamente com nitrogênio líquido em microtubos. Os tubos foram conservados em freezer -80°C até uso.

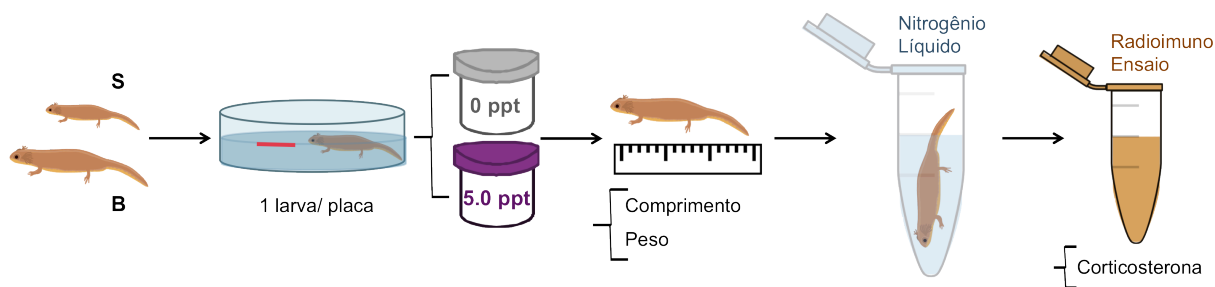


FIGURA 10: DESENHO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3. FONTE: O autor

Para a extração de corticosterona, foi utilizado o protocolo de Belden *et al* (2003) e Chambers (2011) modificado. As larvas foram pesadas e homogeneizadas com massa ajustada de água destilada (massa x 10ml + 0.5ml lavagem – mínimo 1.5ml e máximo 4.0ml). Corticosterona marcada (“labeled”) foi adicionada às amostras homogeneizadas. A extração foi feita com a adição de acetato de etilo-isooctano 30% (Ethyl-Acetate Isooctane - EA/ISO) às amostras, que foram homogeneizadas novamente e colocadas em repouso. O EA/ISO age como solvente em hormônios, sendo utilizado no experimento para capturar a corticosterona das amostras. Outras porções das amostras, como sólidos, não se solubilizam no reagente. Em seguida, as amostras foram congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido, para que as impurezas, água e porções sólidas fossem retiradas. O processo foi repetido duas vezes, para garantir maior pureza às amostras. A solução obtida de amostra e EA/ISO foi evaporada com o auxílio de gás nitrogênio (N₂). As amostras foram resuspensas em EA/ISO, homogeneizadas e refrigeradas durante a noite.

As amostras foram submetidas a purificação por colunas de celite e glicol para remover lipídios, esteróides indesejados e outros resíduos. O volume de corticosterona das amostras foi coletado, seco com jato de nitrogênio e em banho-maria (40°C, 45-60 minutos), resuspenso em solução tampão salina fosfatada com glicose (Phosphate-Buffered Saline with Glucose – PBSg), homogeneizado e refrigerado durante a noite. Após, foi realizado um radioimunoensaio (RIA) para medir a quantidade de corticosterona nas amostras.

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados utilizando o software R. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) para testar as diferenças entre as concentrações de salinidade

utilizadas, as populações de origem das larvas e as variáveis testadas: tamanho de eclosão, estágio de desenvolvimento de eclosão e tempo de eclosão no experimento 1.

Ainda, foi analisada a curva de sobrevivência das larvas, para determinar o efeito dos tratamentos de salinidade na sobrevivência dos indivíduos. Da mesma forma, ANOVAs foram realizadas para testar as diferenças entre as concentrações de salinidade, população de origem e índice de crescimento e desenvolvimento larval no experimento 2.

Finalmente, foi utilizada uma análise de covariância (ANCOVA) para determinar a relação entre a quantidade de corticosterona total das larvas e o tratamento de salinidade, tamanho larval (comprimento e peso) e a população de origem das larvas no experimento 3.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITO DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE *Taricha granulosa*

A partir das amostragens de campo foram criadas em laboratório desovas provenientes de 38 fêmeas. Destas, 16 fêmeas eram da população Hunter Fresh (HF), 13 da população Hunter Tidal (HT) e 9 da população Soap Creek (SC). Estas fêmeas ovipositaram 3192 ovos, assim distribuídos 1344 ovos da população HF, 1092 da população HT e 756 da população SC.

O aumento da concentração de salinidade teve efeito em todas as variáveis medidas. (TABELA 1). O tamanho da larva ao eclodir varia entre populações ($F_{2,121}=15.18$, $p<0.001$) e entre os tratamentos ($F_{3,121}=8.33$, $p<0.001$) sem que exista uma interação entre esses fatores ($F_{11,121}=5.34$, $p<0.001$). As análises a posteriori (teste de Tukey) demonstram que as larvas oriundas da população SC possuem tamanho menor ao eclodir do que as larvas da população HF e HT, que não diferem entre si. Quanto ao tratamentos, as maiores concentrações (1.5 e 2.0) tem efeito de fazer com que as larvas eclodam com tamanho menor (TABELAS 1 E 2).

TABELA 1: MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DAS VARIÁVEIS TAMANHO, ESTÁGIO E TEMPO DE ECLOSÃO DENTRE OS TRATAMENTOS DE CONCENTRAÇÃO SALINA 0 PPT, 1.0 PPT, 1.5 PPT E 2.0 PPT. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS, BASEADAS NA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DO TESTE TUKEY

Tratamento	Tamanho (mm)	Estágio	Tempo de eclosão (dias)
0 ppt	4.88 \pm 0.20 b	40.13 \pm 0.32 ab	31.15 \pm 1.48 bc
1.0 ppt	4.88 \pm 0.25 b	40.22 \pm 0.58 b	31.52 \pm 1.48 c
1.5 ppt	4.70 \pm 0.30 a	39.99 \pm 0.45 ab	30.29 \pm 2.03 ab
2.0 ppt	4.64 \pm 0.30 a	39.88 \pm 0.40 a	29.61 \pm 1.74 a

O estágio de desenvolvimento embrionário da larva ao eclodir também varia entre populações ($F_{2,121}=8.95$, $p<0.001$) e entre os tratamentos ($F_{3,121}=3.35$, $p=0.021$), e novamente não existe uma interação entre esses fatores ($F_{11,121}=2.9$, $p=0.002$). As análises a posteriori (teste de Tukey) demonstram que as larvas oriundas da população SC eclodem com um desenvolvimento embrionário mais jovem do que as

larvas da população HF e HT , que não diferem entre si. Quanto ao tratamentos, as maiores concentrações (1.5 e 2.0) tem efeito de fazer com que as larvas eclodam com desenvolvimento menor do que aquelas tratadas com as menores concentrações (0 e 1.0); contudo, só há uma diferença de desenvolvimento estatisticamente significativa quando compara-se as concentrações 1.0 e 2.0 (TABELAS 1 E 2).

O tempo de eclosão das larvas varia entre populações ($F_{2,121}=15.18$, $p<0.001$) e entre os tratamentos ($F_{3,121}=8.33$, $p<0.001$). Da mesma forma que nas variáveis anteriores não existe interação entre esses fatores ($F_{11,121}=5.34$, $p<0.001$). As análises a posteriori (teste de Tukey) demonstram que as larvas oriundas da população SC possuem menor tempo de eclosão do que as larvas da população HF e HT , que não diferem entre si. Quanto ao tratamentos, as maiores concentrações (1.5 e 2.0) tem efeito semelhante entre si de fazer com que as larvas eclodam em menor tempo (TABELAS 1 E 2), efeito diferente do causado pelas menores concentrações.

TABELA 2: MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DAS VARIÁVEIS TAMANHO, ESTÁGIO E TEMPO DE ECLOSÃO DE *T. GRANULOSA* ENTRE AS POPULAÇÕES HUNTER FRESH (HF), HUNTER TIDAL (HT) E SOAP CREEK (SC). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS, BASEADAS NA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DO TESTE TUKEY.

População	Tamanho (mm)	Estágio	Tempo de eclosão (dias)
HF	4.89 \pm 0.21 b	40.13 \pm 0.49 b	30.88 \pm 1.92 b
HT	4.79 \pm 0.34 b	40.21 \pm 0.46 b	31.33 \pm 1.37 b
SC	4.61 \pm 0.18 a	39.80 \pm 0.24 a	29.87 \pm 1.78 a

Não houve diferença na sobrevivência dos ovos nos diferentes tratamentos de salinidade ($X^2_3=1.7$, $p=0.633$). Ao contrário, todas as curvas de sobrevivência se assemelharam muito, indicando uma resposta comum ao aumento da salinidade (FIGURA 11).

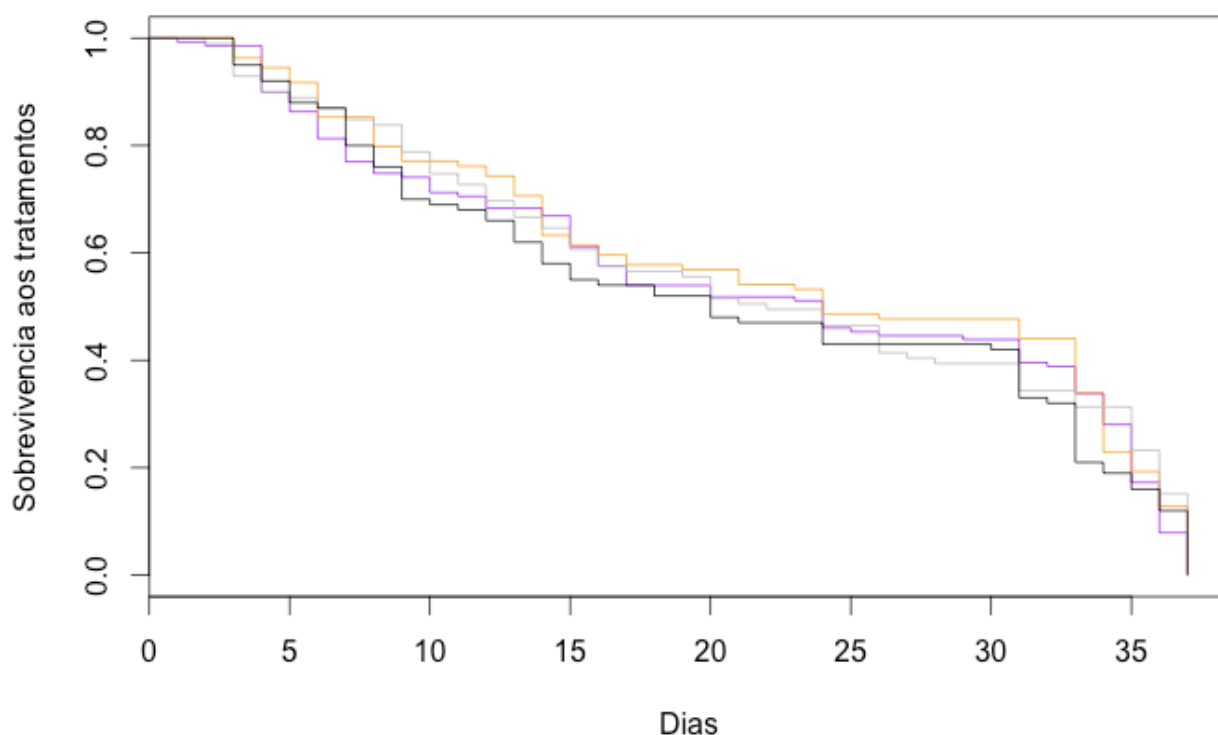


FIGURA 11: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS OVOS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS DE SALINIDADE. A CURVA **ROXA** É REFERENTE AO TRATAMENTO 0 PPT, **LARANJA** É REFERENTE AO TRATAMENTO 1.0 PPT, **CINZA** É REFERENTE AO TRATAMENTO 1.5 PPT E **PRETA** É REFERENTE AO TRATAMENTO 2.0 PPT

Com relação a efeitos morfológicos, em todas as concentrações de sal foram encontradas larvas recém-eclodidas com deformidades. No geral houve grande variação no grau de severidade e frequências mas não foi observada uma relação entre a incidência ou a severidade das deformidades e as concentrações de salinidade.

3.2 EFEITO DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS DE *Taricha granulosa*

Foram criadas em laboratório desovas provenientes de 45 fêmeas obtidas nas amostragens de campo. Estes ovos foram mantidos em concentração de salinidade 0 ppt até o momento de eclosão. Destas, 12 fêmeas eram da população HF, 16 da população HT e 17 da população SC. Foram utilizadas 928 larvas destas fêmeas, assim distribuídos 335 larvas da população HF, 280 da população HT e 313 da população SC.

O índice de desenvolvimento larval não variou nem com a concentração de salinidade testada, nem com a população de origem das larvas. As médias do índice de crescimento das larvas submetidas a todas as concentrações de salinidade foram bastante semelhantes (TABELA 3). Da mesma forma, o índice de desenvolvimento de todas as populações foram muito similares, não havendo diferença significativa (TABELA 4).

O índice de crescimento das larvas não variou em função do tratamento de salinidade testado. Contudo, o índice de crescimento variou significativamente de acordo com a população de origem das larvas ($F_{2,119}=27.59$, $p<0.001$). Houve interação entre a população e o tratamento de salinidade no índice de crescimento larval ($F_{8,119}=7.49$, $p<0.001$). As análises a posteriori (teste de Tukey) demonstraram que o índice de crescimento de todas as populações foram diferentes entre si, sendo que as larvas de oriundas da população SC tiveram um índice de crescimento significativamente menor (TABELA 4).

TABELA 3: MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DAS VARIÁVEIS ÍNDICE DE CRESCIMENTO E ÍNDICE DE DESENVOLVIMENTO DE *T. GRANULOSA* CALCULADOS PARA OS TRATAMENTOS DE CONCENTRAÇÃO SALINA 0 PPT, 1.0 PPT, 1.5 PPT E 2.0 PPT.

Concentração	Índice de Crescimento (mm/dia)	Índice de Desenvolvimento (estágios/dia)
0 ppt	0.087 \pm 0.023	0.24 \pm 0.15
1.5 ppt	0.090 \pm 0.019	0.33 \pm 1.48
2.0 ppt	0.090 \pm 0.021	0.25 \pm 0.16

TABELA 4: MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DAS VARIÁVEIS ÍNDICE DE CRESCIMENTO E ÍNDICE DE DESENVOLVIMENTO DE *T. GRANULOSA* CALCULADOS PARA AS POPULAÇÕES HUNTER FRESH (HF), HUNTER TIDAL (HT) E SOAP CREEK (SC). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS, BASEADAS NA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DO TESTE TUKEY.

População	Índice de Crescimento (mm/dia)	Índice de Desenvolvimento (estágios/dia)
HF	0.099 \pm 0.020 a	0.24 \pm 0.04 a
HT	0.090 \pm 0.019 b	0.34 \pm 1.56 a
SC	0.076 \pm 0.018 c	0.24 \pm 0.21 a

3.3 EFEITO DA SALINIDADE NOS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA EM LARVAS DE *Taricha granulosa*

Foram criadas em laboratório larvas provenientes das três população. Foram utilizadas 30 larvas da população HF, 29 larvas da população HT e 30 larvas da população SC.

Após a quantificação de corticosterona nas amostras, as quantidades foram corrigidas para se obter um valor comparável, já que as amostras continham o hormônio total (*whole body*) dos indivíduos de diferentes tamanhos e estágios.

As larvas classificadas como pequenos (S) tinham em média 2.03 ± 0.37 cm e 0.089 ± 0.05 g, enquanto as larvas grandes (B) tinham 3.37 ± 0.64 cm e 0.30 ± 0.16 g (TABELAS 5 E 6). Os indivíduos S tinham em média 82.85 ng/g de corticosterona, enquanto os grandes tinham 18.91 ng/g.

TABELA 5: MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DA QUANTIDADE DE CORTICOSTERONA EM *T. GRANULOSA* PARA AS POPULAÇÕES HUNTER FRESH (HF), HUNTER TIDAL (HT) E SOAP CREEK (SC) E TAMANHO PEQUENO (S) E GRANDE (B).

População	Tamanho	Quantidade de Corticosterona (ng/g)
HF	S	79.46 \pm 75.33
HF	B	20.71 \pm 22.20
HT	S	80.01 \pm 61.29
HT	B	10.47 \pm 11.52
SC	S	86.32 \pm 46.87
SC	B	29.99 \pm 17.60

TABELA 6: MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DA QUANTIDADE DE CORTICOSTERONA EM *T. GRANULOSA* PARA AS CONCENTRAÇÕES 0 PPT E 5.0 PPT E TAMANHO PEQUENO (S) E GRANDE (B).

Concentração	Tamanho	Quantidade de Corticosterona (ng/g)
0 ppt	S	71.27 \pm 56.33
0 ppt	B	16.49 \pm 19.28
5.0 ppt	S	95.25 \pm 60.94
5.0 ppt	B	21.18 \pm 18.05

Foram testados diversos modelos de correlação de variáveis com a quantidade de corticosterona. Dentro os modelos testados, o que apresentou maior quantidade de informação relacionou a concentração de salinidade a qual as larvas foram submetidas e o comprimento delas no momento do tratamento ($R^2=0.5756$, $F_{3,85}=38.43$, $p<0.001$). Considerando que a quantificação de corticosterona foi feita utilizando o indivíduo inteiro, o comprimento do animal foi um fator importante e que influenciou na quantidade de hormônio total encontrado, o que se mostrou verdadeiro com as análises ($F_{1,85}=108.16$, $p<0.001$).

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que existe variação entre as diferentes populações de *Taricha granulosa* no tamanho, estágio de desenvolvimento, tamanho da larva ao eclodir e no índice de crescimento. No entanto, a sobrevivência e o nível de corticosterona não variam entre as populações. No geral, as larvas das populações HF e HT são maiores, e eclodem tardiamente e com tamanho maior do que a população SC. Da mesma forma, as populações HF e HT tem índice de crescimento maior do que a população SC.

Os experimentos que testaram os diferentes efeitos de concentrações salinas e da população de origem indicaram que existe um efeito da concentração de sal bem como da população, mas que esses efeitos independem entre si. Isso indica que não ocorre adaptação das populações a regimes de concentração de sal nas condições experimentais utilizadas. As concentrações maiores afetam negativamente o tamanho da larva, o tempo e estágio ao eclodir. No entanto, os índices de crescimento e de desenvolvimento não variam, sugerindo um crescimento compensatório ou um efeito associado a apenas algum estágio do desenvolvimento. Esse efeito compensatório foi observado em *Ambystoma maculatum*, onde concentrações moderadas e altas de salinidade, as larvas sofriam uma perda significativa de massa, contrário ao ganho observado no controle. Contudo, ovos tratados em concentrações moderadas poderiam recuperar essa perda de massa se fossem retirados do tratamento de salinidade e expostos somente ao controle. O efeito redutor se mostrou permanente em massas de ovos expostas a altas concentrações de salinidade (Karraker & Gibbs 2011).

Foi observado que o desenvolvimento embrionário é dependente da fêmea de origem, e mais amplamente da população de origem dos ovos. Em *Salamandra salamandra*, indivíduos de ambientes semiáridos foram capazes de tolerar maiores concentrações de salinidade do que indivíduos de ambientes úmidos. Esse efeito pode ser atribuído à maior capacidade de osmorregulação de *S. salamandra* de ambiente semiárido por estarem em constante pressão ambiental e melhor adaptação ao ambiente terrestre (Degani 1981). Foi observada uma diferença significativa no desenvolvimento de larvas de *Taricha granulosa* de diferentes “famílias” dentro de uma mesma população (efeito materno), sendo que algumas famílias se mostram

mais tolerantes a altas concentrações de salinidade do que outras (Hopkins *et al* 2012 a e b). Isso demonstra que há uma combinação de elementos que determinam a sensibilidade da espécie à salinidade, sendo o efeito materno bastante importante nessa sensibilidade. É possível que isso ocorra pelo processo de adaptação aos ambientes naturais de modo a tolerar variações do mesmo. Assim, populações em ambientes com níveis de salinidade baixos ou muito variados teriam uma resposta muito mais variável. Já, as populações já adaptadas a altas salinidades deixariam de apresentar esse efeito familiar.

Considerando que as concentrações de salinidade altas resultaram em efeitos negativos (especialmente no crescimento e desenvolvimento) nos ovos, mas não tanto nas larvas recém-eclodidas, pode-se assumir que os estágio no qual o indivíduo é exposto a salinidade afeta a magnitude do efeito. Ovos de *Litoria ewingii* expostos a tratamentos de salinidade não demonstraram variação nos parâmetros observados. Contudo, os tratamentos foram feitos somente nos últimos estágios embrionários próximos a eclosão o que possibilita que esse resultado seja efeito do pouco tempo de exposição, e não um resistência natural (Chinathamby *et al* 2006).

Contudo, é inegável o efeito negativo do aumento da salinidade em anfíbios de diferentes espécies. Em *Buergeria japonica*, todos os tratamentos de salinidades afetaram em algum nível a taxa de eclosão e sobrevivência de larvas, e a ocorrência de deformidades também foi observada (Haramura 2007). Em *Incilius nebulifer*, tratamentos de diferentes concentrações de salinidade testados resultaram efeito negativo na sobrevivência de larvas até o estágio de metamorfose, redução do tempo de desenvolvimento, aumento de massa e aumento do comprimento dos membros posteriores. O efeito nessas características pode afetar o valor adaptativo dos indivíduos quando adultos (Alexander *et al.*, 2012). Esse efeito também ocorre em girinos de anuros. Em *Fejervarya limnocharis* altas concentrações de sal afetaram significativamente a sobrevivência dos girinos até metamorfose. Ainda, os girinos expostos a tratamentos de baixa e moderada salinidade apresentaram massa e desenvolvimento maior do que os indivíduo em tratamento de alta salinidade (Wu & Kam 2009). Um estudo feito com *Taricha granulosa* demonstrou que dois sais de descongelamento (NaCl e MgCl₂) tem forte efeito em ovos da espécie. Esse estudo (Hopkins *et al* 2012 a), que seguiu um desenho bastante semelhante ao presente estudo, demonstrou que ambos os sais afetaram sobrevivência, ocorrência e

severidade de deformidades de maneira diretamente proporcional ao aumento da concentração salina (Hopkins *et al* 2012 a).

Neste estudo, não foi observado nenhum efeito da população de origem ou da salinidade na quantidade de corticosterona medida nos indivíduos; ao contrário, a quantidade hormonal foi influenciada pelo tamanho da larva, e somente dependendo do tamanho larval é que a salinidade causou efeito nos indivíduos. Contudo, o efeito de salinidade no fator estresse já foi observado em outras espécies de vários grupos. Em *Alligator mississippiensis* (Reptilia, Crocodylia), concentrações elevadas de salinidade causaram um aumento linear nos níveis de corticosterona em pouco tempo de exposição sendo que esse aumento se manteve com a continuidade da exposição. Já em anfíbios, *Ambystoma jeffersonianum*, a salinidade afetou o nível basal de corticosterona (em condições “normais”, sem fator aditivo de estresse além do aumento de salinidade), embora esse mesmo efeito não tenha sido observado em condições de confinamento na mesma espécie, ou em *Rana sylvatica* e *Hyla versicolor* em nenhuma das duas condições (Chambers 2011).

Em conclusão, o aumento da salinidade afeta o desenvolvimento embrionário de *Taricha granulosa* nas condições estudadas, sendo que maiores concentrações de salinidade reduzem o grau de desenvolvimento embrionário (tamanho e estágio ao eclodir) e tempo de eclosão. Ainda, a população de origem dos ovos pode determinar maior tolerância ou sensibilidade a salinidade. Populações já expostas a concentrações mais altas de salinidade, no caso as populações costeiras HF e HT, são em geral mais tolerantes, o que pode ser consequência de um processo adaptativo que permitiu a sobrevivência da população em condições outrora inóspitas a espécie. Não foi observado o efeito de salinidade no nível de corticosterona dos animais, o que leva a hipótese de que indivíduos de *T. granulosa* destas populações conseguem superar o desafio osmorregulatório do aumento da salinidade sem grandes prejuízos. Mais estudos são necessários para determinar o real efeito da salinidade em *T. granulosa*, e são de extrema importância para determinar a sobrevivência de populações da espécie ao aumento de salinidade decorrente da aplicação de sal de degelo nas proximidades de ambientes de ocorrência da espécie. O maior conhecimento sobre a sensibilidade de diferentes populações de *T. granulosa* a alta salinidade pode auxiliar na implementação de medidas para prevenir o desaparecimento de populações da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, L.G.; LAILVAUX, S.P.; PECHMANN, J.H.K.; DE VRIES, P.J. **Effects of salinity on early life stages of the Gulf Coast toad, *Incilius nebulifer* (Anura: Bufonidae)**. *Copeia* 106e114, 2012.
- BELDEN, L.K.; MOORE, I.T.; MASON, R.T.; WINGFIELD, J.C. & BLAUSTEIN, A.R. **Survival, the hormonal stress response and UV-B avoidance in Cascades Frog tadpoles (*Rana cascadae*) exposed to UV-B radiation**. *Functional Ecology*, 17(3), 409-416, 2003.
- BRADY, S.P. **Road to evolution? Local adaptation to road adjacency in an amphibian (*Ambystoma maculatum*)**. *Scientific Reports* 2, 1e5, 2012.
- CHAMBERS, D.L. **Increased conductivity affects corticosterone levels and prey consumption in larval amphibians**. *Journal of Herpetology* 45:219-223, 2011.
- CHINATHAMBY, K.; REINA, R.D.; BAILEY, P.C. & LEES, B.K. **Effects of salinity on the survival, growth and development of tadpoles of the brown tree frog, *Litoria ewingii***. *Australian Journal of Zoology*, 54(2), 97-105, 2006.
- COLLINS, S.J.; RUSSELL, R.W. **Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians**. *Environmental Pollution* 157, 320e324, 2009.
- DEGANI, G. **Salinity tolerance and osmoregulation in *Salamandra salamandra* (L.) from different populations**. *Journal of comparative physiology*, 145(1), 133-137, 1981.
- DOUGHERTY, C.K.; SMITH, G.R. **Acute effects of road de-icers on the tadpoles of three anurans**. *Applied Herpetology* 3, 87e93, 2006.
- ENVIRONMENT CANADA. **Priority Substances List Assessment Report: Road Salts**. Environment Canada, catalog number En40-215/63E. Ottawa, ON. 2001.
- HARAMURA, T. **Salinity tolerance of eggs of *Buergeria japonica* (Amphibia, Anura) inhabiting coastal areas**. *Zoological science*, 24(8), 820-823, 2007.
- HARLESS, M.L.; HUCKINS, C.J.; GRANT, J.B. & PYPKER, T.G. **Effects of six chemical deicers on larval wood frogs (*Rana sylvatica*)**. *Environmental*

- Toxicology and Chemistry 30, 1637e1641, 2011.
- HARRISON, R.G. **Harrison stages and description of the normal development of the spotted salamander, *Ambystoma punctatum* (Linn.)**. Organization and Development of the Embryo: 44-66, 1969.
- HART, B.T.; BAILEY, P.; EDWARDS, R.; HORTLE, K.; JAMES, K.; MCMAHON, A. & SWADLING, K. **A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota**. Hydrobiologia, 210(1-2), 105-144, 1991.
- HOPKINS, G.R.; FRENCH, S.S.; & BRODIE JR, E.D. **Increased frequency and severity of developmental deformities in rough-skinned newt (*Taricha granulosa*) embryos exposed to road deicing salts (NaCl & MgCl₂)**. Environmental Pollution, 173, 264-269, 2013.
- HOPKINS, G.R.; FRENCH, S.S. & BRODIE JR, E.D. **Potential for local adaptation in response to an anthropogenic agent of selection: effects of road deicing salts on amphibian embryonic survival and development**. Evolutionary Applications. 2012 a.
- HOPKINS, G.R.; GALL, B.G.; FRENCH, S.S. & BRODIE JR, E. D. **Interfamily variation in amphibian early life-history traits: raw material for natural selection?** Ecology and evolution, 2(7), 1637-1643, 2012 b.
- KARRAKER, N.E. & GIBBS, J.P. **Road deicing salt irreversibly disrupts osmoregulation of salamander egg clutches**. Environmental Pollution 159, 833e835 , 2011.
- KARRAKER, N.E.; GIBBS, J.P. & VONESH, J.R. **Impacts of road deicing salt on the demography of vernal pool-breeding amphibians**. Ecological Applications 18, 724e734, 2008.
- KARRAKER, N.E. & RUTHIG, G.R. **Effect of road deicing salt on the susceptibility of amphibian embryos to infection by water molds**. Environmental Research 109, 40e45, 2009.
- KAUSHAL, S.S.; GROFFMAN, P.M.; LIKENS, G.E.; BELT, K.T.; STACK, W.P.; KELLY, V.R.; BAND, L.E. & GISHER, G.T. **Increased salinization of fresh water in the northeastern United States**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 102, 13517e13520, 2005.
- LANGHANS, M.; PETERSON, B.; WALKER, A.; SMITH, G.R. & RETTIG, J.E. **Effects of salinity on survivorship of wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles**. Journal of Freshwater Ecology 24, 335e336, 2009.

- PADHYE, A.D. & GHATE, H.V. **Sodium chloride and potassium chloride tolerance of different stages of the frog, *Microhyla ornata***. Herpetological Journal 2, 18e23, 1992.
- PETRANKA, J.W. & DOYLE, E.J. **Effects of road salts on the composition of seasonal pond communities: can the use of road salts enhance mosquito recruitment?** Aquatic Ecology 44, 155e166., 2010.
- RIITTERS, K.H. & WICKHAM, J.D. **How far to the nearest road?** Frontiers in Ecology and the Environment 1, 125e129, 2003.
- SANZO, D. & HECNAR, S.J. **Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*)**. Environmental Pollution 140, 247e256, 2006.
- SHOEMAKER, V.H. & NAGY, K.A. **Osmoregulation in amphibians and reptiles**. Annual Reviews of Physiology 39:449-471, 1977.
- SODHI, N.S. & EHRLICH, P.R. (Eds.). **Conservation biology for all**. Oxford, UK: Oxford University Press, 2010.
- TROMBULAK, S.C. & FRISSELL, C.A. **Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities**. Conservation Biology 14:18–30, 2000.
- TURTLE, S.L. **Embryonic survivorship of the spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) in roadside and woodland vernal pools in southeastern New Hampshire**. Journal of Herpetology 34, 60e67, 2000.
- VIERTEL, B. **Salt tolerance of *Rana temporaria*: spawning site selection and survival during embryonic development (Amphibia, Anura)**. Amphibia-Reptilia 20, 161e171, 1999.
- WELLS, K.D. **The ecology and behavior of amphibians**. University of Chicago Press, 2010.
- WU, C.S. & KAM, Y.C. **Effects of salinity on the survival, growth, development, and metamorphosis of *Fejervarya limnocharis* tadpoles living in brackish water**. Zoological science, 26(7), 476-482, 2009.