

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

Amanda Jamille Carvalho Brum

**CICLO REPRODUTIVO, MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE
DE *Odontophrynus americanus* (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) NO
SUL DO BRASIL**

Santa Maria, RS
2019

Amanda Jamille Carvalho Brum

**CICLO REPRODUTIVO, MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE DE
Odontophrynus americanus (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) NO SUL DO
BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Orientador: Dr.^a Sonia Zanini Cechin
Coorientadora: Dr.^a Cynthia Peralta de Almeida Prado

Ficha gerada com os dados fornecidos pelo autor

Brum, Amanda Jamille Carvalho
CICLO REPRODUTIVO, MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE DE
Odontophrynus americanus (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) NO SUL DO BRASIL
/ Amanda Jamille Carvalho Brum - 2019
64 p.; 30cm

Orientador: Sonia Zanini Cechin
Coorientadora: Cynthia Peralta de Almeida Prado
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Animal,
Santa Maria, RS, 2019.

1. Ciclo reprodutivo, maturidade sexual e longevidade de *Odontophrynus americanus* (Anura: Odontophrynidae) no sul do Brasil; I. Brum, Amanda Jamille Carvalho Brum II. Prado, Cynthia Peralta de Almeida III. Cechin, Sonia Zanini. CICLO REPRODUTIVO, MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE DE *Odontophrynus americanus* (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) NO SUL DO BRASIL.

Amanda Jamille Carvalho Brum

**CICLO REPRODUTIVO, MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE DE
Odontophrynus americanus (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) NO SUL DO
BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Aprovado em 19 de fevereiro de 2019:



Sonia Zanini Cechin, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Elaine Maria Lucas Gonsales, Dra. (UFSM)



Tiago Gomes dos Santos, Dr. (Unipampa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, seja direta ou indiretamente:

Primeiramente, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Roger e a Isabel, da Mostra de Biologia, pela oportunidade de estagiar na mostra e ter meu primeiro contato com a herpetologia e divulgação científica. À professora Sonia Zanini Cechin por ter me aceitado no laboratório em 2014 e ter me dado a oportunidade de conhecer melhor o mundo da herpetologia e confirmar que era isso que eu queria para mim. Agradeço também a Luiza Loebens por, ao longo desses anos, ter me auxiliado em todas as etapas do meu aprendizado e a Cynthia Prado pela ajuda, por ter aceitado me coorientar e contribuir para o meu crescimento quando pesquisadora.

Aos meus colegas de PPG pelas choradeiras, risadas, conversas e informações. Agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório, Aline, Brena, Erica, Guilherme, João, Jonathan, Letícia, Tiago, por todas as conversas, palpites e ajudas ao longo desses dois anos, principalmente à Suelen, Thaís e Conrado por toda a ajuda quando os problemas surgiram, suporte, e conversas pra desestressar (constantemente).

Aos meus amigos, todos eles, por toda a paciência comigo, por segurarem minha mão quando foi preciso, e pelas risadas para descontrair. Agradeço principalmente à Thais, Fernando, Felipe, Jéssica e Cássia, sem vocês nada disso seria possível, não haveria saúde, não haveria resultados, não haveria disposição para as disciplinas, não haveria nada.

Aos meus pais, Martha e Magno, aos meus irmãos e todo o restante da família, que sempre me apoiaram nas minhas decisões, estavam ali quando eu precisei, aguentando meu estresse e todo o resto.

Agradeço especialmente, ao Maurício Garcia, por todo o suporte, paciência, revisões de texto e contribuições, mas principalmente pelo companheirismo e me aguentar em todos os momentos de estresse.

Aos demais amigos e envolvidos que eu não citei, um imenso obrigada, com certeza vocês contribuíram muito por isso tudo.

Há muitas coisas que a ciência não compreende, muitos mistérios que ainda devem ser resolvidos. Num universo com dezenas de bilhões de anos-luz de extensão e uns 10 ou 15 bilhões de anos de idade, talvez seja assim para sempre.

(Carl Sagan)

RESUMO

CICLO REPRODUTIVO, MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE DE *Odontophrynus americanus* (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) NO SUL DO BRASIL

AUTORA: Amanda Jamille Carvalho Brum

ORIENTADORA: Sonia Zanini Cechin

COORDINADORA: Cynthia Peralta de Almeida Prado

As estratégias reprodutivas dos anfíbios anuros (i.e. estratégias temporais e ciclo reprodutivo) estão associadas aos padrões de atividade e modos reprodutivos das espécies e visam aumentar o sucesso reprodutivo. O dimorfismo sexual de tamanho (diferença no comprimento ou massa corporal dos indivíduos sexualmente maduros), outro aspecto relacionado às estratégias reprodutivas, pode ser atribuída a aspectos reprodutivos (i.e. fertilidade), bem como a diferenças na idade de maturidade sexual, taxa de crescimento e longevidade da espécie. Variações nos parâmetros relacionados à idade dos indivíduos (e.g. idade de maturidade sexual, longevidade) nos fornecem informações essenciais sobre a história de vida das espécies, além de dados demográficos de uma população. *Odontophrynus americanus* é uma espécie de anuro de médio porte, distribuído no sul e leste da América do Sul. Este apresenta o tipo de reprodução classificada como explosiva, podendo ser encontrado a maior parte do ano, após fortes chuvas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever o ciclo reprodutivo, identificar a idade de maturidade sexual e longevidade da espécie *O. americanus* para o Sul do Brasil bem como investigar a presença de dimorfismo sexual de tamanho. Para isso foram coletadas amostras de gônadas e falanges de *O. americanus*, as quais passaram por processamento histológico. As variações nos parâmetros relacionados à idade dos indivíduos (e.g. idade de maturidade sexual, longevidade) foram investigadas através do método de esqueletocronologia e a presença de dimorfismo sexual de tamanho através da análise do comprimento e massa corporal. *O. americanus* apresentou ciclo reprodutivo potencialmente contínuo, estando apto para a reprodução em qualquer estação do ano. Machos e fêmeas atingem maturidade sexual com um ano, porém, em relação a longevidade, o maior valor encontrado para machos foi de dez anos, enquanto para fêmeas foi de seis anos. Não encontramos evidência de dimorfismo sexual de tamanho (no comprimento e massa corporal). Conhecer aspectos básicos da história de vida de uma espécie é de suma importância, uma vez que servem de base para novos trabalhos além de permitir comparações e/ou possíveis generalizações sobre o significado evolutivo das estratégias ecológicas.

Palavras-chave: Anfíbios. Biologia reprodutiva. Esqueletocronologia. Gametogênese.

ABSTRACT

REPRODUCTIVE CYCLE, SEXUAL MATURITY AND LONGEVITY OF *Odontophrynus americanus* (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) IN SOUTHERN BRAZIL

AUTHOR: Amanda Jamille Carvalho Brum

ADVISOR: Sonia Zanini Cechin

COORIENTATOR: Cynthia Peralta de Almeida Prado

Reproductive strategies of anuran amphibians (i.e. temporal strategies and reproductive cycles) are associated with the activity pattern and reproductive modes of the species and aims to increase its reproductive success. Sexual size dimorphism (difference in the length or body mass of sexually mature individuals), another aspect related to reproductive strategies, can be assigned to reproductive aspects (i.e. fertility), as well as to differences in the age of sexual maturity, growth rate and longevity of a species. Variation in the parameters related to the age of the individuals (e.g. age of sexual maturity, longevity) provide essential information about the life history of a species, as well as demographic data from a population. *Odontophrynus americanus* is a medium-sized anuran species, distributed in southern South America. This species presents the reproduction type classified as explosive, and can be found for most of the year after strong rains. Thus, the aim of this contribution is to describe the reproductive cycle, identify the age of sexual maturity and longevity of this species in southern Brazil, as well as to investigate the presence of sexual dimorphism related to size. Therefore, samples of gonads and phalanges of *O. americanus* were collected and submitted to histological processing. Variation in the parameters related to the age of individuals (e.g. age of sexual maturation, longevity) were investigated through the method of skeletochronology, and the presence of sexual dimorphism investigated through analysis of size and body mass. *O. americanus* presented a potentially continuous reproductive cycle, being able to reproduce on any season of the year. Males and females reach sexual maturity at one year, and in relation to longevity the highest value found for males was of ten years, while for females was of six years. There is no noticeable evidence of sexual dimorphism on the size (length and body mass). Knowing the primordial aspects of the life history of a species is of utmost importance, since new contributions may be based on it, allowing comparisons and possible generalizations about the evolutionary meaning of ecological strategies.

Key words: Amphibians. Reproductive biology. Skeletochronology. Gametogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa de distribuição da espécie *Odontophrynus americanus* (área quadriculada) evidenciando os pontos de coleta de cada espécime.....33
- Figura 2** – Esquema da secção transversal da falange de *Odontophrynus americanus*. LAG's, linhas de crescimento ósseo; Ed, endóstio; CM, canal medular; Pe, perióstio.34
- Figura 3** – Secção transversal do testículo de *Odontophrynus americanus* evidenciando os túbulos seminíferos que o compõem (destacado em vermelho), e os cistos celulares em diferentes estágios da espermatogênese. Amarelo, espermatogônia primária; Verde, espermatogônia secundária; Rosa, espermatócito primário; Azul, espermatócito secundário; Laranja, espermátide primária; Roxo, espermátide secundária.35
- Figura 4** – Secção transversal do testículo de *Odontophrynus americanus*, evidenciando um túbulo seminífero. Em destaque, cistos celulares de diferentes linhagens espermatogênicas. A, espermatogônia primária; B, espermatogônia secundária; C, espermatócitos primários; D, espermatócitos secundários; E, espermátides primárias; F, espermátides secundárias; G, espermátides terciárias; H, espermatozoides.36
- Figura 5** – Porcentagem dos estágios da espermatogênese de *Odontophrynus americanus* em cada estação do ano. SPG I, espermatogônias primárias; SPG II, espermatogônias secundárias; SPC I, espermatócitos primários; SPC II, espermatócitos secundários; SPT I, espermátides primárias; SPT II, espermátides secundárias; SPT III, espermátides terciárias; SPZ, espermatozoides.37
- Figura 6** – Esquema da extração dos ovários de fêmeas de *Odontophrynus americanus*, evidenciando o preenchimento da cavidade abdominal pelos ovócitos (contorno vermelho). Fgd = fígado; Est = estômago; Ov = ovos; Int = intestino.38
- Figura 7** – Secção transversal do ovário de *Odontophrynus americanus* evidenciando os estágios da ovogênese. FL I = folículo primário; FL II = folículo secundário; FL III = folículo terciário; FL IV = folículo quaternário.39
- Figura 8** – Porcentagem dos estágios da ovogênese de *Odontophrynus americanus* em cada estação do ano. FL I, folículos primários; FL II, folículos secundários; FL III, folículos terciários; FL IV, folículos quaternários ou folículos maduros.40
- Figura 9** – Diferença no índice gonadossomático (IGS) entre machos e fêmeas de *Odontophrynus americanus*. Dados de IGS normalizados (\log_{10}). Linha preta = mediana.41
- Figura 10** – Relação entre massa corporal e (A) volume testicular, (B) massa testicular e (C) índice gonadossomático (IGS) dos machos de *Odontophrynus americanus*. Todos os dados foram normalizados (\log_{10}) para melhor visualização.42

Figura 11 – Relação entre massa corporal e (A) massa do ovário, (B) índice gonadossomático (IGS) das fêmeas de *Odontophrynus americanus*. Todos os dados foram normalizados (\log_{10}) para melhor visualização. 43

Figura 12 – Secção transversal das falanges de *Odontophrynus americanus*, evidenciando a idade de maturidade sexual para (A) machos e (B) fêmeas, ambos com 1 LAG; e a longevidade para (C) machos com 10 LAG's e (D) fêmeas com 6 LAG's. Setas, linhas de crescimento ósseo (LAG's); MC, canal medular; Ed, endóstio; Pe, perióstio.....44

Figura 13 – Frequência de distribuição das idades nos machos (barras brancas) e fêmeas (barras cinzas) de *Odontophrynus americanus*..... 45

Figura 14 – Gráfico evidenciando a diferença no comprimento rostro-cloacal (CRC) entre machos e fêmeas de *Odontophrynus americanus*. Linha preta = mediana. ... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medidas dos machos de *Odontophrynus americanus* no sul do Brasil. .47

Tabela 2 – Medidas das fêmeas de *Odontophrynus americanus* no sul do Brasil. ..48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 CAPÍTULO 1: Ciclo reprodutivo, maturidade sexual e longevidade de <i>Odontophrynus americanus</i> (Anura:Odontophrynidae) no sul do Brasil	18
3.1 Introdução	20
3.2 Materiais e Métodos	21
3.2.1 Coleta de dados	21
3.2.2 Ciclo reprodutivo.....	22
3.2.3 Maturidade sexual	23
3.2.4 Análises estatísticas	24
3.3 Resultados	25
3.3.1 Ciclo reprodutivo.....	25
3.3.1.1 Ciclo reprodutivo dos machos	25
3.3.1.2 Ciclo reprodutivo das fêmeas	26
3.3.2 Dimorfismo sexual e relação tamanho-fecundidade.....	27
3.3.3 Maturidade sexual e longevidade.....	28
3.4 Discussão	28
3.4.1 Ciclo reprodutivo.....	28
3.4.2 Dimorfismo sexual e relação tamanho-fecundidade.....	30
3.4.3 Maturidade sexual e longevidade	31
3.5 Referências	49
3.6 Apêndice	57
4 CONCLUSÕES	58
5 REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os anfíbios apresentam um ciclo de vida complexo, com uma grande diversidade de estratégias reprodutivas, derivadas de atributos morfológicos, fisiológicos e comportamentais, que estão associadas a padrões de atividade e modos reprodutivos (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Tais estratégias visam aumentar o êxito reprodutivo das espécies sob condições ambientais particulares (DUELLMAN & TRUEB, 1994), bem como responder à pressão exercida pelo risco de predação, competição inter e intra-específica e disponibilidade de recursos (CRUMP, 1974; CRUMP, 1981; DUELLMAN & TRUEB, 1994).

Em anuros, podemos encontrar dois tipos de estratégias temporais reprodutivas: a prolongada e a explosiva (WELLS, 1977). Em espécies de reprodução prolongada, o período de atividade reprodutiva é longo, podendo durar vários meses, havendo baixa densidade de machos, ausência de sincronia com o período reprodutivo das fêmeas e fazendo com que o sucesso reprodutivo dos machos dependa da eficiência competitiva de seu canto. Já em espécies de reprodução explosiva, o período de atividade reprodutiva é curto, podendo durar algumas noites ou até mesmo apenas algumas horas, havendo alta densidade de machos, período reprodutivo sincronizado com as fêmeas e por fim, formação de coros de canto, onde o êxito reprodutivo dos machos depende da velocidade em que eles conseguem encontrar fêmeas e deslocar oponentes. Contudo, algumas espécies podem apresentar padrões intermediários, possuindo características semelhantes tanto à reprodução explosiva quanto à reprodução prolongada (BASTOS & HADDAD, 1999; PRADO & HADDAD, 2005).

Independentemente de qual a estratégia temporal reprodutiva, fatores abióticos (e.g. precipitação, fotoperíodo e temperatura) e bióticos (e.g. predação, interações biológicas) interferem no ciclo reprodutivo dos anfíbios (OLIVEIRA et al., 2002; TOLEDO et al., 2006; HIERT et al., 2012; LEIVAS et al., 2012; HADDAD et al., 2013). O ciclo reprodutivo dos anfíbios anuros pode ser classificado como contínuo ou descontínuo (RASTOGI et al., 1976). Anuros de regiões tropicais úmidas comumente apresentam ciclo reprodutivo contínuo, possibilitando que se reproduzam em qualquer momento do ano, uma vez que não existe uma sazonalidade climática (RASTOGI et al., 1976; JØRGENSEN et al., 1986). Por outro lado, espécies de anuros de regiões temperadas ou tropicais sazonalmente secas, geralmente apresentam ciclo

reprodutivo descontínuo, devido à sazonalidade climática dos fatores ambientais (RASTOGI et al., 1976; RASTOGI et al., 1983). Anuros em regiões subtropicais apresentam ciclo reprodutivo mais similar com aquele reportado para regiões temperadas já que fatores como umidade e fotoperíodo também influenciam sua atividade (BOTH et al., 2008).

O dimorfismo sexual secundário (SSD) também é outro aspecto relacionado às estratégias reprodutivas dos anuros. Um dos recursos mais comuns em anuros é a disparidade no tamanho do corpo entre os sexos (DUELLMAN & TRUEB, 1994; WELLS, 2007). O dimorfismo sexual de tamanho é a diferença encontrada no comprimento ou massa corporal de organismos sexualmente maduros, e já foi demonstrado em várias espécies (KUPFER, 2007). Essa diferença no tamanho corporal entre os sexos, dentro de uma população, pode ser devido à seleção sexual (SHINE, 1988) ou diferenças ecológicas (SHINE, 1989). Em 90% das espécies de anfíbios, as fêmeas são maiores do que os machos, o que provavelmente nos indica uma seleção para aumento da fecundidade (WOOLBRIGHT, 1983; HAN & FU, 2013). Assim, várias hipóteses visam explicar a existência de dimorfismo sexual de tamanho. Geralmente, o tamanho corporal tende a ser maior em machos, quando estes são territoriais e se envolvem em combates (LIAO et al., 2015), mas essa premissa ainda enfrenta contestações (HAN & FU, 2013). Já em fêmeas, o tamanho corporal maior está relacionado com o aumento da fertilidade (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Além disso, a variação no tamanho corporal também pode ser atribuída a diferenças na idade de maturidade sexual, taxa de crescimento ou longevidade dos organismos (ÜZUM & OLGUN, 2009; SINSCH et al., 2010).

Outro componente importante das estratégias reprodutivas de anuros são os parâmetros relacionados à idade (e.g. idade de maturidade sexual, longevidade) (DUELLMAN & TRUEB, 1994; WELLS, 2007). Durante muito tempo, o método mais utilizado para estimar a idade dos anfíbios era o de marcação e recaptura. Contudo, esse método despande muito recurso e esforço, e para espécies com baixa densidade populacional ou de difícil coleta, esse método é impraticável (HALLIDAY & VERRELL, 1988). Alternativamente, o método de esqueletocronologia é um método não letal (SINSCH, 2015) que tem se mostrado bastante eficaz na estimativa de idade de diversos grupos: anfíbios (SOCHA & OGIELSKA, 2010; BIONDA et al., 2015; LÓPEZ et al., 2017), animais fósseis (BOTH & CHINSAMY, 2000; SANDER, 2000; TÜTKEN et al., 2004; EZCURRA, 2017), répteis (GOSHE et al., 2010; AVENS et al., 2009), aves

(RICQLÈS et al., 2003; BOURDON et al., 2009) e mamíferos (MARÍN-MORATALLA et al., 2013).

A esqueletocronologia é baseada na contagem de linhas de crescimento ósseo (LAG's). As LAG's, observadas em secções transversais de ossos longos (CASTANET et al., 2003), são formadas em função do crescimento anual cíclico dos ectotérmicos, caracterizado pela alternância entre períodos de crescimento rápido e lento (CASTANET & SMIRINA, 1990; KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU et al., 2007). Assim, nas secções transversais de osso longos, podemos observar períodos de crescimento rápido, marcados como faixas amplas, e períodos de crescimento lento, marcados como linhas estreitas, as LAG's (CASTANET & SMIRINA, 1990; KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU et al., 2007). Deste modo, cada linha estreita, ou seja, cada LAG, representa um período de pausa no crescimento, permitindo a estimativa da idade dos indivíduos (CASTANET & SMIRINA, 1990).

A formação das LAG's de forma anual (i.e. uma LAG por ano) tem sido bem evidenciada para anuros (KUMBAR & PANCHARATNA, 2001; MARANGONI et al., 2011; SINSCH, 2015; SINSCH & DEHLING, 2017). Contudo, espécies que vivem em ambientes com baixa variação climática, tendem a apresentar um padrão irregular na formação das LAG's, podendo apresentar linhas múltiplas em um ano, devido á eventos curtos de pausa no crescimento (KUSRINI & ALFROD, 2006; ITURRA-CID, 2010). Além disso, estudos mostram que o número de LAG's formadas por ano pode variar em diferentes populações de uma mesma espécie, devido a variáveis climáticas e ambientais (OLGUN et al., 2005; SINSCH et al., 2007). Sendo assim, é necessário cuidado e investigação da periodicidade da formação das LAG's antes de atribuir a idade de dos organismos de uma espécie ou população através da esqueletocronologia.

Em anuros, o método de esqueletocronologia tem sido empregado, principalmente, em espécies de regiões temperadas (HAMELAAR, 1985; SAGOR et al., 1998; ESTEBAN et al., 2002; MORRISON et al., 2004; ROZENBLUT & OGIELSKA, 2005; LIAO & LU, 2010a; LINDQUIST et al., 2012; LOU et al., 2012; OROMI et al., 2012; GUSTAFSON et al., 2015; MIDDLETON & GREEN, 2015; SINSCH, 2015; PASCUAL-PONS et al., 2017; ZHONG et al., 2018), uma vez que a formação das LAG's são resultado da variação climática sazonal, sendo o crescimento dos indivíduos retardado no inverno (CASTANET et al., 2003). Contudo, as LAG's também podem ser observadas em espécies que vivem em regiões tropicais, onde a

sazonalidade é baseada principalmente no regime de chuvas (KHONSUE et al., 2000; KUSRINI & ALFORD, 2006; ANDREONE et al., 2011; LINDQUIST et al., 2012; ARANTES et al., 2015; SINSCH & DEHLING 2017). Assim, a formação anual de LAG's tem base genética e sob condições naturais sua formação é sincronizada com a sazonalidade climática (CASTANET et al., 1993).

A utilização da esqueletocronologia possibilitou, ao longo dos anos, criar modelos de crescimento utilizados para investigar os padrões de crescimento em anfíbios, bem como para fazer comparações entre sexos, populações e espécies, ao longo de gradientes latitudinais e altitudinais ao longo da distribuição natural das espécies (ITURRA-CID et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; OROMI et al., 2016; SINSCH & DEHLING, 2017). A investigação da idade dos anfíbios nos fornece informações primordiais sobre parâmetros demográficos de uma população, como taxa de crescimento, idade de maturidade sexual e longevidade (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Estudos mostram, por exemplo, que espécies que vivem em regiões tropicais atingem a maturidade sexual mais cedo (com um ou dois anos) enquanto que espécies que vivem em regiões temperadas têm uma vida reprodutiva mais longa (SINSCH, 2015; SINSCH & DEHLING, 2017). Além disso, dentro de uma mesma espécie, populações que vivem em maiores altitudes são compostas por indivíduos mais velhos e maiores (em tamanho) em relação às populações de baixas altitudes, devido à variação de fatores ambientais como temperatura e precipitação (LIAO & LU, 2010a, b; OROMI et al., 2016; JIN et al., 2017). Estudos assim são cruciais, uma vez que provêm informações importantes sobre a história de vida das espécies, permitindo comparações e/ou possíveis generalizações sobre o significado evolutivo das estratégias ecológicas.

Anuros neotropicais pertencentes ao gênero *Odontophrynus* (Anura, Odontophrynidae) são amplamente distribuídos no sul e leste da América do Sul (FROST, 2011). Apresentando tamanho médio, as espécies pertencentes a este gênero apresentam hábito fossorial, permanecendo em seus abrigos subterrâneos a maior parte do ano (SAVAGE & CEI, 1965). Este é composto por dez táxons, reunidos em três grupos de espécies: *Odontophrynus americanus*, *O. cultripes* e *O. occidentalis* (SAVAGE & CEI, 1965; CEI, 1987; ROSSET, 2008). O grupo *americanus*, atualmente, é representado por cinco espécies: *O. americanus*, *O. lavillai*, *O. cordobae*, *O. juquinha* e *O. maisuma*.

Odontophrynus americanus Dumeril & Bibrón, 1841 é a espécie que apresenta maior distribuição geográfica dentro do gênero, podendo ser encontrado na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (ROSSET et al., 2006). De corpo globuloso e robusto, apresenta uma dieta generalista, composta basicamente por coleópteros, dípteros, larvas de lepidópteros, pequenos moluscos, anelídeos e crustáceos terrestres (LANGONE, 1994). De hábito noturno e reprodução explosiva (WELLS, 1977; CANAVERO et al., 2009; SANTOS et al., 2008), *O. americanus* pode ser encontrado quase o ano todo, à exceção dos meses mais frios, e se reproduz após fortes chuvas, em corpos d'água lênticos e temporários (ACHAVAL & OLMOS, 2007; MANEYRO & CARREIRA, 2012).

No Brasil, a espécie é representada por populações tetraploides ($4n = 44$), primeiro caso de poliploidismo natural em uma espécie bissexual (SÁEZ & BRUM, 1959; SÁEZ & BRUM, 1966; BEÇAK et al., 1966; ROSSET et al., 2006), e por populações diploides ($2n = 22$) (SÁEZ & BRUM, 1966; BEÇAK et al., 1970; ROSSET et al., 2006;). Diferentemente das populações tetraploides de *O. americanus*, que são amplamente distribuídas, as populações diploides da espécie são conhecidas apenas no estado de São Paulo, no Brasil, no norte e centro da Argentina (BEÇAK et al., 1970; MARTINO et al., 1999; MARTINO & SINSCH, 2002; ROSSET et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a ecologia reprodutiva da espécie *Odontophrynus americanus* para populações do Sul do Brasil, com base em análises morfoanatômicas e histológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *O. americanus*;
- Determinar a idade de maturidade sexual e longevidade de *O. americanus*;
- Investigar a existência de dimorfismo sexual em atributos de tamanho corpóreo de *O. americanus*.

3. CAPÍTULO 1: CICLO REPRODUTIVO, MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE DE *Odontophrynus americanus* (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) NO SUL DO BRASIL

CICLO REPRODUTIVO, MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE DE *Odontophrynus americanus* (ANURA: ODONTOPHRYNIDAE) NO SUL DO BRASIL

Amanda J. C. Brum¹, Luiza Loebens¹, Cynthia P. A. Prado², Sonia Z. Cechin³

RESUMO

Estudos sobre a biologia reprodutiva e idade dos anfíbios nos fornecem informações primordiais sobre a história de vida das espécies, além de parâmetros demográficos de uma população, como taxa de crescimento, idade de maturidade sexual e longevidade. *Odontophrynus americanus*, é uma espécie de anuro neotropical amplamente distribuída no sul da América do Sul, que apresenta reprodução explosiva, reproduzindo-se após fortes chuvas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever o ciclo reprodutivo da espécie para o sul do Brasil com base em análise histológica, bem como identificar a idade de maturidade sexual e longevidade da espécie, e investigar a presença de dimorfismo sexual de tamanho. Para tanto, utilizamos amostras de gônadas e falanges, de indivíduos depositados em coleções herpetológicas do sul do Brasil, as quais passaram por processamento histológico. Investigamos as variações nos parâmetros relacionados à idade dos indivíduos (e.g. idade de maturidade sexual, longevidade) através do método de esqueletocronologia e a presença de dimorfismo sexual de tamanho através da análise do comprimento e massa corporal. *O. americanus* apresentou ciclo reprodutivo potencialmente contínuo, estando apto para reprodução em qualquer estação do ano. A maturidade sexual é atingida com um ano para ambos os sexos, contudo a longevidade difere entre os sexos, onde as fêmeas vivem até seis anos, enquanto machos vivem até dez anos. Além disso, não encontramos evidência de dimorfismo sexual de tamanho (no comprimento e massa corporal). Conhecer aspectos básicos da história de vida de uma espécie é de suma importância, uma vez que servem de base para novos trabalhos além de permitir comparações e/ou possíveis generalizações sobre o significado evolutivo das estratégias ecológicas.

Palavras-chaves: Amphibia. Biologia Reprodutiva. Esqueletocronologia. Gametogênese.

¹ Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Campus Jaboticabal, SP, Brasil

³ Departamento de Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

3.1 INTRODUÇÃO

As estratégias reprodutivas de uma espécie estão relacionadas a características fisiológicas, morfológicas e comportamentais que garantam o maior número de descendentes viáveis (DUELLMAN & TRUEB, 1994; WELLS, 2007). Em anfíbios anuros, as estratégias reprodutivas têm uma forte relação com sazonalidade de fatores ambientais como temperatura, pluviosidade, fotoperíodo e disponibilidade de alimento (BERTOLUCI, 1998; PRADO & HADDAD, 2005; BOTH et al., 2008). O ciclo reprodutivo dos anuros pode ser classificado como contínuo ou descontínuo, conforme a influência da sazonalidade (RASTOGI et al., 1976). Espécies que habitam as zonas temperadas apresentam ciclo descontínuo, com alternância de períodos de atividade e repouso, uma vez que são dependentes da combinação de temperatura e pluviosidade. Enquanto que em regiões tropicais, com clima constantemente quente e úmido, os anuros tendem a exibir ciclos contínuos ou potencialmente contínuos, onde a precipitação tende a ser o principal fator extrínseco controlando a reprodução (RASTOGI et al., 1976, RASTOGI et al., 1983; JORGENSEN et al., 1986; BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002; GOTTSBERGER & GRUBER, 2004).

A variação sazonal dos fatores ambientais associa-se também ao crescimento dos anfíbios ao longo do ano, produzindo linhas de crescimento ósseo (LAG's), que podem ser observadas em cortes transversais nos ossos longos (CASTANET et al., 2003). As LAG's caracterizam-se pela presença de faixas mais amplas formadas durante o período de crescimento e linhas mais estreitas que sinalizam uma pausa no crescimento. Assim, com a contagem das LAG's é possível inferir a idade do animal (CASTANET & SMIRINA, 1990). Essa técnica de cronologia óssea é bastante eficaz para a determinação da estrutura etária nos anfíbios (LIAO, 2011; HSU et al., 2014; BIONDA et al., 2015; MIDDLETON & GREEN, 2015). O estudo da estrutura etária de uma população de anfíbios pode fornecer informações como a longevidade, a idade de maturidade sexual e taxa de crescimento de uma espécie (LI et al., 2010). No entanto, ainda existem poucos estudos relacionando a idade dos indivíduos com a maturidade sexual em anuros (PUENTE et al., 2011; MI, 2015; QUIROGA et al., 2015; OROMI et al., 2016, OTERO et al., 2017).

A formação de LAG's em anfíbios de zonas temperadas ocorre devido às variações climáticas, uma vez que durante períodos mais frios comumente há um retardo no crescimento (CASTANET et al., 2003). Entretanto, CASTANET et al. (1993),

apontam que a formação de LAG's no tecido ósseo secundário em ritmo anual tem base genética, e sob condições naturais torna-se sincronizado à sazonalidade climática. Sendo assim, uma vez que haja padrão de crescimento equivalente a um ciclo anual e retardo e aceleração da atividade do animal, a contagem das LAG's se torna uma estimativa eficaz de idade (GIBBONS & McCARTHY, 1983). A região Sul do Brasil possui clima subtropical e assemelha-se a regiões temperadas quanto a variação sazonal de temperatura e pluviosidade (OVERBECK et al., 2007), tornando esse ambiente interessante para a investigação de padrões de crescimento ósseo em anuros.

Odontophrynus americanus Dumeril & Bibrón, 1841 é um anuro neotropical, de corpo globuloso e robusto, que distribui-se no sul e sudeste do Brasil, Uruguai, norte da Argentina e sul do Paraguai e da Bolívia (KWET & DI-BERNARDO, 1999). A reprodução de *O. americanus* é considerada explosiva (WELLS, 1977; CANAVERO et al., 2008; SANTOS et al., 2008) e ocorre ao longo de quase todo o ano (à exceção dos meses mais frios), associada a corpos d'água lênticos e temporários, após fortes chuvas (ACHAVAL & OLMOS, 2007; CANAVERO et al., 2008; MANEYRO & CARREIRA, 2012). Estudos com populações de *O. americanus* no Uruguai e Argentina, apontam que o ciclo reprodutivo da espécie, nesses locais é contínuo (CAREZZANO et al., 2013; VALDEZ & MANEYRO, 2016). Além disso, segundo Achaval e Olmos (2007), a espécie apresenta dimorfismo sexual, caracterizado pela presença de saco vocal preto nos machos. Contudo, em populações de *O. americanus* do centro da Argentina, nenhum dimorfismo sexual foi encontrado (GRENAT et al., 2012). Estudos sobre a biologia reprodutiva da espécie para a região Sul do Brasil não são disponíveis. Sendo assim, os objetivos desse estudo são: (i) determinar o ciclo reprodutivo da espécie *O. americanus* no sul do Brasil; (ii) determinar a longevidade e a idade de maturação sexual de machos e fêmeas; (iii) investigar se há dimorfismo sexual de tamanho.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 COLETA DE DADOS

Foram analisados espécimes de *Odontophrynus americanus* preservados na Coleção de Herpetologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Pontifícia

Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), Fundação Zoobotânica (FZB) e Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), coletados na Região Sul do Brasil (Fig. 1; Apêndice 1). A região sul do Brasil apresenta clima subtropical úmido, com temperaturas anuais mínimas de 7-19°C e máximas de 17-29°C. Nos meses mais frios (junho, julho e agosto) a média das temperaturas mínimas absolutas varia entre -8°C à 4°C, enquanto a média das temperaturas máximas absolutas nos mesmos meses varia 24°C à 31°C. Já nos meses mais quentes (dezembro, janeiro e fevereiro), a média das temperaturas mínimas absolutas varia entre 8°C à 15°C, enquanto a média das temperaturas máximas absolutas nos mesmos meses varia entre 32° à 37°C. A precipitação média varia de 300 à 700mm nos meses mais quentes (dezembro, janeiro e fevereiro), e de 180 à 480mm nos meses mais frios (junho, julho e agosto) (WREGGE et al., 2012; ALVARES et al., 2014).

A biologia reprodutiva foi descrita com base em análises morfoanatômicas e histológicas dos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas. Para as análises morfoanatômicas, foram examinados 4 indivíduos de cada sexo por mês (n = 96; 48 machos e 48 fêmeas), e para as análises histológicas 2 indivíduos de cada sexo por mês (n = 48; 24 machos e 24 fêmeas). A fim de se obter o número amostral mínimo de indivíduos de cada sexo por estação, a janela temporal de coleta dos indivíduos aqui utilizados vai de 1964 à 2013. Para cada indivíduo analisado foram obtidas informações sobre sexo, mês de captura, comprimento rostro-cloacal (CRC), medido com auxílio de paquímetro digital de precisão 0,01 mm e massa corporal (MC) medida em balança de precisão de 0,0001 g (SHIMADZU UniBloc AUY-220).

3.2.2 CICLO REPRODUTIVO

Os indivíduos foram dissecados e os ovários e testículos direitos extraídos e individualmente preservados em solução de álcool 80%. Para os machos foram obtidos os dados macroscópicos: massa (g), comprimento, largura e espessura (mm) dos testículos. O volume testicular (VT) foi calculado pela fórmula: $VT = (4/3)\pi abc$, na qual a = comprimento, b = largura e c = espessura dos testículos (DUNHAM, 1981). Para as fêmeas, como medida morfológica foi obtida a massa do ovário (g). O investimento reprodutivo de machos e fêmeas foi analisado através do índice gonadossomático (IGS) calculado pela fórmula: $IGS = (massa\ gonadal/massa$

corporal)*100 (COSTA et al., 1998). Para os machos, a massa obtida para o testículo direito foi multiplicada por dois.

As amostras de ovário e testículo foram encaminhadas para processamento histológico em resina histológica (LEICA Historesin Embedding Kit), seccionadas em micrótomo rotativo e coradas em hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Axio Scope.A1 com Axiocam MRc5) por meio do software ZEN LITE. O ciclo espermatogênico foi definido de acordo com Pudney (1995), seguindo: espermatogônia primária (SPG-I), espermatogônia secundária (SPG-II), espermatócito primário (SPC-I), espermatócito secundário (SPC-II), espermatíde primária (SPT-I), espermatíde secundária (SPT-II), espermatíde terciária (SPT-III), espermatozoides livres (SPZ). As etapas do ciclo ovariano foram definidas de acordo com Oliveira & Santos (2004), seguindo: folículo primário (FL-I), folículo secundário (FL-II), folículo terciário (FL-III) e folículo maduro (FL-IV). Para as fêmeas foi obtido o diâmetro do maior folículo maduro, por meio de medidas nas lâminas histológicas.

O método de contagem celular (adaptado de MONTEZOL et al., 2017) foi utilizado para determinar a proporção de células dos diferentes estágios da gametogênese masculina e feminina ao longo das estações do ano. Para as fêmeas, foram contabilizadas todas as células presentes na amostra (i.e. no corte histológico) e a predominância de cada estágio da ovogênese foi estimada com base na porcentagem de células em cada estágio. Para os machos, foram selecionados aleatoriamente três túbulos seminíferos por corte histológico, para os quais calculou-se a área total do túbulo, a área ocupada por cada cisto, bem como a área ocupada pelos espermatozoides livres. A predominância de cada estágio da espermatogênese foi estimada com base na porcentagem de área do túbulo seminífero ocupada pelos cistos em cada estágio celular.

3.2.3 MATURIDADE SEXUAL

O tamanho em que machos e fêmeas atingem a maturidade sexual foi estimado a partir da análise do CRC e MC do menor indivíduo maduro sexualmente. A presença de espermatozoides livres nos testículos foi utilizada como critério principal para determinar a maturidade sexual dos machos (SANTOS & OLIVEIRA, 2008), enquanto que a presença de folículos maduros foi o critério usado para fêmeas (PRADO et al., 2004).

A idade de maturidade sexual dos indivíduos foi descrita através do método de cronologia óssea, utilizando como amostras as penúltimas falanges dos 3º e 4º dedos dos membros anteriores direitos. As amostras foram descalcificadas em EDTA 10%, processadas em historesina, seccionadas transversalmente em micrótomo rotativo (Leica RM2245) com espessura 4-5 µm e coradas em azul de toluidina (CAPUTO et al., 2010). Quatro cortes da região média da diáfise dos ossos foram obtidos para cada indivíduo, a fim de estimar a idade com base na contagem de LAG's (CASTANET & SMIRINA, 1990; CASTANET et al., 1993; CASTANET et al., 2003; Fig. 2). A reabsorção óssea foi determinada com base na ausência de tecido cartilaginoso remanescente da cartilagem larval, situado entre o tecido ósseo e o endóstio (ROZENBLUT & OGIELKA, 2005).

3.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O ciclo reprodutivo de machos e fêmeas foi analisado através de análises de variância, separadamente, a fim de examinar a variação sazonal na massa dos testículos, no VT e no IGS para machos, e variação sazonal do IGS e diâmetro dos ovócitos para fêmeas. A diferença entre o IGS de machos e fêmeas, bem como a existência de dimorfismo sexual de tamanho corpóreo (CRC e MC) foi analisado através de uma análise de variância.

Regressões lineares foram utilizadas para investigar as relações entre tamanho corpóreo e fecundidade, utilizando MC como a variável preditora, já que possui correlação com CRC. Para fêmeas foram analisadas as seguintes relações: MC vs. massa do ovário; MC vs. IGS; e MC vs. diâmetro do maior folículo. Para machos foram analisadas as seguintes relações: MC vs. volume testicular; MC vs. massa testicular; MC vs. IGS.

Modelos lineares generalizados com distribuição de Poisson foram utilizados para determinar a maturidade sexual de machos e fêmeas, separadamente, usando as seguintes variáveis: CRC vs. idade; MC vs. idade; e CRC vs. diâmetro canal medular. A diferença entre a idade e o tamanho (MC e CRC) de maturidade sexual de machos e fêmeas foi comparada através de análise de variância.

As análises estatísticas foram realizadas no programa R versão 3.2.2 (R Core Team 2018), assumindo $p < 0,05$ como critério de significância. Todas as variáveis foram previamente testadas quanto à normalidade e homogeneidade da variância e

foram logaritmizadas quando necessário. Nesse estudo, as estações do ano foram definidas como: primavera (setembro a novembro), verão (dezembro a fevereiro), outono (março a maio) e inverno (junho a agosto).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 CICLO REPRODUTIVO

3.3.1.1 CICLO REPRODUTIVO DOS MACHOS

A gônada masculina de *Odontophrynus americanus* é representada por um par de testículos com forma ovalada e coloração branco-leitosa, localizados na cavidade abdominal dos indivíduos. Na secção transversal dos testículos foi possível observar túbulos seminíferos formados por cistos celulares, estruturas onde se desenvolvem as células germinativas, sendo que cada cisto celular apresenta células em um mesmo estágio de maturação (Fig. 3). O primeiro estágio da espermatogênese, as espermatogônias (primárias e secundárias), encontram-se na periferia dos túbulos, sendo as células presentes nesse estágio, pouco diferenciadas (Fig. 4A). As espermatogônias primárias são células grandes e apresentam cromatina granular e núcleo com aspecto multilobular, enquanto que as espermatogônias secundárias, formadas após divisão mitótica das espermatogônias primárias, são células menores e apresentam cromatina mais condensada (Fig. 4B).

Os espermatócitos primários, células menores que as espermatogônias, apresentam o núcleo em formato esférico, com cromatina bem condensada (Fig. 4C). Os espermatócitos secundários apresentam o núcleo com forte condensação da cromatina, metade do tamanho dos espermatócitos primários, e são encontradas em menor quantidade nos túbulos (Fig. 4D). As espermátides, são células menores que os espermatócitos secundários, com núcleos irregulares e cromatina altamente condensada. Podemos observar nesse estágio, células arredondadas, com núcleo esférico e condensado (espermátides primárias), células com o formato mais alongado/ovoides (espermátides secundárias), e células bastante alongadas, ligeiramente mais grossas que os espermatozoides, apresentando uma mesma orientação paralela no cisto (espermátides terciária) (Fig. 4E, F e G). Os

espermatozoides são caracterizados por células alongadas e finas portando cauda filamentosa extensa, e são geralmente encontrados soltos no lúmen dos túbulos seminíferos (Fig. 4H).

Todos os estágios da gametogênese masculina foram observados em todas as estações do ano. Contudo, houve variação na proporção de células de cada estágio ao longo das estações do ano (Fig. 5). Na primavera houve prevalência de células no estágio de espermátocitos primário (47%). No verão, outono e inverno houve uma prevalência de espermatozoides livres nos túbulos seminíferos (acima de 40%, nas três estações). Foram encontradas a maior quantidade de espermatogônias primárias no inverno (6%) e na primavera (5%). Não houve variação sazonal na massa das gônadas masculinas ($F = 0.34$, $p > 0.05$; Tabela 1), no VT ($F = 0.41$, $p > 0.05$; Tabela 1) e no IGS de machos ($F = 0.87$, $p > 0.05$; Tabela 1). A massa testicular apresentou em média 0.03 ± 0.02 g. Os machos maduros apresentaram VT médio de 14.33 ± 11.16 mm³.

3.3.1.2 CICLO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS

A gônada feminina de *Odontophrynus americanus* é representada por ovários pareados, multilobulados, cercado por uma túnica albugínea que envolve os ovócitos em diferentes estágios de maturação, localizados na cavidade abdominal dos indivíduos. Os ovócitos não maduros (pré-vitelogênicos) apresentam coloração de esbranquiçada à translúcida, enquanto que os ovócitos maduros (vitelogênicos e pós-vitelogênicos) apresentam coloração escura e, quando presentes, ocupam uma grande proporção da cavidade abdominal da fêmea (Fig. 6). Os ovários de *O. americanus* apresenta células germinativas primordiais, as oogônias, e as células foliculares, oócitos em diferentes estágios de maturação. As oogônias, primeiras células da linhagem oogênica, são células com citoplasma pequeno e núcleo grande e oval, com vários nucléolos. Após entrar em meiose, as oogônias dão origem ao folículo primário, células com um aumento de volume celular, citoplasma basofílico e núcleo com poucos nucléolos (Fig. 7).

Os folículos secundários, são maiores que os primários, apresentam citoplasma fortemente basofílico e homogeneamente granular (Fig. 7). No estágio seguinte, temos os folículos terciários, onde o citoplasma celular adquire uma intensa acidofilia, podendo-se reconhecer duas zonas citoplasmáticas, a zona periférica (preenchida

com gema nuclear ou corpo de Balbiani) e a zona interna (não preenchida com gema nuclear) (Fig. 7). O contorno no núcleo nesse estágio é irregular e, também é nesse estágio que começa a pigmentação celular. O último estágio da ovogênese é o de folículo quaternário. Nesse estágio, o núcleo é deslocado para a periferia da célula, a pigmentação e a gema celular ocupam progressivamente todo o citoplasma (Fig. 7).

Nas secções transversais do ovário, podemos identificar os diferentes graus de maturação dos ovócitos (Fig. 7), sendo possível observar todos os estágios da ovogênese em todas as estações do ano. Contudo, houve variação na proporção de células em cada estágio da ovogênese ao longo das estações do ano (Fig. 8). Houve predominância de ovócitos secundários em todas as estações: outono (42%), inverno (40%), primavera (45%) e verão (33%). No inverno, foi encontrada a maior prevalência de ovócitos primários (36%), enquanto que no verão houve a maior prevalência de ovócitos maduros (29%). Não houve variação sazonal na massa dos ovários ($F = 1.05$, $p > 0.05$; Tabela 2) e no IGS das fêmeas ($F = 0.61$, $p > 0.05$; Tabela 2). A massa ovariana teve média de 0.88 ± 1.01 g. Não houve variação sazonal significativa no diâmetro dos folículos maduros ($F = 0.14$, $p > 0.05$; Tabela 2). Os folículos maduros apresentaram diâmetro médio de $1001.2 \text{ mm} \pm 161.84 \text{ mm}$.

3.3.2 DIMORFISMO SEXUAL E RELAÇÃO TAMANHO-FECUNDIDADE

Machos sexualmente maduros de *O. americanus* apresentaram em média 41.68 ± 5.81 mm de CRC e 11.30 ± 5.34 g de MC. As fêmeas sexualmente maduras apresentaram em média e 43.13 ± 4.81 mm de CRC e 11.84 ± 4.91 g de MC. Não houve evidência de dimorfismo sexual no tamanho corpóreo (CRC e MC) de *O. americanus* ($F = 1.74$, $p > 0.05$; $F = 0.26$, $p > 0.05$, respectivamente). O IGS variou significativamente entre machos e fêmeas, onde as fêmeas apresentam um IGS significativamente maior que os machos ($F = 132.5$, $p < 0.0001$, Fig. 9).

Os machos apresentaram relação positiva significativa do tamanho corpóreo (MC) com VT ($R^2 = 0.54$, $t = 7.69$, $p < 0.00$, Fig. 10A), massa testicular ($R^2 = 0.64$, $t = 9.05$, $p < 0.001$, Fig. 10B) e IGS ($R^2 = 0.15$, $t = 2.90$, $p < 0.01$, Fig. 10C). As fêmeas apresentaram relação positiva significativa do tamanho corpóreo (MC) com a massa ovariana ($R^2 = 0.22$, $t = 3.83$, $p = 0.0003$, Fig. 11A) e IGS ($R^2 = 0.06$, $t = 1.98$, $p = 0.05$, Fig. 11B). Assim, conforme ocorre o aumento da massa corporal de machos e fêmeas, maior tende a ser o volume e massa testicular (para machos), massa ovariana (para

fêmeas) e o IGS (para ambos os sexos). Contudo não houve relação significativa entre o tamanho corporal das fêmeas e o diâmetro dos folículos maduros ($t = 1.61$, $p > 0.05$).

3.3.3 MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE

Machos e fêmeas atingem a maturidade sexual com um ano de vida (1 LAG; Fig. 12A-B), sendo que o macho e a fêmea mais jovem, sexualmente maduros apresentam CRC de 43.71 mm e 41.83 mm, e MC de 9.6 g e 9,9 g, respectivamente. O indivíduo mais velho sexualmente maduro era macho, continha dez LAG's (Fig. 12C), apresentava CRC de 41.92 mm e MC de 11 g. A longevidade variou entre machos e fêmeas. Nos machos, o número máximo de LAG's encontrados foi dez, enquanto que nas fêmeas, o número máximo foram seis (Fig. 12C-D). Entretanto, a média de idade dos indivíduos analisados foi de quatro anos (Fig. 13).

Não houve evidência da influência do CRC e MC no número de LAG's dos indivíduos, tanto para machos ($z = 0.87$, $p > 0.05$; e $z = 0.92$, $p > 0.05$, respectivamente), quanto para fêmeas ($z = -0.178$, $p > 0,05$; e $z = -1.113$, $p > 0.05$, respectivamente). Assim como também não foi encontrada evidência da influência do CRC no diâmetro do canal medular de machos e fêmeas ($t = -0.94$, $p > 0.05$; e $t = -0.51$, $p > 0.05$, respectivamente). Não houve diferença significativa na idade de maturidade sexual entre machos e fêmeas ($F = 0,16$, $p > 0,05$). Contudo, houve diferença significativa no tamanho em que machos e fêmeas atingem a maturidade sexual ($F = 4.45$, $p < 0.05$), já que as fêmeas sexualmente maduras apresentam tamanho corporal (CRC) maior do que os machos sexualmente maduros (Fig. 14).

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 CICLO REPRODUTIVO

A espermatogênese em *O. americanus* segue o padrão temporal de desenvolvimento das células germinativas característico dos anuros. Os túbulos seminíferos apresentam as células germinativas dispostas em espermatocistos ou cistos celulares, sendo que cada cisto apresenta células em um estágio diferente da espermatogênese (BAO et al., 1991; PRADO et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; LEIVAS et al., 2012; CAREZZANO et al., 2013; CURI et al.,

2014; MONTEZOL et al., 2017; LEIVAS et al., 2018; CALDART et al., 2019). A ovogênese em *O. americanus*, como ocorre nos demais anuros, é caracterizada pelo desenvolvimento de ovogônias em folículos ovarianos, os quais amadurecem sequencialmente passando pelo estágio de ovogênese primária, secundária, terciária e quaternária, originando um folículo maduro (OLIVEIRA & SANTOS, 2004; CURTI et al., 2014; PINTO-ERAZO et al., 2016; MONTEZOL et al., 2017; LEIVAS et al., 2018; CALDART et al., 2019)

A presença de espermatozoides livres nos túbulos seminíferos dos machos e folículos maduros nas fêmeas, ao longo de todas as estações do ano, sugere que o ciclo reprodutivo da espécie, para a região sul do Brasil, é potencialmente contínuo (HUANG et al., 1997; FERREIRA et al., 2008; KAPTAN & MURATHANOGLUS, 2008; NORIS & LOPES, 2011; VILLAGRA et al., 2014; MONTEZOL et al., 2017), uma vez que a espécie tem capacidade de se reproduzir ao longo do ano todo, porém apresenta um pico de atividade reprodutiva principalmente nos meses mais quentes (CANAVERO et al., 2008; MANEYRO & CARREIRA, 2012). Tal característica é consistente com a dinâmica de reprodução explosiva da espécie, uma vez que esses indivíduos podem se reproduzir a qualquer momento do ano (GALLARDO, 1963), principalmente após chuvas intensas (MANEYRO & CARREIRA, 2012). Contudo, assim como observado em machos de *Odontophrynus barrioi* (QUIROGA et al., 2018), nosso resultado não corrobora a hipótese de Cei (1949), que sugere que anfíbios fossoriais (e.g. *Odontophrynus*), apresentariam um ciclo espermatogênico descontínuo. Além disso, a produção de gametas ao longo de todo o ano já foi evidenciado em outras populações de *O. americanus* no sul da América do Sul (Argentina: CAREZZANO et al., 2013; Uruguai (VALDEZ & MANEYRO, 2016).

Nesse estudo, utilizou-se de uma estimativa de proporção de células gaméticas, a fim de se obter uma melhor determinação do período reprodutivo e estimativa da produção de gametas masculinos e femininos. A variação encontrada na proporção de gametas ao longo das estações do ano demonstra prevalência de espermatozoides livres nos meses de verão, outono e inverno, e prevalência de ovócitos maduros no verão. Isso possivelmente pode estar relacionado com a variação de fatores ambientais, como precipitação, fotoperíodo e temperatura, visto que a dinâmica reprodutiva da espécie está intimamente relacionada com a precipitação (MANEYRO & CARREIRA, 2012). Além disso, estudos sugerem que temperatura e precipitação são fatores ambientais que podem afetar o ciclo

reprodutivo dos anuros subtropicais (DUELLMAN & TRUEB, 1994; HUANG et al., 1996, PANIAGUA et al., 1990; BOTH et al., 2008; CANAVERO et al., 2009; NORIS & LOPES, 2011).

A ausência de variação sazonal significativa na massa dos testículos e VT dos machos, na massa ovariana das fêmeas, e no IGS de ambos os sexos, vai de acordo com o encontrado para outras espécies de anuros de reprodução contínua (LOFTS, 1974; CALLARD et al., 1978; LEIVAS et al., 2018; CALDART et al., 2019) e pode ser explicada devido à alta frequência de testículos e ovários em maturação sexual avançada, ao longo de todo o ano.

3.4.2 DIMORFISMO SEXUAL E RELAÇÃO TAMANHO-FECUNDIDADE

As fêmeas de *O. americanus* apresentaram valores médios de tamanho corpóreo (CRC e MC), maiores em relação aos machos. Porém, não foi evidenciado dimorfismo sexual de tamanho para a espécie no sul do Brasil, confirmando os resultados encontrados para populações de *O. americanus* da Argentina (GRENART et al., 2012). A ausência de dimorfismo sexual pode indicar ausência de competição física ativa entre machos por meio de encontros agressivos, pois, neste caso, machos apresentariam tamanho corporal maior do que as fêmeas (SHINE, 1979; DUELLMAN & TRUE, 1986; WELLS & SCHWARTZ, 2007). Além disso, a variabilidade de tamanho nos anuros pode ser explicada por diferenças na estrutura etária, taxa de crescimento pós-metamórfico, idade de maturidade sexual e diferenças de sexo na taxa de mortalidade (MONNET & CHERRY, 2002; HASUMI, 2010; SINSCH et al., 2010). Sendo assim, a ausência de dimorfismo sexual de tamanho em *O. americanus* possivelmente esteja associada à ausência de diferenças na idade de maturidade sexual de machos e fêmeas.

Fêmeas de *O. americanus* apresentaram maior investimento reprodutivo (IGS) em comparação aos machos. Em anuros, assim como em todos os animais com crescimento indeterminado, a fecundidade é restringida, principalmente, pelo tamanho corporal (WELLS, 2007). Sendo assim, fêmeas que investem grandes quantidades de recursos em reprodução (i.e. quantidade e tamanho de ovos), conseqüentemente têm menos recursos para alocar em crescimento, o que possibilita, geralmente, a maturidade sexual adiantada (MONNET & CHERRY, 2002; CADEDDU et al., 2012).

Houve relação positiva significativa entre tamanho corporal (MC e CRC) e massa testicular, VT e IGS para machos, assim como entre tamanho corporal e massa ovariana e IGS para fêmeas. Tal resultado corrobora com dados da literatura, que apontam que no geral, existe uma relação positiva entre o tamanho corporal e tamanho das gônadas, e um maior investimento reprodutivo em gônadas, pelas fêmeas. Apesar disso, as relações tamanho-fecundidade costumam ser variáveis entre os anuros (MELCHIORS et al., 2004; CAMARGO et al., 2005; MANEYRO et al., 2008).

3.4.3 MATURIDADE SEXUAL E LONGEVIDADE

Machos e fêmeas de *O. americanus* atingem a maturidade sexual com um ano. Espécies de anuros neotropicais comumente atingem maturidade sexual com dois anos, uma vez que vivem sob sazonalidade climática determinada pela variação no fotoperíodo e temperatura do ar (BOTH et al., 2008; MARANGONI et al., 2011; OTERO et al., 2017; CALDART et al., 2019). Contudo, a idade de maturidade sexual de *O. americanus* é similar ao padrão proposto para anuros tropicais, que, geralmente, atingem a maturidade sexual com um ano (SINSCH & DEHLING, 2017). O clima subtropical na região Sul do Brasil se assemelha aos climas temperados, no que diz respeito a sazonalidade na temperatura, podendo influenciar a maturidade sexual de *O. americanus*. Além disso, outros fatores abióticos podem influenciar a maturidade sexual precoce, como pressão de predação, competição por fêmeas e taxa de crescimento (HINSHAW & SULLIVAN, 1990; HADDAD & BASTOS, 1997; WELLS, 2007; LEIVAS et al., 2012). Considerando que *O. americanus* apresenta taxa de crescimento rápido, esta espécie atinge tamanho mínimo para reprodução cedo quando comparada a espécies de taxa de crescimento lento. Afinal, a maturidade sexual é dependente do tamanho corporal (MORRISON & HERO, 2003).

Geralmente, fêmeas tendem a atingir a maturidade sexual mais tarde, quando comparadas com machos, permitindo a elas um maior investimento em crescimento corporal e gonadal (KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU & GRUMIRO, 2002; EATON et al., 2005; LECLAIR et al., 2005; LIAO et al., 2010; SOCHA & OGIELSKA, 2010; PUENTE et al., 2011; MI, 2015; QUIROGA et al., 2015). E, apesar de não haver diferença na idade em que machos e fêmeas atingem a maturidade sexual, fêmeas

de *O. americanus* apresentam em média tamanho corporal maior do que os machos. Contudo, assim como para *O. americanus*, a maturidade sexual simultânea entre machos e fêmeas também foi evidenciado para outras espécies de anuros (KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU et al., 2008; LÓPEZ et al., 2017; SINCH & DEHLING, 2017; TESSA et al., 2017; BARAQUET et al., 2018; OTERO et al., 2018), incluindo *Odontophrynus cf. barrioi*, na Argentina (QUIROGA et al., 2015).

Machos e fêmeas diferiram quanto a longevidade encontrada. Estudos apontam que a longevidade para várias espécies de anuros tropicais e subtropicais varia entre dois a nove anos (MORRISON et al., 2004; LIAO & LU, 2010), onde machos não ultrapassam a idade máxima de seis anos (MARANGONI et al., 2011; ARANTES et al., 2015; BIONDA et al., 2015; LÓPEZ et al., 2017; OTERO et al., 2017; CALDART et al., 2019), e as fêmeas apresentam longevidade maior (ECHEVERRIA & FILIPELLO, 1990; SINSCH et al., 2001; ARANTES et al., 2015; BIONDA et al., 2015; QUIROGA et al., 2015; OTERO et al., 2017). Contudo, machos de *O. americanus* apresentaram longevidade máxima de dez anos, enquanto as fêmeas apresentaram longevidade máxima de seis anos. A baixa longevidade das fêmeas pode estar relacionada com o alto investimento reprodutivo, uma vez que a quantidade de energia investida em reprodução está negativamente correlacionada com a sobrevivência dos adultos (POUGH et al., 1998). Ademais, a alta alocação de energia em reprodução pode fazer com que as fêmeas se tornem mais vulneráveis à predação (POUGH et al., 1998) o que acarretaria a elas mortalidade anual mais alta do que dos machos (GUARINO et al., 2008).

Apesar de não haver influência do CRC e MC no número de LAG's dos indivíduos, encontramos diferenças entre tamanho e massa corporal de machos e fêmeas após atingirem a maturidade sexual. Machos demonstraram uma pequena variação nesses parâmetros após atingirem a maturidade sexual. Isso possivelmente está relacionado com o fato de que os indivíduos alocam energia em reprodução ao invés de crescimento, ocorrendo, assim, uma diminuição bem marcada na taxa de crescimento após atingirem a maturidade sexual (CAETANO & CASTANET, 1993; GUARINO et al., 2011; SINSCH, 2015). Apenas as fêmeas apresentaram aumento no tamanho e massa corporal após atingirem a maturidade sexual. Isso sugere que o comportamento reprodutivo pode ser energeticamente mais custoso para machos mais velhos, enquanto que as fêmeas alocam mais energia no crescimento somático (WOOLBRIGHT, 1989).

Figura 1. Mapa de distribuição geográfica da espécie *Odontophrynus americanus* (área quadriculada) de acordo com IUCN 2019, evidenciando os pontos de coleta dos espécimes.

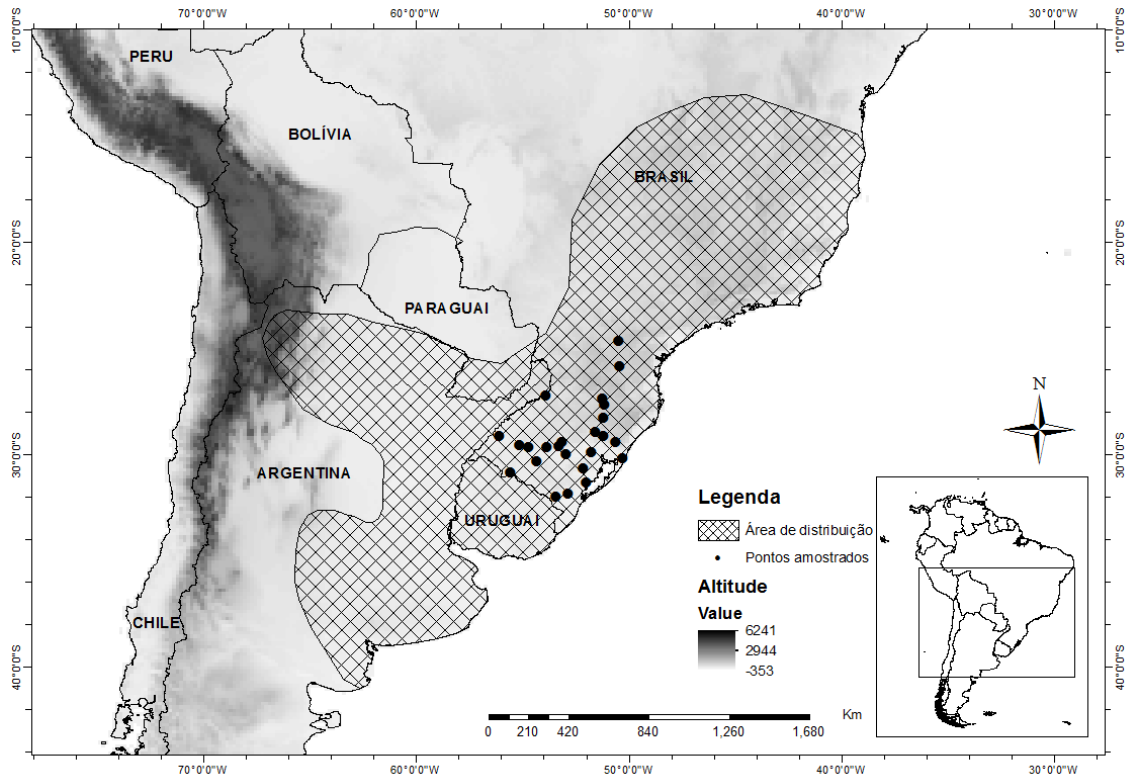


Figura 2. Esquema da secção transversal da falange de *Odontophrynus americanus*. LAG's, linhas de crescimento ósseo; Ed, endóstio; CM, canal medular; Pe, perióstio.

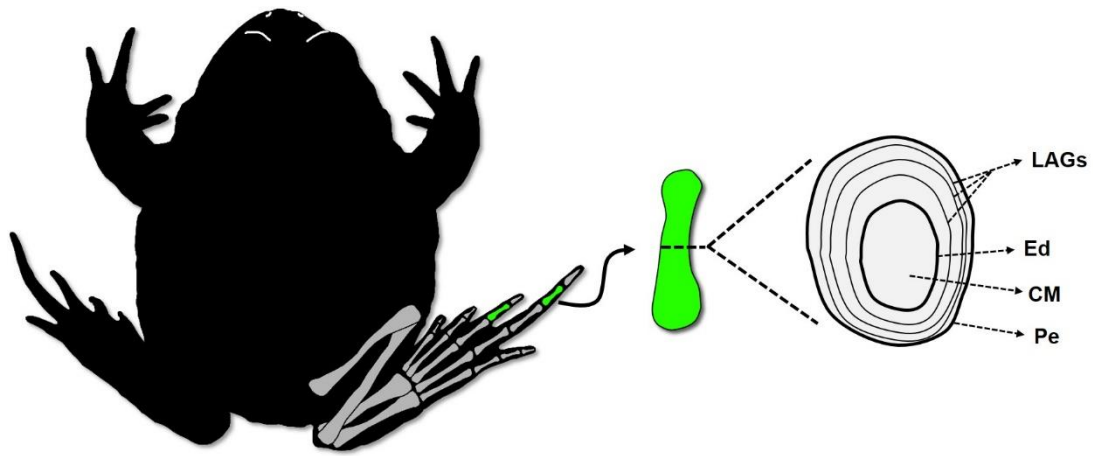


Figura 3. Seção transversal do testículo de *Odontophrynus americanus* evidenciando os túbulos seminíferos que o compõem (destacado em vermelho), e os cistos de celulares em diferentes estágios da espermatogênese. Amarelo, espermatogônia primária; Verde, espermatogônia secundária; Rosa, espermatócito primário; Azul, espermatócito secundário; Laranja, espermatíde primária; Roxo, espermatíde secundária.

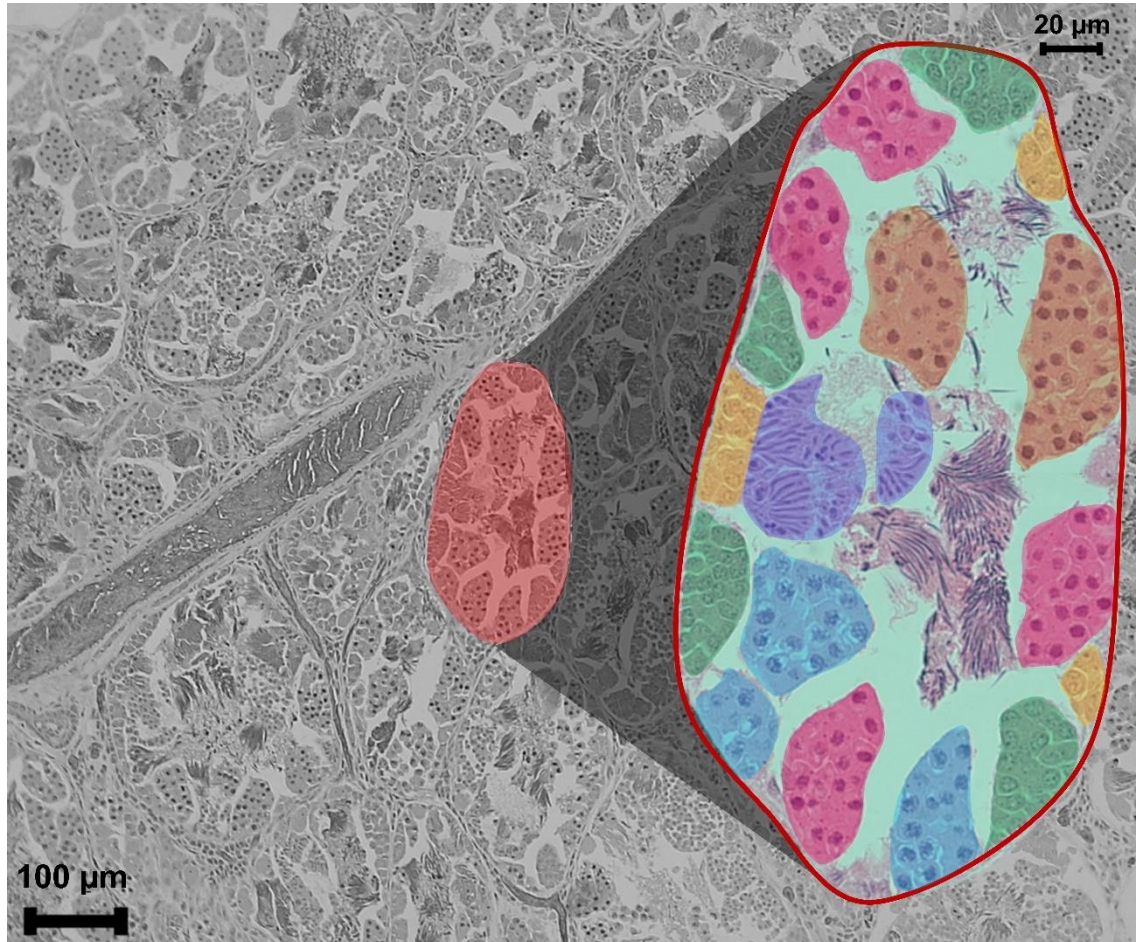


Figura 4. Secção transversal do testículo de *Odontophrynus americanus*, evidenciando um túbulo seminífero. Em destaque, cistos celulares de diferentes linhagens espermatozóica. A, espermatogônias primária; B. espermatogônias secundária; C, espermatócitos primários; D, espermatócitos secundários; E, espermatídes primária; F, espermatídes secundária; G, espermatídes terciária; H, espermatozoides.

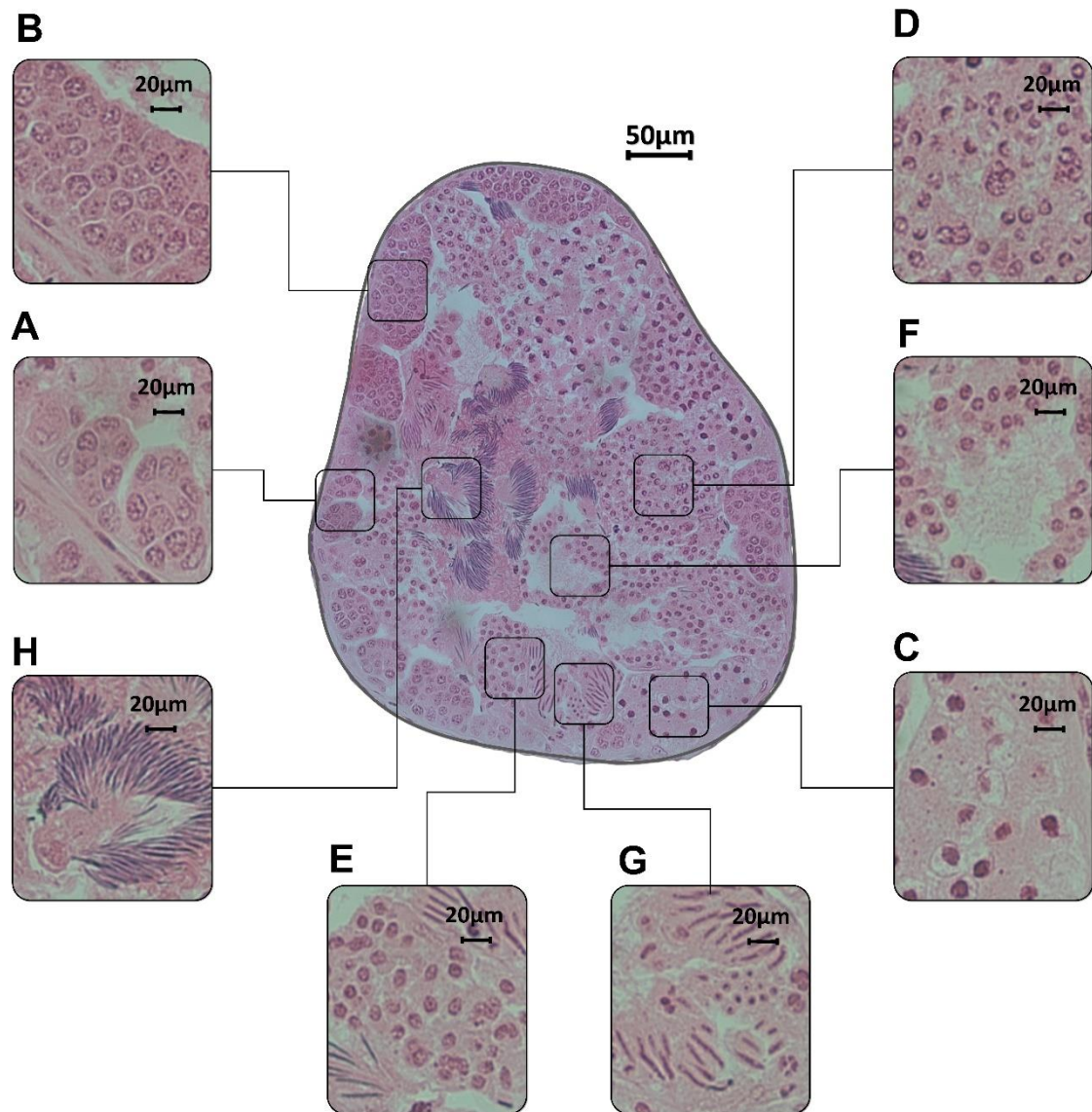


Figura 5. Porcentagem dos estágios da espermatogênese de *Odontophrynus americanus* em cada estação do ano. SPG I, espermatogônias primárias; SPG II, espermatogônias secundárias; SPC I, espermatócitos primários; SPC II, espermatócitos secundários; SPT I, espermatídes primárias; SPT II, espermatídes secundárias; SPT III, espermatídes terciárias; SPZ, espermatozoides.

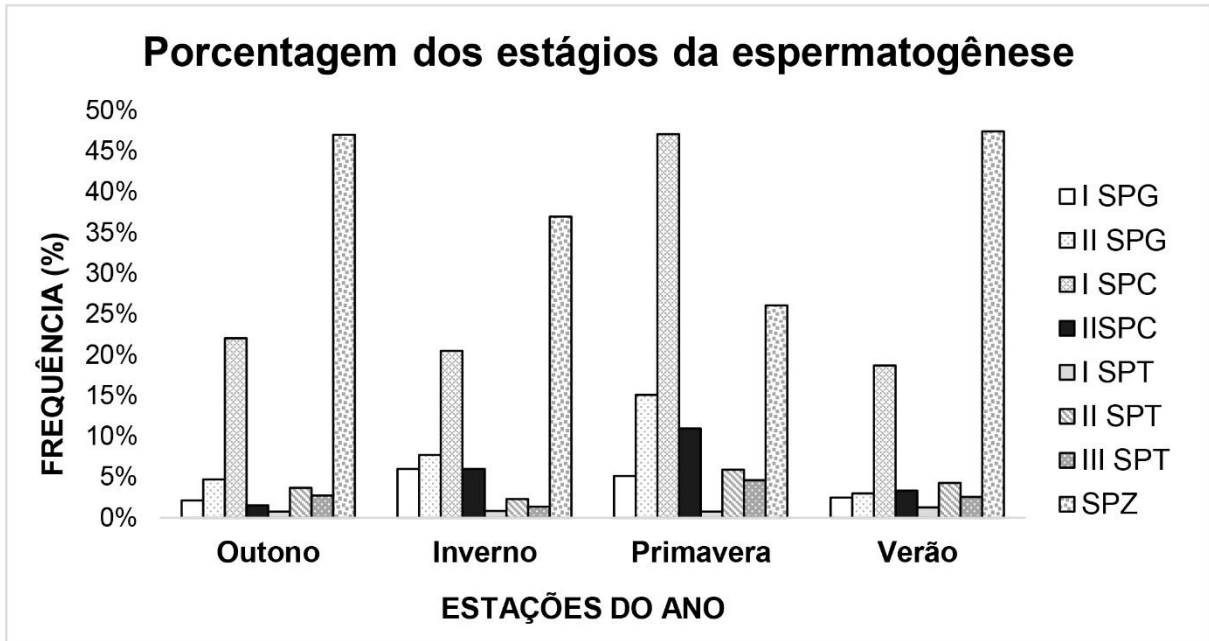


Figura 6. Esquema da extração dos ovários de fêmeas de *Odontophrynus americanus*, evidenciando o preenchimento da cavidade abdominal pelos ovócitos (contorno vermelho). Fgd = fígado; Est = estômago; Ov = ovos; Int = intestino.

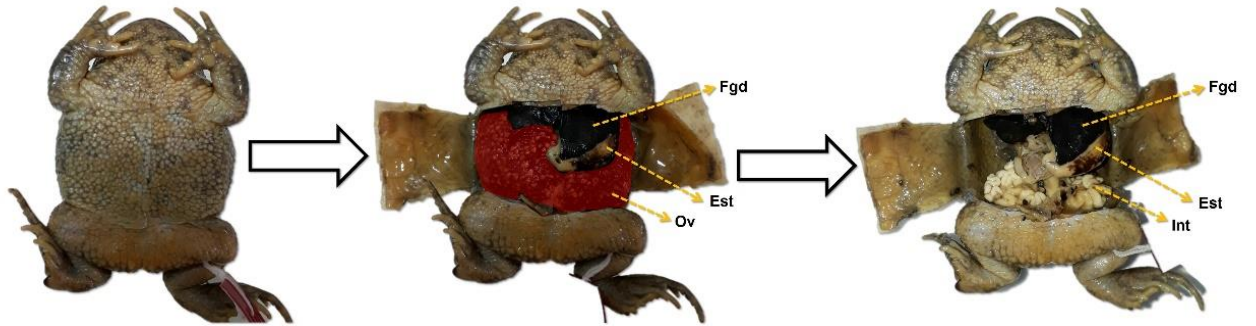


Figura 7. Seção transversal do ovário de *Odontophrynus americanus* evidenciando os estágios da ovogênese. FL I = folículo primário; FL II = folículo secundário; FL III = folículo terciário; FL IV = folículo quaternário.

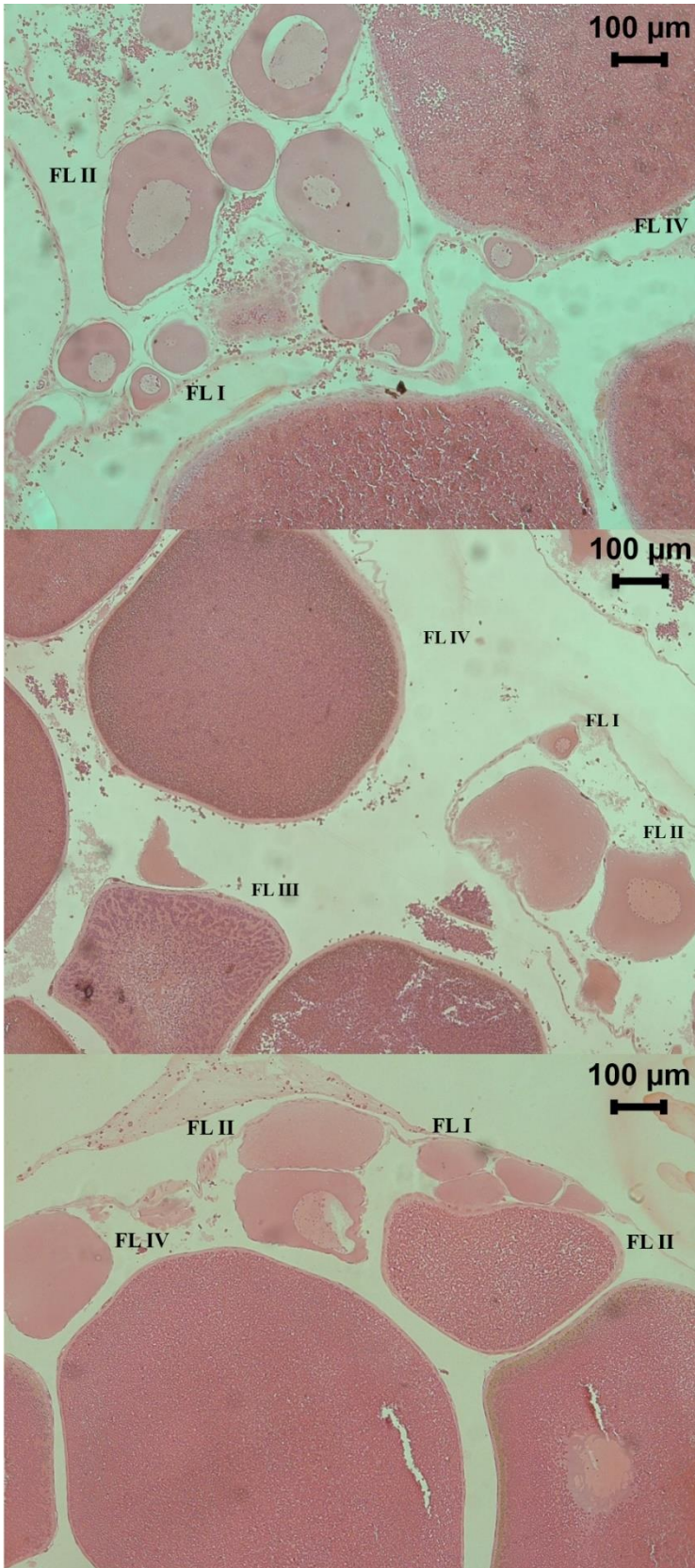


Figura 8. Porcentagem dos estágios da espermatogênese de *Odontophrynus americanus* em cada estação do ano. FL I, folículos primários; FL II, folículos secundários; FL III, folículos terciários; FL IV, folículos quaternários ou folículos maduros.

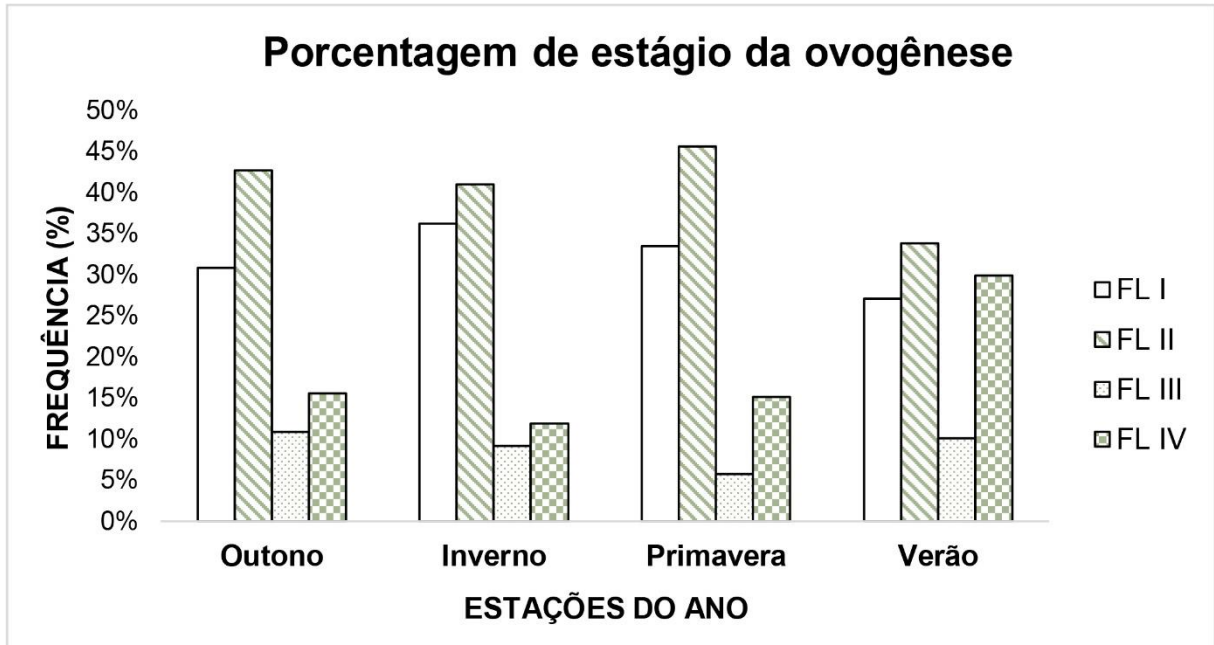


Figura 9. Diferença no índice gonadossomático (IGS) entre machos e fêmeas de *Odontophrynus americanus*. Dados de IGS normalizados (\log_{10}). O boxplot mostra a mediana, o primeiro e terceiro quartil, e os outliers.

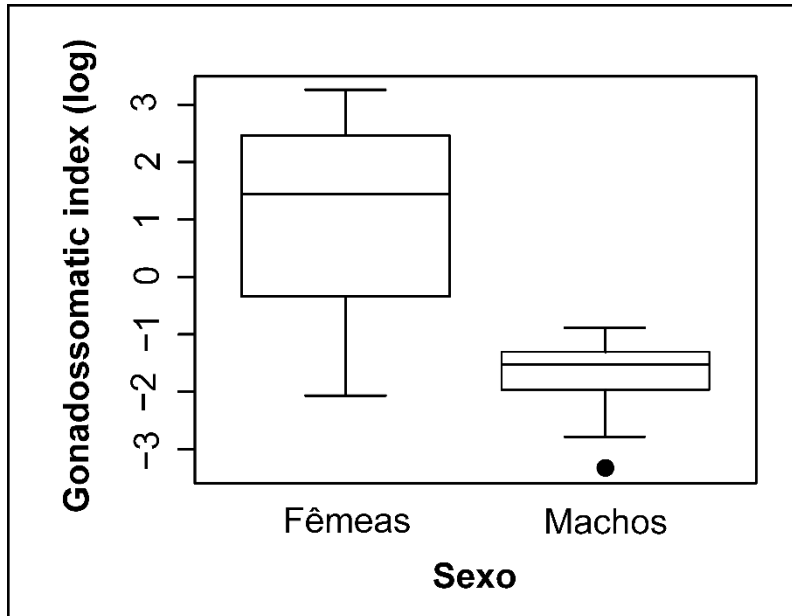


Figura 10. Relação entre massa corporal e (A) volume testicular, (B) massa testicular e (C) índice gonadossomático (IGS) dos machos de *Odontophrynus americanus*. Todos os dados foram normalizados (\log_{10}) para melhor visualização.

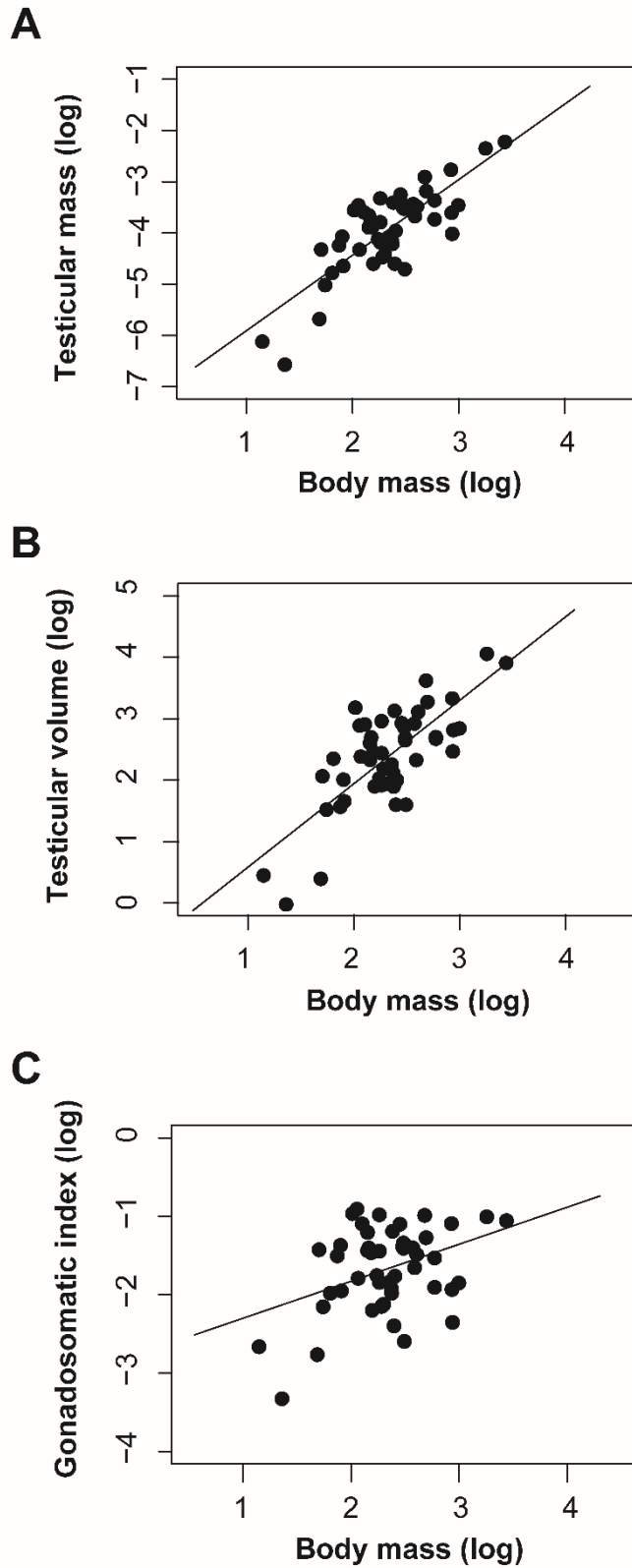


Figura 11. Relação entre Massa corporal e (A) massa do ovário, (B) índice gonadossomático (IGS) das fêmeas de *Odontophrynus americanus*. Todos os dados foram normalizados (\log_{10}) para melhor visualização.

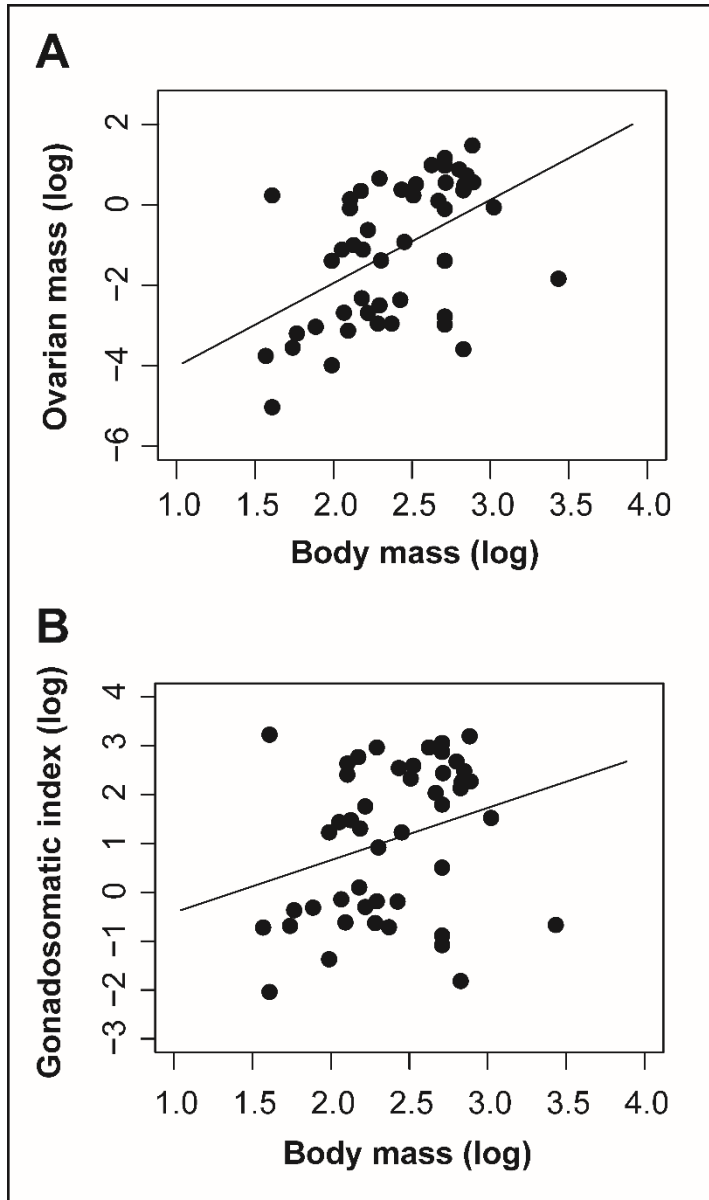


Figura 12. Secção transversal das falanges de *Odontophrynus americanus*., evidenciando a idade de maturidade sexual para (A) machos e (B) fêmeas, ambos com 1 LAG; e a longevidade para (C) machos com 10 LAG's e (D) fêmeas com 6 LAG's. Setas, linhas de crescimento ósseo (LAG's); MC, canal medular; Ed, endósteo; Pe, periósteo.

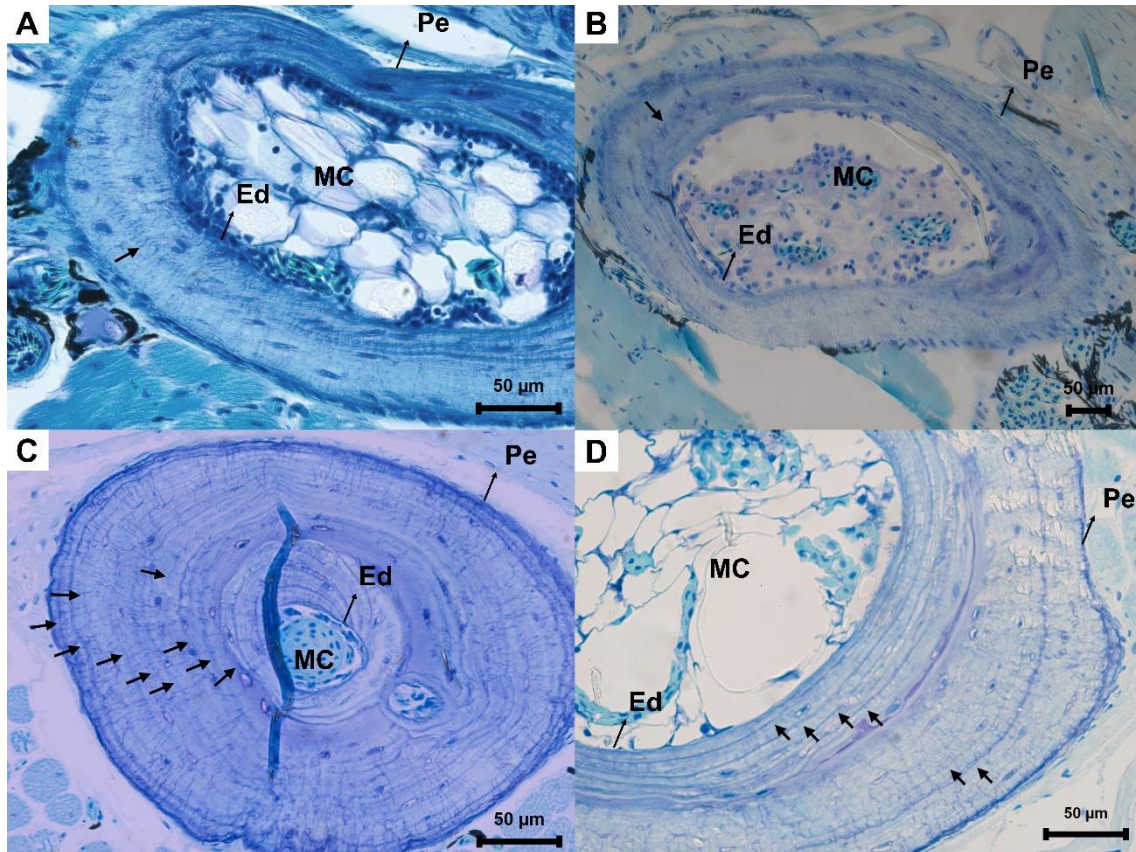


Figura 13. Frequência de distribuição das idades nos machos (barras brancas) e fêmeas (barras cinzas) de *Odontophrynus americanus*.

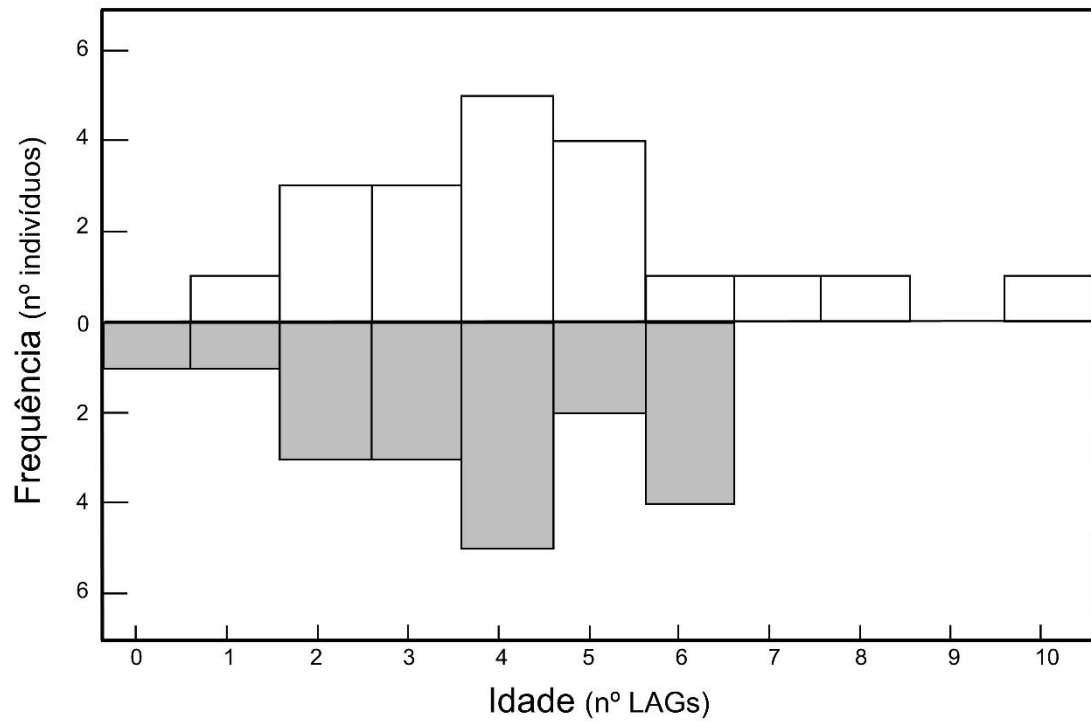


Figura 14. Gráfico evidencia a diferença no comprimento rostro-cloacal (CRC) entre machos e fêmeas de *Odontophrynus americanus*. O boxplot mostra a mediana, o primeiro e terceiro quartil, e os outliers.

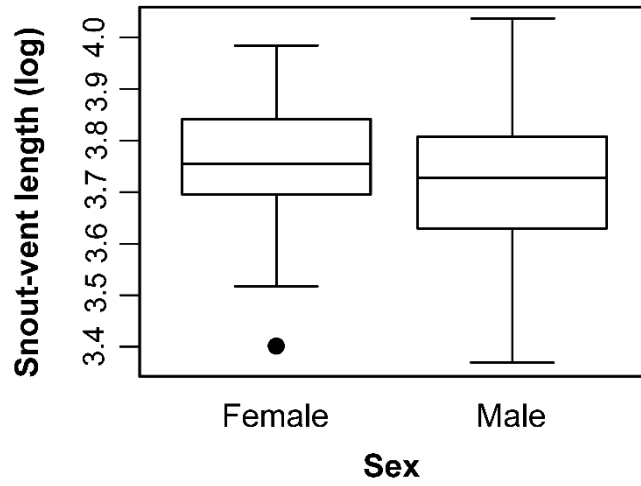


Tabela 1. Medidas dos machos de *O. americanus* no Sul do Brasil

Estação	CRC (mm)	IGS	Massa testicular (g)	VT (mm³)
Verão (A)	40.42±5.77	0.24±0.10 ^{C, D}	0.02±0.01	13.97±9.66
Outono (B)	44.28±7.57	0.20±0.10 ^{C, D}	0.03±0.03	18.35±18.03
Inverno (C)	40.74±3.93	0.18±0.07 ^{A, B}	0.019±0.01	11.36±7.53
Primavera (D)	41.28±5.28	0.21±0.09 ^{A, B}	0.02±0.007	13.66±5.46

CRC, comprimento rostro-cloacal; IGS, índice gonadossomático; VT, volume testicular.

Análise post hoc: diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as estações são indicadas por letras. Cada letra representa uma estação. Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão.

Tabela 2. Medidas das fêmeas de *O. americanus* no Sul do Brasil

Estação	CRC (mm)	IGS	Massa do ovário (g)	Diâmetro folicular (mm)
Verão (A)	41.10±3.15	7.39±6.53 ^{C, D}	0.81±0.71	986.56±158.45
Outono (B)	46.79±3.93	9.06±9.01 ^{C, D}	1.35±1.49	1034.40±184.71
Inverno (C)	40.77±4.92	6.79±8.11 ^{A, B}	0.75±0.87	995.95±143.55
Primavera (D)	44.16±4.87	4.91±5.56 ^{A, B}	0.67±0.82	9906.10±181.27

CRC, comprimento rostro-cloacal; IGS, índice gonadossomático

Análise post hoc: diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as estações são indicadas por letras. Cada letra representa uma estação. Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão.

3.5 REFERÊNCIAS

- ACHAVAL, F.; OLMOS, A. Anfibios y Reptiles del Uruguay. 3º edición. Gaphis, Montevideo, p. 160, 2007.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2014.
- ARANTES, I. C.; VASCONCELLOS, M. M.; BOAS, T. C. V.; VELUDO, L. B. A.; COLLI, G. R. Sexual dimorphism, growth and longevity of two toads species (Anura, Bufonidae) in a Neotropical Savanna. **Copeia**, v. 103, n. 2, p. 329–342, 2015.
- BÁO, S.N.; DALTON, G.C.; De OLIVEIRA, S.F. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): Ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. **Journal of Morphology**, v. 207, p. 303–314, 1991.
- BARAQUET, M.; OTERO, M.A.; VALETTI, J.A.; GRENAT, P.R.; MARTINO, A.L. Age, body size and growth of *Boana cordobae* (Anura: Hylidae) along an elevation gradient in Argentina. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 13, n. 2, p. 391–398, 2018.
- BERTOLUCI, J. Annual patterns of breeding activity in atlantic rainforest anurans. **Journal of Herpetology**, v. 32, n. 4, p. 607–611, 1998.
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M.T. Utilização de habitats reprodutivo e microhabitats de vocalização em uma taxocenose de anuros (Amphibia) da Mata Atlântica do sudeste do Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 42, n. 11, p. 287–297, 2002.
- BIONDA, C. L.; KOST, S.; SALAS, N. E.; LAJMANOVICH, R. C.; SINSCH, U.; MARTINO, A. L. Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. **Acta Herpetologica**, v.10, n.1, p.55–62, 2015.
- BOTH, C.; KAEFER, I. L.; SANTOS, T. G.; CECHIN, S. Z. An austral anuran assemblage in the neotropics: seasonal occurrence correlated with photoperiod. **Journal of Natural History**, v. 42, p. 205–222, 2008.
- CADEDDU, G.; GIACOMA, C.; CASTELLANO, S. Sexual size dimorphism in the Tyrrhenian treefrog: a life-history perspective. **Journal of Zoology**, v. 286, p. 285–292, 2012.
- CAETANO, M. H.; CASTANET, J. Variability microevolutionary patterns in *Triturus marmoratus* from Portugal: age, size, longevity and individual growth. **Amphibia-Reptilia**, v.14, p. 117–129, 1993.

- CALDART, V.M.; LOEBENS, L.; BRUM, A.J.C.; BATAIOLI, L.; CECHIN, S.Z. Reproductive cycle, size and age at sexual maturity, and sexual dimorphism in the stream-breeding frog *Crossodactylus schmidtii* (Hylodidae). **South American Journal of Herpetology**, v.14, n.1, p. 1-11, 2019.
- CALLARD, I.P.; CALLARD, G.V.; LANCE, V.; BOLAFFI, J.L.; ROSSET J.S. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. **Biology of Reproduction**, v. 18, p. 16–43, 1978.
- CAMARGO, A.; NAYA, D. E.; CANAVERO, A.; ROSA, I.; MANEYRO, R. Seasonal activity and the body size–fecundity relationship in a population of *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura, Leptodactylidae) from Uruguay. **Annales Zoological Fennici**, v. 42, p. 513–521, 2005.
- CANAVERO, A.; ARIM, M.; NAYA, D. E.; CAMARGO, A.; da ROSA, I.; MANEYRO, R. Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. **North-Western Journal of Zoology**, v. 4, p. 29–41, 2008.
- CANAVERO, A.; ARIM, M.; BRAZEIRO, A. Geographical variations of seasonality and coexistence in communities: the role of diversity and climate. **Austral Ecology**, v. 34, p. 741–750, 2009.
- CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas Histológicas. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório, p. , -s de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV. Instituto Osvaldo Cruz, v. 2, p.89–188, 2010.
- CAREZZANO, F.; URQUIZA, S.; DORFLINGER, K.; ALONSO, M. Testicular morphology of *Odontophrynus americanus* (Dumeril & Bibrón, 1841)(Anura, Odontophrynidae) of Argentina. **The Biologist**, v. 11, n. 1, p. 119–129, 2013.
- CASTANET, J.; SMIRINA, E. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie**, v. 11, p. 191–196, 1990.
- CASTANET, J.; VIEILLOT, H. F.; MEUNIER, F. J.; RICQLES, A. Bone and individual aging. **Bone** v. 7, p. 245–283, 1993.
- CASTANET, J.; VIEILLOT, H. F.; RICQLES, A.; ZYLBERBERG, L. The skeletal histology of the Amphibia. In: HEATWOLE, H.; DAVIES, M. (Eds.), **Amphibian Biology**, v. 5, p. 1587–1683, 2003.
- CEI, J.M. Generalidades sobre el ciclo sexual y el predominio de la espermatogénesis anual continua en varios batracios de la región chaqueña. **Acta Zoológica Lilloana**, v. 7, p. 527–544, 1949.
- COSTA, L. S. C.; LIMA, S. L.; ANDRADE, D. R.; AGOSTINHO, C. A. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino

da Rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, p. 642–650, 1998.

- CURI, L.M.; OLEA, G.B.; ÁLVAREZ, B.B.; CÉSPEDEZ, J.A.; LOMBARDO, D.M. Reproductive aspects of *Dendropsophus sanborni* (Anura, Hylidae) in northeastern Argentina. **Iheringia Séria Zoologia**, v. 104, n. 2, p. 432–438, 2014.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press. p.670, 1994.
- DUMÉRIL, A.M.C.; BIBRÓN, G. Érpétologie générale ou Histoire Naturelle Complète des reptiles. vol.8. Paris, Library Encyclopedique de Roret, 1841.
- DUNHAM, A. E. Populations in a fluctuating environment: The comparative population ecology of the Iguanid lizards *Sceloporus merriami* and *Urosaurus ornatus*. **Miscellaneous Publication University of Michigan**, v. 158, p. 1–61, 1981.
- EATON, B.R.; PASZKOWSKI, C.A.; KRISTENSEN, K.; HILTZ, M. Life-history variation among populations of Canadian Toads in Alberta, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, p. 1421–1430, 2005.
- ECHEVERRIA, D.D.; FILIPELLO, A.M. Edad y crecimiento em *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). **Cuadernos de Herpetología**, v. 3, n. 5, p.25–31, 1990.
- FERREIRA, A.; MEHANNA, M.; PRADO, C.P.A. Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1862)(Anura, Hylidae) during the reproductive cycle in the Pantanal, Brazil. **Biocell**, v. 32, n. 2, p. 185–194, 2008.
- FERREIRA, A.; ROSA, A.B.S; MEHANNA, M. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 447–452, 2009.
- GALLARDO, J. M. Observaciones biológicas sobre *Odontophrynus americanus* (Duméril & Bribon, 1841). **Ciencia e Investigación**, v. 19, p. 177, 1963.
- GIBBONS, M.M.; MCCARTHY, T.K. Age determination of frogs and toads (Amphibia, Anura) from North-western Europe. **Zoologica Scripta**, v. 12, p. 145–151, 1983.
- GOTTSBERGER, B.; GRUBER, E. Temporal partitioning of reproductive activity in a neotropical anuran. **Journal of Tropical Ecology**, v. 20, n. 3, p. 271–280, 2004.
- GRENAT, P. R.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Variación morfométrica intra e interespecífica entre poblaciones de *Odontophrynus* (Anura: Cycloramphidae) del área central de Argentina. **Revista de Biología Tropical**, v. 60, p. 1589–1601, 2012.
- GUARINO, F. M.; DI GIÀ, I.; SINDACO, R. Age structure in a declining population of *Rana temporaria* from northern Italy. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 54, n. 1, p. 99–112, 2008.

- GUARINO, F. M.; POUS, P.; CROTTINI, A.; MEZZASALMA, M.; ANDREONE, F. Age structure and growth in a population of *Pelobates varaldii* (Anura, Pelobatidae) from northwestern Morocco. **Amphibia-Reptilia**, v. 32, p. 550–556, 2011.
- HADDAD, C. F. B.; BASTOS, R. P. Predation on the toad *Bufo crucifer* during reproduction (Anura; Bufonidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 18, p. 295–298, 1997.
- HASUMI, M. Age, body size and sexual dimorphism in size and shape in *Salamandrella keyserlingii* (Caudata: Hynobiidae). **Evolutionary Biology**, v. 37, p. 38–48, 2010.
- HINSHAW, S.H.; SULLIVAN, B.K. Predation on *Hyla versicolor* and *Pseudacris crucifer* during reproduction. **Journal of Herpetology**, v. 24, p. 196–197, 1990.
- HSU, F.H.; HSIEH, Y.S.; WU, S.H.; KAM, Y.C. Altitudinal variation in body size and age structure of the sauter's frog *Rana sauteri* in Taiwan. **Zoological Studies**, p. 53–62, 2014.
- HUANG, W.S.; LIN, J.Y.; YU, J.Y L. The male reproductive cycle of the toad, *Bufo bankorensis*, in Taiwan. **Zoological Studies**, v. 35, p. 128–137, 1996.
- HUANG W.; LIN J.; YU J.Y. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. **Zoological Science** v. 14, n. 3, p. 497–503, 1997.
- IUCN 2019. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1. <<https://www.iucnredlist.org>>
- JØRGENSEN, C. B., SHAKUNTALA, K.; VIJAYAKUMAR, M. Body, reproduction and growth in a tropical toad, *Bufo melanostictus*, with a comparison of ovarian cycles in tropical and temperate zone anurans. **Oikos**, v. 46, p. 379–389, 1986.
- KAPTAN, E.; MURATHANOGLU, O. Annual morphological cycles of testis and thumb pad of the male frog (*Rana ridibunda*). **The anatomical record**, v. 291, p. 1106–1114, 2008.
- KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU, P.; GRUMIRO, I. Body size and age assessment among breeding populations of the tree frog *Hyla arborea* in northern Greece. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 219–224, 2002.
- KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU, P.; STYLIANOU, P.; TSIORA, A. A skeletochronological study of age, growth and longevity in a population of the frog *Rana ridibunda* from southern Europe. **Zoology**, v. 111, p. 30–36, 2008.
- KWET, A.; DI-BERNARDO, M. Pró-Mata. Anfíbios – Amphibien - Amphibians. Porto Alegre, EDIPUCRS. 107p, 1999.
- LECLAIR, M.H.; LECLAIR JR, R.; GALLANT, J. Application of skeletochronology to a population of *Pelobates cultripes* (Anura: Pelobatidae) from Portugal. **Journal of Herpetology**, v. 39, n. 2, p. 199–207, 2005.

- LEIVAS, O.T.; MOURA, M.O.; FÁVARO, L.F. The reproductive biology of the invasive *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Anura). **Journal of Herpetology**, v.46, n. 2, p. 153–161, 2012.
- LEIVAS, P.T.; MAYER, T.B.; FÁVARO, L.F. The reproductive biology of *Dendropsophus minutus* (Amphibia: Anura) in south of Brazil. **Herpetology Notes**, v. 11, p. 395–403, 2018.
- LI, C.; LIAO, W.B.; YANG, Z.S.; ZHOU, C.Q. A skeletochronological estimation of age structure in a population of the Guenther's frog, *Hylarana guentheri*, from western China. **Acta Herpetologica**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2010.
- LIAO, W.B. A skeletochronological estimate of age in a population of the Siberian wood frog, *Rana amurensis*, from northeastern China. **Acta Herpetologica**, v. 6, n. 2, p. 237–247, 2011.
- LIAO, W.B.; LU, X. Age and growth of a subtropical high-altitude torrent frog *Amolops mantzorum* in western China. **Journal of Herpetology**, v. 44, p. 172–176, 2010.
- LIAO, W.B.; ZHOU, C.Q.; YANS, Z.S.; HU, J.C.; LU, X. Age, size and growth in two populations of the dark-spotted frog *Rana nigromaculata* at different altitudes in southwestern China. **Herpetological Journal**, v. 20, p. 77–82, 2010.
- LOFTS, B. Reproduction. Pp. 107–218, in Lofts B. (Ed.), *Physiology of amphibians*, Academic Press, New York, 1974.
- LÓPEZ, J. A.; ANTONIAZZI, C. E.; LLANES, R. E.; GHIRARDI, R. Age structure, growth pattern, sexual maturity, and longevity of *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) in temperate wetlands. **Amphibia-Reptilia**, v. 38, p. 371–379, 2017.
- MANEYRO, R.; CARREIRA, S. *Guía de anfibios del Uruguay*. **Ediciones de la Fuga**. Montevideo, p. 207, 2012.
- MANEYRO, R.; NÚÑEZ, D.; BORTEIRO, C.; TEDROS, M.; KOLENC, F. Advertisement call and female sexual cycle in Uruguayan populations of *Physalaemus henselii* (Anura, Leiuperidae). **Iheringia Série Zoologia**, v. 98, p. 210–214, 2008.
- MARANGONI, F.; BARRASSO, D. A.; CAJADE, R.; AGOSTIN, G. Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) from Argentina. **North-Western Journal of Zoology**, v. 8, n. 1, p. 36–71, 2011.
- MELCHIORS, J.; DI-BERNARDO, M.; PONTES, G. M. F.; OLIVEIRA, R. B.; SOLÉ, M.; KWET, A. Reprodução de *Pseudis minuta* (Anura, Hylidae) no sul do Brasil. **Phyllomedusa**, v. 31, p. 61–68, 2004.
- MI, Z. P. Age structure and body size in a breeding population of asiatic toad (*Bufo gargarizans*) in southwestern China. **North-Western Journal of Zoology**, v. 11, n. 1, p. 178–182, 2015.

- MIDDLETON, J.; GREEN, D. M. Adult age-structure variability in an amphibian in relation to population decline. **Herpetologica**, v. 71, n. 3, 2015.
- MONNET, J.M.; CHERRY, M.I. Sexual size dimorphism in anurans. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 269, p. 2301–2307, 2002.
- MONTEZOL, M.; CASSEL, M.; SILVA, D.; FERREIRA, A.; MEHANNA, M. Gametogenesis and reproductive dynamics of *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae): influence of environmental and anthropogenic factors. **Acta Zoologica**, p. 1–12, 2017.
- MORRISON, C.; HERO, J.M. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: A review. **Journal of Animal Ecology**, v. 72, n. 2, p. 270–279, 2003.
- MORRISON, C.; HERO, J. M.; BROWNING, J. Altitudinal variation in the age at maturity, longevity and reproductive lifespan of anurans in subtropical Queensland. **Herpetologica**, v. 60, n. 1, p. 34–44, 2004.
- NORIS, D.O.; LOPEZ, K.H. **Hormones and reproduction of vertebrates**. Volume 2: Amphibians. 1 ed. London, 2011, 247 p.
- OLIVEIRA, C.; SANTOS, L. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 919–923, 2004.
- OROMI, N.; PUJOL-BUXÓ, E.; SEBASTIÁN, O. S.; LLORENTE, G. A.; HAMMOU, M. A.; SANUY, D. Geographical variations in adult body size and reproductive life history traits in an anuran, *Discoglossus pictus*. **Zoology**, v. 119, p. 216–223, 2016.
- OTERO, M.; BARAQUET, M.; POLLO, F.; GRENAT, P.; SALAS, N.; MARTINO, A. Sexual size dimorphism in relation to age and growth in *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) from Córdoba, Argentina. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 12, p. 141–148, 2017.
- OTERO, M.; BARAQUET, M.; POLLO, F.; GRENAT, P.; SALAS, N.; MARTINO, A. Differential effects on life history traits and body size of two anuran species inhabiting an environment related to flurite mine. **Ecological Indicator**, v. 93, p. 36–44, 2018.
- OVERBECK, G.E.; MÜLLER, S.C.; FIDELIS, A.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V.D.; BLANCO, C.C.; ... AND FORNECK, E.D. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 9, p. 101–116, 2007.
- PANIAGUA, R.; FRAILE, B.; SÁEZ, F.J. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. **Histology and Histopathology**, v. 5, p. 365–378, 1990.

- PINTO-ERAZO, M.A.; GOLDBERG, J.; JEREZ, A. Gonadal development in the neotropical high andean frog *Dendropsophus labialis* (Amphibia: Hylidae). **Cuadernos de Herpetologia**, v. 30, n. 2, p. 57–68, 2016.
- POUGH, F.H.; ANDREWS, M.M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H.; WELLS, K.D. Herpetology. New York: Prentice Hall, p. 544, 1998.
- PRADO, C.P.A.; HADDAD, C.F.B. Size-fecundity relationships and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, south-western Brazil. **Herpetological Journal**, v. 15, p. 181–189, 2005.
- PRADO, C.P.A.; ABDALLA, F.C.; SILVA, A.P.; ZINA, J. Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological considerations. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 4, p. 177–184, 2004.
- PUDNEY J. Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v. 32, n. 6, p. 459–497, 1995.
- PUENTE, V. S.; GOSÁ, A.; OROMI, N.; MADEIRA, M. J.; LIZANA, M. Growth, size and age at maturity of the agile frog (*Rana dalmatina*) in a Iberian Peninsula population. **Zoology**, v.114, p. 150–154, 2011.
- QUIROGA, L.B.; SANABRIA, E.A.; MARANGONI, F. Sexual size dimorphism and age in *Odontophrynus cf. barrioi* (Anura: Odontophrynidae) from the monte desert, Argentina. **Journal of Herpetology**, v. 49, n. 4, p. 627–632, 2015.
- QUIROGA, L.B.; SANABRIA, E.A.; JAHN, G.; FORNÉS, M. Spermatogenic and testosterone cycles in a desert-adapted amphibian *Odontophrynus barrioi* from Monte Desert, Argentina. **Journal of Herpetology**, v. 52, n. 1, p. 12–18, 2018.
- R CORE TEAM (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2018.
- RASTOGI, R. K.; IELA, L.; SAXENA, P. K.; CHIEFFI, G. The control of spermatogenesis in the Green frog, *Rana esculenta*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 196, p. 151–166, 1976.
- RASTOGI, R. K., IELA, L., DI MEGLIO, M., DI MATTEO, L., MINUCCI, S.; I., IZZO-VITIELLO. Initiation and kinetic profiles of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta* (Amphibia). **Journal of Zoology** (London), v. 201, p. 515–525, 1983.
- ROZENBLUT, B.; OGIELSKA, M. Development and growth of long bones in European water frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), with remarks on age determination. **Journal of Morphology**, v. 265, p. 304–317, 2005.
- SANTOS, L. R. S.; OLIVEIRA, C. Histological aspects and structure characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). **Micron**, v. 39, p. 1266–1270, 2008.

- SANTOS, T. G.; KOOP, K. SPIES, M. R.; TREVISAN, R.; CECHIN, S. Z. Distribuição temporal e espacial de anuros em área de Pampa, Santa Maria, RS. **Iheringia**, v. 98, p. 244–153, 2008.
- SHINE, R. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. **Copeia**, v. 2, p. 297–306, 1979.
- SINSCH, U. Review: skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. **Herpetological Journal**, v. 25, p. 5–13, 2015.
- SINCH, U.; DI TADA, I.E.; MARTINO, A.L. Longevity, demography and sex-specific growth of the Pampa de achala toada, *Bufo achalensis* CEI, 1972. **Studies on Neotropical Fouona and Environment**, v. 36, n. 2, 95–104, 2001.
- SINSCH, U.; MARANGONI, F.; OROMI, N.; LESKOVAR, C.; SANUY, D.; TEJEDO, M. Proximate mechanisms determining size variability in natterjack toads. **Journal of Zoology**, v. 81, p. 272–281, 2010.
- SINSCH, U.; DEHLING, J.M. Tropical anurans mature early and die young: Evidence from eight Afromontane Hyperolius species and a meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171666, 2017.
- SOCHA, M.; OGIELSKA, M. Age structure, size and growth rate of water frogs from central European natural *Pelophylax ridibundus* – *Pelophylax esculentus* mixed populations estimated by skeletochronology. **Amphibia-Reptilia**, v. 31, p. 239–250, 2010.
- TESSA, G.; CROTTINI, A.; GIACOMA, C.; GUARINO, F.B.; RANDRIANIRINA, J.E.; ANDREONE, F. Comparative longevity and age at sexual maturity in twelve rainforest frogs of the genus *Boophis*, *Geophyromantis*, and *Mantidactylus* (Anura: Mantellidae) from Madagascar. **Phyllomedusa**, v. 16, n. 1, p. 13–21, 2017.
- VALDEZ, V.; MANEYRO, R. Reproductive biology of *Odontophrynus americanus* females (Duméril & Bibron, 1841)(Anura, Cycloramphidae) from Uruguay. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 11, n. 3, p. 188–197, 2016.
- VILLAGRA, A.L.I.; CISINT, S.B.; CRESPO, C.A.; MEDINA, M.F.; RAMOS, I.; FERNANDÉZ, S.N. Spermatogenesis in *Leptodactylus chaquensis*. Histological study. **Zygote**, v. 22, p. 291–299, 2014.
- WELLS, K. D. The social behavior of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 25, p. 666-693, 1977.
- WELLS, K. D. The Ecology and Behavior of Amphibians. Chicago and London, USA, **The University of Chicago Press**, 2007.

WELLS, K.D.; SCHWARTZ, J.J. The behavioral ecology of anuran communication. In: Narins P.; Feng A. S.; Fay R. R. (Eds.), **Hearing and sound communication in amphibians**. Springer, New York: p. 44–86, 2007.

WREGE, M. S.; STEINMETZ, S.; REISSER-JUNIOR, C.; ALMEIDA, I.D. Atlas climático da Região Sul do Brasil: estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Pelotas, Embrapa Clima Temperado**, v.2, p. 334, 2012.

WOOLBRIGHT, L.L. Sexual dimorphism in *Eleutherodactylus coqui*: selection pressures and growth rates. **Herpetologica**, v. 45, p. 68–74, 1989.

3.6 APÊNDICE 1.

Número tombo dos espécimes de *Odontophrynus americanus* analisados.

Universidade Federal e Santa Maria (ZUFSM): ZUFSM0001, ZUFSM0130, ZUFSM11088, ZUFSM11098, ZUFSM11203, ZUFSM11211, ZUFSM11242, ZUFSM11505, ZUFSM1490, ZUFSM1534, ZUFSM1623, ZUFSM1925, ZUFSM2258, ZUFSM2491, ZUFSM2492, ZUFSM2495, ZUFSM2855, ZUFSM3039, ZUFSM4291, ZUFSM4462, ZUFSM4463, ZUFSM4464, ZUFSM4520, ZUFSM4522, ZUFSM4523, ZUFSM4524, ZUFSM4726, ZUFSM4795, ZUFSM5534, ZUFSM6002, ZUFSM6054, ZUFSM6314, ZUFSM8447, ZUFSM9123, ZUFSM9124, ZUFSM9125, ZUFSM9177, ZUFSM9208, ZUFSM9216, ZUFSM9278, ZUFSM9320, ZUFSM9324, ZUFSM9343, ZUFSM9351, ZUFSM9419, ZUFSM9471, ZUFSM9472, ZUFSM9473, ZUFSM9480, ZUFSM9481, ZUFSM9506, ZUFSM9537, ZUFSM9538, ZUFSM9540, ZUFSM9720, ZUFSM9745, ZUFSM9746, ZUFSM9747, ZUFSM9759, ZUFSM9906, ZUFSM9907, ZUFSM9908, ZUFSM9948, ZUFSM9951, ZUFSM9952, ZUFSM9953, ZUFSM9954, ZUFSM9955.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP): MCP1072, MCP11098, MCP11248, MCP11284, MCP12603, MCP12605, MCP1614, MCP3660, MCP4064, MCP4065, MCP4066, MCP4515, MCP8986, MCP9183, MCP9184, MCP9397, MCP9435, MCP9440, MCP9909.

Fundação Zoobotânica (FZB): FZB2532, FZB4277, FZB4433, FZB5492, FZB6001.

Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS): UNISINOS0400.

4. CONCLUSÕES

- O ciclo reprodutivo de *Odontophrynus americanus* para a região sul do Brasil é potencialmente contínuo, sendo caracterizado pela capacidade de machos e fêmeas produzirem gametas ao longo de todas as estações do ano;
- Fêmeas de *O. americanus* apresentam maior tamanho corporal e investimento reprodutivo em comparação aos machos, provavelmente associados à seleção para fecundidade;
- Machos e fêmeas de *O. americanus* atingem maturidade sexual com um ano de idade, assemelhando-se ao padrão observado para anuros tropicais, uma vez que o clima subtropical na região Sul do Brasil é caracterizado pela sazonalidade na temperatura;
- Machos de *O. americanus* tem longevidade de dez anos, enquanto fêmeas vivem até seis anos. Esse padrão difere do esperado para anuros, onde machos tendem a viver menos que as fêmeas. Provavelmente a baixa longevidade encontrada para as fêmeas se deve ao esforço reprodutivo e a possível alta taxa de predação, que acarretaria às fêmeas mortalidade anual mais alta do que os machos.

5. REFERÊNCIAS

- ACHAVAL, F.; OLMOS, A. **Anfibios y Reptiles del Uruguay**. 3º edición. Gaphis, Montevideo, p. 160, 2007.
- ANDREONE, F.; GIACOMA, C.; GUARINO, F. M.; MERCURIO, V.; TESSA, G. Age profile in nine *Mantella* poison frogs from Madagascar, as revealed by skeletochronological analyses. **Alytes**, 27, n. 3, p. 73–84, 2011.
- ARANTES, I. C.; VASCONCELLOS, M. M.; BOAS, T. C. V.; VELUDO, L. B. A.; COLLI, G. R. Sexual dimorphism, growth and longevity of two toads species (Anura, Bufonidae) in a Neotropical Savanna. **Copeia**, v. 103, n. 2, p. 329–342, 2015.
- AVENS, L.; TAYLOR, C. J.; GOSHE, L. R.; JONES, T. T.; HASTINGS, M. Use of skeletochronological analysis to estimate the age of leatherback sea turtles *Dermochelys coriacea* in the western North Atlantic. **Endangered Species Research**, v. 8, p. 165–177, 2009.

- BASTOS, R.P.; HADDAD, C.F.B. Atividade reprodutiva de *Scinax rizibilis* (Bokermann) (Anura:Hylidae) na Floresta Atlântica, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 409–421, 1999.
- BEÇAK, M. L.; BEÇAK, W.; RABELLO, M. N. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frog *Odontophrynus americanus*. **Chromosoma**, v. 19, p. 188–193, 1966.
- BEÇAK, M. L.; BEÇAK, W.; VIZOTTO, L. D. A diploid population of the polyploid amphibian *Odontophrynus americanus* and the artificial intraspecific triploid hybrid. **Experientia**, v. 26, p. 545–546, 1970.
- BIONDA, C. L.; KOST, S.; SALAS, N. E.; LAJMANOVICH, R. C.; SINSCH, U.; MARTINO, A. L. Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. **Acta Herpetologica**, v.10, n.1, p.55–62, 2015.
- BOTH, C.; KAEFER, I. L.; SANTOS, T. G.; CECHIN, S. Z. An austral anuran assemblage in the neotropics: seasonal occurrence correlated with photoperiod. **Journal of Natural History**, v. 42, p. 205–222, 2008.
- BOTHA, J.; A. CHINSAMY. Growth patterns deduced from the bone histology of the Cynodonts *Diamodon* and *Cynognathus*. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 20, p. 705–711, 2000.
- BOURDON, E.; CASTANET, J.; DE RICQLES, A.; SCOFELD, P.; TENNYSON, A.; LAMROUS, H.; CUBO, J. Bone growth marks reveal protracted growth in New Zealand kiwi (Aves, *Apterygidae*). **Biology Letters** v. 5, p. 639–642, 2009.
- CANAVERO, A.; ARIM, M.; NAYA, D. E.; CAMARGO, A.; da ROSA, I.; MANEYRO, R. Calling activity patterns in na anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. **North-Western Journal of Zoology**, v. 4, p. 29–41, 2008.
- CASTANET, J.; SMIRINA, E. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie**, v. 11, p. 191–196, 1990.
- CASTANET, J.; VIEILLOT, H. F.; MEUNIER, F. J.; RICQLES, A. Bone and individual aging. **Bone**, v. 7, p. 245–283, 1993.
- CASTANET, J.; VIEILLOT, H. F.; RICQLES, A.; ZYLBERBERG, L. The skeletal histology of the Amphibia. In: HEATWOLE, H.; DAVIES, M. (Eds.), **Amphibian Biology**, v. 5, p. 1587–1683, 2003.
- CEI, J. M. Additional notes to Amphibians of Argentina: An update, 1980-1986. **Monitore Zoologico Italiano - Italian Journal of Zoology**, v. 21, p. 209–272, 1987.

- CRUMP, M. L. Reproductive strategies in a tropical anuran community. University of Kansas Museum of Natural History Miscellaneous Publications v.61, p. 1-66. **The American Naturalist**, v. 117, p. 724–737, 1974.
- CRUMP, M. L. Variation in propagule size as a function of environmental uncertainty for tree frogs. **The American Naturalist** v. 117, p. 724–737, 1981.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press. p.670, 1994.
- DUMÉRIL, A.M.C.; BIBRÓN, G. *Érpetologie générale ou Histoire Naturelle Complète des reptiles*. vol.8. Paris, Library Encyclopedique de Roret, 1841.
- ESTEBAN, M.; SÁNCHEZ-HERRÁIZ, M.J.; BARBADILLO, L.J.; CASTANET, J.; MÁRQUEZ, R. Effects of age, size and temperature on the advertisement calls of two Spanish populations of *Pelodytes punctatus*. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 249–258, 2002.
- EZCURRA, M. D. A new early coelophysoid neotheropod from the late Triassic of northwestern Argentina. **Ameghiniana** v. 54, p. 506–538, 2017.
- FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 5.5, American Museum of Natural History, Nueva York, EEUU, 2011.
- GOSHE, L. R.; AVENS, L.; SCHARF, F. S.; SOUTHWOOD, A. L. Estimation of age maturation and growth of Atlantic green turtles (*Chelonia mydas*) using skeletochronology. **Marine Biology**, v. 157, n. 8, p. 1725–1740, 2010.
- GUSTAFSON, K.; NEWMAN, R. A.; PULIS, E. E.; CABARLE, K. C. A skeletochronological assessment of age-parasitism relationships in wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). **Journal of Herpetology**, v. 79, n. 1, p. 122–130, 2015.
- HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. **Guia dos anfíbios da Mata Atlântica - Diversidade e Biologia**. São Paulo, BR, Anolis Books, 2013.
- HALLIDAY, T. R.; VERRRELL, P. A. Body size and age in amphibians and reptiles. **Journal of Herpetology**, v. 22, p. 253–265, 1988.
- HAN, X.; FU, J.Z. Does life history shape sexual size dimorphism in anurans? A comparative analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 1–11, 2013.
- HEMELAAR, A. S. M. An improved method to estimate the number of year rings resorbed in phalanges of *Bufo bufo* and its application to populations from different latitudes and altitudes. **Amphibia-Reptilia**, v.6, p. 323–342, 1985.
- HIERT, C.; ROPER, J. J.; MOURA, M. O. Constant breeding and low survival rates in the subtropical Striped Frog in southern Brazil. **Journal of Zoology** v. 288, p. 151–158, 2012.

- ITURRA-CID, M.; ORTIZ, J. C.; IBARGÜENGOYTÍA, N. R. Age, size, and growth of the Chilean frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leiuperidae): latitudinal and altitudinal effects. **Copeia**, v. 4, p.609–617, 2010.
- JIN, L.; CHEN, C.; LIAO, W. B. Altitudinal variation in body size and age in male spotted treefrog (*Polypedates megacephalus*). **Russian Journal of Ecology**, v. 48, p.476–481, 2017.
- JØRGENSEN, C. B., SHAKUNTALA, K.; VIJAYAKUMAR, M. Body, reproduction and growth in a tropical toad, *Bufo melanostictus*, with a comparison of ovarian cycles in tropical and temperate zone anurans. **Oikos**, v. 46, p. 379–389, 1986.
- KHONSUE, W.; MATSUI, M.; MISAWA, Y. Age determination by skeletochronology of *Rana nigrovittata*, a frog from tropical forest of Thailand. **Zoological Science**, v. 17, p. 253–257, 2000.
- KUMBAR, S. M.; PANCHARATNA, K. Occurrence of growth marks in the cross sections of phalanges and long bone of limbs in tropical anurans. **Herpetological Review**, v. 32, p. 165–167, 2001.
- KUPFER, A. Sexual size dimorphism in amphibians: an overview, p. 50–59. In: Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism. D. J. Fairbairn, W. U. Blanckenhorn, and T. Székely (eds). Oxford University Press, Oxford, 2007.
- KUSRINI, M. D.; ALFORD, R. A. The application of skeletochronology to estimate ages of three species of frogs in West Java. **Indonesia Herpetological Review**, v. 37, p. 423–425, 2006.
- KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU, P.; STYLIANOU, P.; TSIORA, A. A skeletochronological study of age, growth and longevity in a population of the frog *Rana ridibunda* from southern Europe. **Zoology**, v. 11, p. 30–36, 2007.
- LANGONE, J. A. **Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos)**. Museo Damaso Antonio Larrañaga, Serie de Divulgación, n. 5, p. 1–123, 1994.
- LEIVAS, P. T.; MOURA, M. O.; FAVARO, L. F. The Reproductive Biology of the Invasive *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Anura). **Journal of Herpetology**, v. 46, n. 2, p. 153–161, 2012.
- LIAO, W. B.; LU, X. A skeletochronological estimative of age and body size by the Sichuan torrent frog (*Amolops mantzorum*) between two populations at different altitudes. **Animal Biology**, v. 60, p. 479–489, 2010a.
- LIAO, W.B.; LU, X. Age structure and body size of the chuanxi tree frog *Hyla annectans chuanxiensis* from two different elevation in Sichuan (China). **Zoologischer Anzeiger**, v. 248, p. 255–263, 2010b.

- LIAO, W.B.; LIU, W.C.; MERILÄ, J. Andrew meets Rensch: sexual size dimorphism and the inverse of Rensch's rule in Andrew's Toad (*Bufo andrewsi*). **Oecologia**, v. 177, p. 389–399, 2015.
- LINDQUIST, E.; REDMER, M.; BRANTNERT, E. Annular bone growth in phalanges of five Neotropical Harlequin Frogs (Anura: Bufonidae: Atelopus). **Phyllomedusa**, v. 11, p. 117–124, 2012.
- LÓPEZ, J. A.; ANTONIAZZI, C. E.; LLANES, R. E.; GHIRARDI, R. Age structure, growth pattern, sexual maturity, and longevity of *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) in temperate wetlands. **Amphibia-Reptilia**, v. 38, p. 371–379, 2017.
- LOU, S. L.; JIN, L.; LIU, Y. H.; MI, Z.P.; TAO, G.; TAND, Y.M.; LIAO, W.B. Altitudinal variation in age and body size in yunnan pond frog (*Pelophylax pleuraden*). **Zoological Science**, v. 29, p. 493–498, 2012.
- MANEYRO, R.; CARREIRA, S. Guía de anfibios del Uruguay. **Ediciones de la Fuga**. Montevideo, p. 207, 2012.
- MARANGONI, F.; BARRASSO, D. A.; CAJADE, R.; AGOSTIN, G. Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) from Argentina. **North-Western Journal of Zoology**, v. 8, n. 1, p. 36–71, 2011.
- MARÍN-MORATALLA, N.; JORDANA, X.; KÖHLER, M. Bone histology as an approach to providing data on certain key life history traits in mammals: Implications for conservation biology. **Mammalian Biology**, v. 78, p. 422–429, 2013.
- MARTINO, A. L.; SINSCH, U. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. **Journal of Zoology**, v. 257, p. 67–81, 2002.
- MARTINO, A. L.; SALAS, N. E.; DI TADA, I. E. Geographic distribution of *Odontophrynus americanus*. **Herpetological Review**, v. 30, p. 50, 1999.
- MIDDLETON, J.; GREEN, D. M. Adult age-structure variability in an amphibian in relation to population decline. **Herpetologica**, v. 71, n. 3, 2015.
- MORRISON, C.; HERO, J. M.; BROWNING, J. Altitudinal variation in the age at maturity, longevity and reproductive lifespan of anurans in subtropical Queensland. **Herpetologica**, v. 60, n. 1, p. 34–44, 2004.
- OLGUN, K., UZUM, N., AVCI, A., MIAUD, C. Age, size and growth of the southern crested newt *Triturus karelinii* (Strauch 1870) in a population from Bozdag. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p. 223–230, 2005.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomía** v. 20, p. 263–268, 2002.

- OROMI, N.; PUJOL-BUXÓ, E.; SEBASTIÁN, O. S.; LLORENTE, G. A.; HAMMOU, M. A.; SANUY, D. Geographical variations in adult body size and reproductive life history traits in an anuran, *Discoglossus pictus*. **Zoology**, v. 119, p. 216–223, 2016.
- OROMI, N.; SANUY, D.; SINSCH, U. Altitudinal variation of demographic life-history traits does not mimic latitudinal variation in natterjack toads (*Bufo calamita*). **Zoology**, v. 115, p. 30–37, 2012.
- PASCUAL-PONS, M.; OROMI, N.; PUJOL-BUXÓ, E.; FIBLA, M.; SANUY, D.; MANTORI, A. Life history traits of spadefoot toad (*Pelobates cultripes*) population from a semiarid zone in the north east of the Iberian Peninsula. **Herpetological Journal**, v. 27, p. 57–61, 2017.
- PRADO, C.P.A.; HADDAD, C.F. Size-fecundity relationships and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, south-western Brazil. **Herpetological Journal**, v. 15, p. 181–189, 2005.
- RASTOGI, R. K.; IELA, L.; SAXENA, P. K.; CHIEFFI, G. The control of spermatogenesis in the Green frog, *Rana esculenta*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 196, p. 151–166, 1976.
- RASTOGI, R. K., IELA, L., DI MEGLIO, M., DI MATTEO, L., MINUCCI, S.; I., IZZO-VITIELLO. Initiation and kinetic profiles of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta* (Amphibia). **Journal of Zoology (London)**, v. 201, p. 515–525, 1983.
- RICQLÈS, A. J.; PADIAN, K.; HORNER, J. R.; LAMM, E. -T.; MYHRVOLD, N. Osteohistology of *Confucius ornissanctus* (Therophoda: Aves). **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 23, n. 2, p. 373–386, 2003.
- ROSSET, S. D. New species of *Odontophrynus* Reinhardt and Lütken 1862 (Anura: Neobatrachia) from Brazil and Uruguay. **Journal of Herpetology**, v. 42, p.134–144, 2008.
- ROSSET, S.; BALDO, D.; LANZONE, C.; BASSO, N. G. Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). **Journal of Herpetology**, v. 40, p. 465–477, 2006.
- ROZEMBLUT, B.; OGIELSKA, M. Development and growth of long bones in european water frog (Amphibia: Anura: Ranidae), with remarks on age determination. **Journal of Morphology**, v. 265, p. 304–317, 2005.
- SÁEZ, F. A.; BRUM-ZORRILLA, N. Citogenética de anfibios anuros de América del Sur. Los cromosomas de *Odontophrynus americanus* y *Ceratophrys ornata*. **Annales de la Facultad de Medicina**, v. 44, p. 414–423, 1959.
- SÁEZ, F. A.; BRUM-ZORRILLA, N. Karyotype variation in some species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia-Anura). **Caryologia**, v. 19, n. 1, 1966.

- SAGOR, E.S.; OUELLET, M.; BARTEN, E.; GREEN, D.M. Skeletochronology and geographic variation in age structure in the wood frog, *Rana sylvatica*. **Journal of Herpetology**, v. 32, p.469– 474, 1988.
- SANDER, P. M. Longbone histology of the *Tendaguru* sauropods: implications for growth and biology. **Paleobiology** v. 26, p. 466–488, 2000.
- SANTOS, T. G.; KOOP, K. SPIES, M. R.; TREVISAN, R.; CECHIN, S. Z. Distribuição temporal e espacial de anuros em área de Pampa, Santa Maria, RS. **Iheringia**, v. 98, p. 244–153, 2008.
- SAVAGE, J. M.; CEI, J. M. A review of the Leptodactylid frog genus *Odontophrynus*. **Herpetologica**, v. 21, p. 178–195, 1965.
- SHINE, R. The evolution of large body size in females. A critique of Darwin's fecundity advantage model. **The American Naturalist**, v. 131, p. 124–131, 1988.
- SHINE, R. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. **Quarterly Review of Biology**, v. 64, p. 419–461, 1989.
- SINSCH, U. Review: skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. **Herpetological Journal**, v. 25, p. 5–13, 2015.
- SINSCH, U.; DEHLING, J. M. Tropical anurans mature early and die young: Evidence from eight Afromontane Hyperolius species and a meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171666, 2017.
- SINSCH, U.; OROMI, N.; SANUY, D. Growth marks in natterjack toad (*Bufo calamita*) bones: histological correlates of hibernation and aestivation periods. **Herpetological Journal**, v. 17, p.129–137, 2007.
- SINSCH, U.; MARANGONI, F.; OROMI, N.; LESKOVAR, C.; SANUY, D.; TEJEDO, M. Proximate mechanisms determining size variability in Natterjack Toads. **Journal of Zoology**, v. 281, p. 272–281, 2010.
- SOCHA, M.; OGIELSKA, M. Age structure, size and growth rate of water frogs from central Europe natural *Pelophylax ridibundus*-*Pelophylax esculentus* mixed populations estimated by skeletochronology. **Amphibia-Reptilia**, v. 31, p. 239–250, 2010.
- TOLEDO, L. F.; RIBEIRO, R. S.; HADDAD, C. F. B. Anurans as prey: an exploratory analysis and size relationships between predators and their prey. **Journal of Zoology**, v. 271, p. 170–177, 2006.
- TÜTKEN, T., H. U.; PFRETZSCHNER, T. W.; VENNEMANN, G. S.; WANG Y. D. Paleobiology and skele-tochronology of Jurassic dinosaurs: implications from the histology and oxygen isotope compositions of bones. **Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology**, v. 206, p. 217–238, 2004.

- ÜZÜM, N.; OLGUN, K. Age and growth of the Southern Crested Newt, *Triturus karelinii* (Strauch 1870), in a lowland population from northwest Turkey. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 55, p. 55–65, 2009.
- WELLS, K. D. The social behavior of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 25, p. 666–693, 1977.
- WELLS, K. D. The Ecology and Behavior of Amphibians. Chicago and London, USA, **The University of Chicago Press**, 2007.
- WOOLBRIGHT, L.L. Sexual selection and size dimorphism in anuran Amphibia. **The American Naturalist**, v. 121, p. 110–119, 1983.
- ZHONG, M.; YU, X.; LIAO, W. A review for life-history traits variation in frogs especially for anurans in China. **Asian Herpetological Research**, v. 9, n. 3, p. 165–174, 2018.