

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

Thaís Cibele André

**A TOLERÂNCIA TÉRMICA COMO FERRAMENTA PARA
AVALIAÇÃO DA VULNERABILIDADE DE ANFÍBIOS AO AUMENTO
DA TEMPERATURA**

Santa Maria, RS
2019

Thaís Cibele André

**A TOLERÂNCIA TÉRMICA COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA
VULNERABILIDADE DE ANFÍBIOS AO AUMENTO DA TEMPERATURA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**

Orientador: Prof^o Dr. Tiago Gomes dos Santos

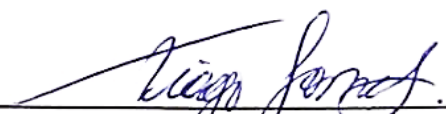
Santa Maria, RS
2019

Thaís Cibele André

**A TOLERÂNCIA TÉRMICA COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA
VULNERABILIDADE DE ANFÍBIOS AO AUMENTO DA TEMPERATURA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**

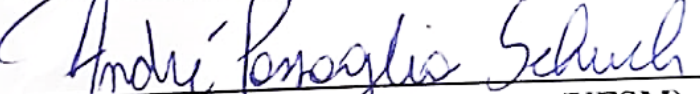
Aprovado em 27 de fevereiro de 2019:



Tiago Gomes dos Santos, Dr. (UNIPAMPA)
(Presidente/Orientador)



José Eduardo de Carvalho, Dr. (UNIFESP)



André Passaglia Schuch, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

Chegou a hora de agradecer a todos que participaram da minha jornada. Alguns muito ativamente, percorreram comigo os árduos caminhos da pós-graduação, onde dividimos muitas alegrias e tristezas. Outros apenas cruzaram meu caminho, mas que sem dúvida deixaram um bom ensinamento, e por fim os que não resistiram estar ao meu lado, pois afinal a pós transforma de uma maneira inimaginável a forma de ver a vida.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador Tiago Gomes dos Santos, por ter aceitado a difícil missão de me orientar. Afinal, eu era uma pessoa desconhecida, com pouca experiência, aceitando trabalhar numa área nova, com a difícil tarefa de montar os experimentos a partir de uma foto, realmente deve tu debes ter tido um pouco de medo. Por isso, muito obrigada pelo voto de confiança nesses dois anos, por todos os ensinamentos, pela paciência, pelo apoio e conselhos.

Também agradeço ao meu coorientador não oficial, Dr. Bruno Madalozzo, por ter me ajudado mesmo estando na “finaleira” do doutorado, indo para outro país e num estresse danado. Sem dúvida, tuas conversas com o professor Miguel foram essenciais para montar os experimentos e lidar com os problemas que íamos encontrando. Por isso, muito obrigada por ter contribuído tanto nesse trabalho, sem tua ajuda não teria conseguido.

Agradeço também, ao professor Cristian, por ter aceitado fazer parte desse trabalho mesmo tendo tão pouco tempo, a fim de enriquecer nossas análises. Sem dúvida o artigo será muito mais completo com a tua ajuda.

Gostaria de agradecer à Prof^a. Dr^a. Sonia Zanini Cechin, por todo o auxílio burocrático e principalmente pelo espaço no Laboratório de Herpetologia, bem como, ao Prof. Dr. Sandro Santos, por gentilmente ter emprestado um cantinho para que eu pudesse realizar meus experimentos. E, ao Prof. Dr. Bernardo por ter nos ajudado a resolver as partes burocráticas para a realização dos experimentos. Também agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de Mestrado. Meu muito obrigada aos guardas do prédio 17, por sempre estarem bem-humorados.

Gostaria de agradecer aos meus colegas do Laboratório de Herpetologia, Brena Gonçalves, Aline Portela, Guilherme Azambuja, Conrado da Rosa, Suelen Saccol, Letícia Miolo, Érica Fonseca, Tiago Theis e João Ucha pelas conversas científicas, pelos cafés, pelas cervejas e comilanças, mas principalmente pelo muro das lamentações.

Gostaria de agradecer aos amigos que fiz durante o mestrado, principalmente ao Felipe Cerezer, Amanda Brum e Fernando Benso, vocês deixaram meus dias melhores e todo o peso

do mestrado mais leve (graças ao shot de café). Também aos meus colegas de mestrado, pelas festas inesquecíveis e pelo melhor grupo de apoio via Whatsapp.

Não poderia deixar de agradecer aos velhos amigos, Victor Mendes Lipinski, por ter me apoiado em fazer o mestrado, e pela ajuda nas correções do projeto, obtenção de licenças e por todas as dicas sobre o mestrado. E claro, a Daniela Sponchiado, minha melhor amiga. Sem tu, não teria conseguido chegar onde eu cheguei, graças as nossas conversas, nosso chá das 16:00, caminhadas e PL's. Não existem palavras pra descrever a quão grata eu sou, e o quão feliz eu estou por ter compartilhado esse sonho contigo.

Claro que vou agradecer aos colegas que se tornaram amigos, e que tive o prazer de compartilhar bons momentos (principalmente os momentos com café), a Prof^ª. Dr^ª. Andressa Paladini e ao Dr. Marcelo Dalosto. Também à Brena e a Aline, que se tornaram minhas grandes amigas.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à minha família. Minha mãe (Cibele Koliver) e meu pai (João André), que sempre acreditaram nos meus sonhos. Que apoiaram uma menina de 17 anos a sair de casa pra estudar biologia, sozinha, sem conhecer ninguém e sem muito dinheiro. Depois, aceitaram que eu iria ainda mais longe de casa para realizar o sonho de virar mestre e doutora. Vocês são meus exemplos, o que eu sou hoje é consequência do que eu aprendi com vocês. E aproveito para pedir desculpa, pela ausência nas datas comemorativas, por ficar 1 ano sem ir pra casa, por todos os aniversários que passamos longe. Sem dúvida, foi por um bom motivo. Também, quero agradecer ao Vitor Udo João Leal, meu namorado, muito obrigada por estar comigo em todos os momentos. Por ter me ajudado a montar a parte elétrica dos meus experimentos, ter ajudado na primeira coleta abaixo de um baita temporal, por trazer minha janta no lab, por ficar comigo até as 2:00 da manhã pesando girinos e por ter sido meu colo quando as coisas não davam certo. E claro, ao meu filho felino Luke, por me proporcionar momentos de imensa alegria, por ter sido meu consolo nos momentos de tristeza. Eu amo vocês.

Também, meu agradecimento a todos da banca, pelo tempo em que dedicaram lendo essa dissertação a fim de contribuir e enriquecer nosso futuro artigo.

Obrigada a todos por esta jornada, assim, como o Frodo, a Thaís que iniciou essa jornada não é a mesma Thaís que retorna. Aprendi muitas coisas e o anel (digo dissertação) está entregue e sem dúvidas com a ajuda de vocês eu sei que fiz o meu melhor.

“É perigoso sair porta afora, Frodo”, ele costumava dizer.

“Você pisa na Estrada, e, se não controlar seus pés, não há como saber até onde você pode ser levado”.

A Sociedade do Anel

RESUMO

A TOLERÂNCIA TÉRMICA COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA VULNERABILIDADE DE ANFÍBIOS AO AUMENTO DA TEMPERATURA

AUTORA: THAÍS CIBELE ANDRÉ
ORIENTADOR: TIAGO GOMES DOS SANTOS

As mudanças climáticas podem gerar grandes efeitos sobre a biodiversidade, forçando as espécies a se adaptarem ou gerando grandes extinções para aquelas que não conseguem lidar com os efeitos diretos e indiretos do aumento da temperatura. Em especial, as larvas dos anfíbios são extremamente dependentes da água e possuem baixa capacidade de termorregulação, sendo consideradas isotérmicas em relação ao meio. Por isso, medidas da fisiologia térmica dos anfíbios, associadas com as temperaturas atuais e ótimas em que elas se encontram, são uma ferramenta bastante útil para avaliação da vulnerabilidade das espécies, bem como podem servir nas análises de modelagem climática e respectivas estratégias de conservação. No presente estudo, nós utilizamos larvas de três espécies de anfíbios anuros filogeneticamente próximas (*Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis* e *P. henselii*), mas com fenologias reprodutivas diferentes, para determinar as curvas de performance térmica e indicar se elas já enfrentam temperaturas que podem ocasionar algum dano à sua performance. Nós utilizamos o crescimento das larvas ao longo de seis aclimações térmicas representando temperaturas em que as espécies já vivenciam na natureza (15°C, 20°C, 23.5°C, 29°C, 31°C e 35°C), para determinar a temperatura ótima e para construir curvas de performance térmica. Utilizamos dados microclimáticos registrados na natureza para calcular a Margem de Segurança Térmica (TSM), a Tolerância ao Aquecimento (WT) e a Tolerância ao Resfriamento (CT), bem como projetamos nesses dados um cenário de futuro aumento da temperatura (+4°C). Utilizamos dados macroclimáticos para avaliar a relação da temperatura do ar com a temperatura da água. A temperatura ótima de *Physalaemus cuvieri* foi 31°C, *P. gracilis* foi 29°C e *P. henselii* foi 20°C. *Physalaemus gracilis* e *P. henselii* já vivenciam temperaturas acima da ótima registrada. *Physalaemus henselii* apresentou a TSM mais preocupante em comparação às demais espécies, pois apresentou a temperatura ótima mais baixa e foi sensível às aclimações mais quentes. *Physalaemus gracilis* apresentou baixa WT, especialmente quando incluímos o cenário de aquecimento global. *Physalaemus cuvieri* foi a espécie mais suscetível ao resfriamento. Com estes resultados, podemos entender como a curva de performance dessas espécies funciona e saber quais estão mais vulneráveis aos potenciais aumentos das temperaturas e futuramente tentar projetar dados macro e microclimáticos aliados a fisiológicos como ferramentas para formular estratégias de conservação.

Palavras-chave: *Physalaemus*. Mudanças climáticas. Temperatura ótima. Curvas de performance térmica.

ABSTRACT

THERMAL TOLERANCE AS A TOOL FOR ASSESSING AMPHIBIAN VULNERABILITY TO TEMPERATURE INCREASE

AUTHOR: THAÍS CIBELE ANDRÉ
ADVISER: TIAGO GOMES DOS SANTOS

Climate change can have major effects on biodiversity, forcing species to adapt or generating large extinctions for those that cannot cope with the direct and indirect effects of rising temperatures. In particular, larvae of amphibians are extremely dependent on water and have low thermoregulation capacity, being considered isothermal in relation to the medium. Therefore, measures of the thermal physiology of amphibians, associated with the present and optimal temperatures in which they are found, are a very useful tool to evaluate the vulnerability of the species, as well as they can be useful in the analysis of climate modeling and conservation strategies. In the present study, we used larvae of three species of phylogenetically close anuran amphibians (*Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis* and *P. henselii*), but with different reproductive phenologies, to determine the thermal performance curves and indicate if they already face temperatures that may damage your performance. We used the growth of the larvae along six thermal acclimations representing temperatures in which the species already live in nature (15°C, 20°C 23.5°C, 29°C, 31°C and 35°C), to determine the optimum temperature and to construct thermal performance curves. We use microclimatic data recorded in nature to calculate the Thermal Safety Margin (TSM), Warming Tolerance (WT) and Cooling Tolerance (CT), as well as projecting a future temperature increase scenario (+4°C). We used macroclimatic data to evaluate the relationship between air temperature and water temperature. The optimum temperature of *Physalaemus cuvieri* was 31°C, *P. gracilis* was 29 °C and *P. henselii* was 20 °C. *Physalaemus gracilis* and *P. henselii* already experience temperatures above the optimum recorded. *Physalaemus henselii* presented TSM more worrying in comparison to the other species, because it presented the lowest optimum temperature and was sensitive to the hotter acclimations. *Physalaemus gracilis* presented low WT, especially when we included the global warming scenario. *Physalaemus cuvieri* was the species most susceptible to cooling. With these results, we can understand how the performance curve of these species works and know which ones are most vulnerable to potential temperature increases and, in the future, try to design macro and microclimatic data together with physiological as tools to formulate conservation strategies.

Keywords: *Physalaemus*. Climate change. Optimal temperature. Thermal performance curves.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 MUDANÇAS CLIMÁTICAS E IMPLICAÇÕES SOBRE A BIODIVERSIDADE	10
1.2 FISIOLOGIA TÉRMICA: UMA FERRAMENTA PARA PREVER AS RESPOSTAS CAUSADAS PELO AUMENTO DA TEMPERATURA	11
1.3 TOLERÂNCIA E SENSIBILIDADE TÉRMICA APLICADA AOS ANFÍBIOS.....	13
1.4 FENOLOGIA REPRODUTIVA DOS ANUROS	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. Swimming in warm waters: tadpoles are already experiencing temperatures above the ideal?	18
3.1 Abstract	19
4. Introduction	21
5. Material and methods	24
5.1. <i>Sampling and studied species</i>	24
5.2. <i>Pond thermal predictors and regional thermal predictors</i>	26
5.3. <i>Thermal acclimation treatments</i>	27
5.4. <i>Statistical analyses</i>	28
6. Results	29
6.1. <i>Tadpole growth and tadpole survival</i>	29
6.2. <i>Thermal Safety Margin (TSM), Warming Tolerance (WT) and Cooling Tolerance (CT)</i>	30
6.3. <i>Microclimatic and macroclimatic data</i>	30
7. Discussion	31
Acknowledgments	34
References	35
Referências	53

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 MUDANÇAS CLIMÁTICAS E IMPLICAÇÕES SOBRE A BIODIVERSIDADE

As alterações climáticas estão presentes no planeta Terra desde o seu princípio (ZACHOS et al., 2001), já que na história geológica houve períodos extensos de aquecimento e resfriamento que foram desencadeados por mudanças na orientação e órbita do planeta (ANGILETTA, 2009). No entanto, na história recente, devido às intensas atividades antrópicas que perturbaram a atmosfera, fenômeno conhecido como efeito estufa, a Terra entrou em um período de aquecimento (ANGILETTA, 2009). O efeito estufa é causado quando gases como metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) e clorofluorcarbonos (CFCs) retêm calor na atmosfera, e um dos principais efeitos do aumento das emissões de gases de efeito estufa é o aquecimento global. O aumento na emissão desses gases se deve ao crescimento das atividades humanas, como a queima de combustíveis fósseis, os novos processos industriais, o desmatamento e a expansão da agricultura (SANKAR et al., 2018). Embora a influência da concentração atmosférica de dióxido de carbono no clima global já tivesse sido identificada no final do século XIX (ARRHENIUS, 1896), foi apenas no final dos anos 1970 que a preocupação com os impactos humanos sobre o sistema climático realmente começou a crescer (FODEN et al., 2018). Apesar disso, ainda existe uma parcela de leigos, representantes políticos e da mídia que continua a questionar as causas do recente aquecimento global e até mesmo a sua existência. Porém, é inegável que a temperatura do planeta está aumentando de maneira acelerada e atualmente poucos cientistas duvidam da influência das atividades humanas nesse processo (ANGILETTA, 2009). Desde os meados do século 20 a influência humana no clima tem sido causa dominante do aquecimento observado (IPCC, 2018), com um registro de aumento da temperatura média do planeta de aproximadamente 0.85°C entre os anos de 1880 a 2012 (PACHAURI et al., 2014). E, de acordo com dados mais recentes, é previsto um cenário ainda mais preocupante, com aumento de 6°C até 2100 (IPCC, 2014; 2018).

O aumento da temperatura até o momento resultou em profundas alterações nos sistemas naturais, incluindo aumentos dos períodos de estiagem, enchentes, fenômenos climáticos extremos, elevação do nível do mar e perda de biodiversidade (IPCC, 2018). Estudos já relatam os danos das mudanças climáticas sobre uma gama de organismos, como plantas (DUSENGE et al., 2018), invertebrados (RANK & DAHLHOFF, 2002; STILLMAN, 2003; NORSTRÖM et al., 2016) e vertebrados (POESCH et al., 2016; ARCHIS et al., 2018; NEWBOLD, 2018; VASCONCELOS et al., 2018; SCHIVO et al., 2019), bem como sobre relações tróficas e mutualísticas (LISTER & GARCIA, 2018; BLANCHARD et al., 2019). Dessa maneira,

podemos caracterizar as mudanças climáticas como uma grande ameaça em múltiplos biomas e escalas organizacionais (PARMESAN & YOHE, 2003), com um papel decisivo na reestruturação das comunidades ecológicas (NEWBOLD, 2018). De acordo com o mais recente relatório do IPCC (2018), as consequências dos aumentos da temperatura serão desastrosas, com riscos que podem ser duradouros e irreversíveis, acarretando a perda de alguns ecossistemas. No entanto, os aumentos da temperatura não afetarão todos os organismos igualmente, nem o mesmo organismo igualmente em todas as fases do ciclo de vida (ANGILETTA, 2009; PACIFICI et al., 2018). Assim, o entendimento das consequências do futuro aumento na temperatura sobre a história de vida dos organismos é ainda mais complexo. A temperatura é considerada um componente abiótico fundamental (ANGILETTA, 2009), uma vez que afeta todos os processos fisiológicos, as taxas de reações químicas (HOCHACHKA & SOMERO 2002) e muitas interações ecológicas (DUNSON & TRAVIS 1991). É através do entendimento da fisiologia térmica dos organismos que poderemos entender as reais consequências dessas mudanças. Isso é importante para organismos endotérmicos e, especialmente para os ectotérmicos, devido à forte dependência das temperaturas ambientais (DEUSCH et al., 2008; KINGSOLVER, 2009), que os torna vulneráveis às mudanças climáticas. Dessa forma, prever o que irá ocorrer com as espécies diante de um cenário de aquecimento global é um dos grandes desafios do momento e tem sido evidenciado por parte da comunidade científica (KATZENBERGER et al., 2012).

1.2 FISILOGIA TÉRMICA: UMA FERRAMENTA PARA PREVER AS RESPOSTAS CAUSADAS PELO AUMENTO DA TEMPERATURA

A fisiologia térmica teve seu início no século passado (COWLES & BOGERT, 1944, BRETT, 1956; JANZEN, 1967; BRATTSTROM, 1968), com maior destaque para organismos ectotérmicos, devido a dependência da temperatura (ANGILETTA, 2009). Nos ectotérmicos, a maioria dos processos fisiológicos respondem a variação de temperaturas, definindo uma curva de desempenho térmico ou TPC (HUEY & STEVENSON, 1979). A curva de desenvolvimento fisiológico térmico sobe gradualmente de uma temperatura crítica mínima (CT_{min}), atinge uma temperatura ótima (T_{opt}) e depois decai rapidamente para uma temperatura máxima crítica (CT_{max}) (Fig. 1). Limites térmicos críticos definem a faixa de tolerância térmica de um organismo, temperaturas abaixo ou acima desta faixa de tolerância resultam em comprometimento da função fisiológica (HILLMAN et al. 2009), como a locomoção, crescimento, desenvolvimento e reprodução (ANGILETTA et al., 2002) e por fim, até mesmo na morte do organismo (KATZENBERGER et al., 2012). Deutsh et al. (2008) propuseram duas

métricas baseadas na interação entre a fisiologia e o ambiente, com a finalidade de avaliar o risco das espécies aos eventos extremos de temperatura. A primeira métrica é a Tolerância ao Aquecimento (WT), que representa a diferença entre o CT_{max} e a temperatura ambiental máxima absoluta ($Thab$). A segunda métrica é a Margem de Segurança Térmica (TSM), definida como a diferença entre a temperatura ótima (T_{opt}) da espécie e a temperatura média ambiental vivenciada pela mesma.

A estimativa da WT e da TSM nos permite uma compreensão de como as mudanças na temperatura ambiental podem afetar as espécies (KATZENBERGER et al., 2018). A sensibilidade de organismos, como a tolerância térmica dos limites fisiológicos (CT_{max} e CT_{min}), bem como a quantidade e variação de exposição a fatores ambientais como temperaturas extremas (DEUTSCH et al, 2008; DUARTE et al, 2012), irão nos dar a probabilidade de uma espécie sobreviver ou se adaptar ao ser afetada pelos aumentos futuros. Portanto, determinar quão próximos os organismos estão dos seus limites térmicos na natureza e saber como eles são capazes de ajustar ou aclimatar sua sensibilidade térmica (STILLMAN 2003; GILMAN et al., 2006) fornecerá informações sobre quais serão potencialmente afetados pelas mudanças climáticas (SINCLAIR et al., 2016). Para avaliar os limites térmicos de tolerância, existem dois métodos: o estático e o dinâmico. O método estático se baseia na determinação da temperatura letal (LT_{50}), seja pela exposição de organismos a uma série constante de temperaturas experimentais ou em um tratamento de temperatura constante extrema e danosa que avalia o tempo do indivíduo até a morte. Já o método dinâmico, é realizado experimentalmente em taxas de mudanças constantes e graduais até alcançar o ponto fisiológico crítico, detectado pela imobilidade e perda de equilíbrio do organismo (LUTTERSCHMIDT & HUTCHISON, 1997).

No entanto, existem diferenças entre métodos estático e dinâmico e o que realmente acontece na natureza, mas dentre esses dois métodos, o dinâmico é o que mais se aproxima da realidade pois simula o aquecimento ou resfriamento natural (MITCHELL & HOFFMANN, 2010), ao contrário do método estático, que lida com mudanças rápidas e extremas e lida com temperaturas letais (ANGILLETTA, 2009).

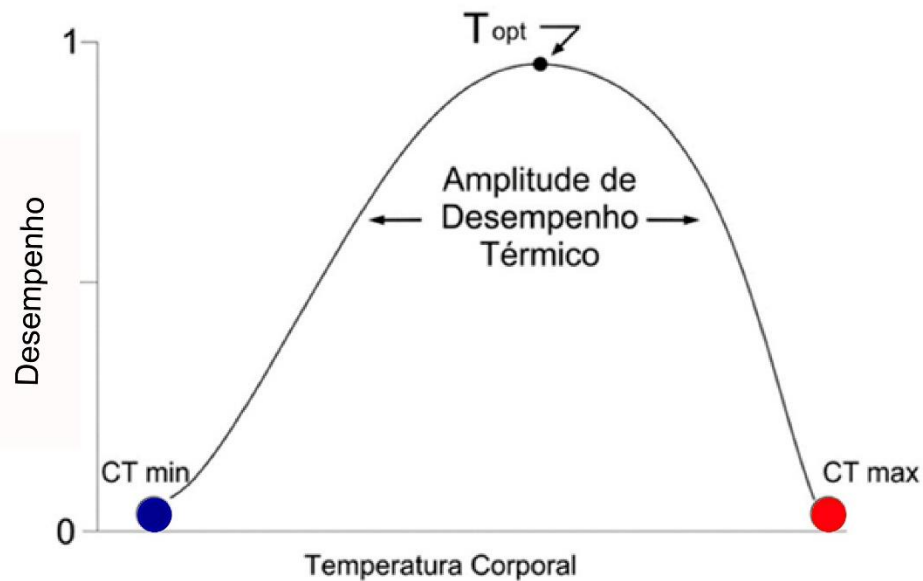


Figura 1 – Curva de atividade hipotética de um ectotérmico em função da temperatura corporal (Adaptado de Huey e Stevenson, 1979): CT min (círculo azul), CT max (círculo vermelho) e Top (círculo preto).

1.3 TOLERÂNCIA E SENSIBILIDADE TÉRMICA APLICADA AOS ANFÍBIOS

Os primeiros trabalhos envolvendo a variação dos limites térmicos em anfíbios foram desenvolvidos com salamandras por Hutchinson (1961) e com anuros por Brattstrom (1968). Atualmente o interesse de trabalhos com o grupo dos anfíbios tem aumentado, devido às especificidades desses organismos às mudanças ambientais (KATZENBERGER et al., 2012). Os anfíbios são considerados o grupo de vertebrados mais ameaçado do mundo (WAKE & VREDENBURG, 2008), já que cerca de 41% das espécies estão sob alguma categoria de ameaça (HOFFMANN et al., 2010). Entre as principais causas do seu declínio estão a destruição e fragmentação dos habitats, o aumento da radiação ultravioleta, a poluição da água, a introdução de espécies exóticas, e o aumento da temperatura (BEEBEE & GRIFFITHS, 2005; BROOK et al., 2008; HALLIDAY, 2008). Aspectos importantes da biologia dos anfíbios, como crescimento, desenvolvimento, forrageamento e tempo de hibernação e reprodução, provavelmente serão afetados pelo clima (LI et al., 2013). Os anfíbios, além de serem organismos ectotérmicos, possuem uma gama de características de história de vida que os tornam ainda mais sensíveis às mudanças ambientais quando comparados a outros grupos: a alta permeabilidade da pele e a necessidade de inúmeros tipos de habitats (e.g. corpos d'água, remanescentes florestais) para completar seu complexo ciclo de vida bifásico (fase aquática e terrestre), a baixa capacidade de dispersão e uma grande sensibilidade hídrica (WELLS, 2007; KATZENBERGER et al., 2012; FARALLO et al., 2018). Na fase larval, o crescimento e o

desenvolvimento de um indivíduo dependem intimamente da temperatura (TEJEDO et al., 2010). Dessa forma, o tamanho e o tempo para metamorfose podem refletir o *fitness* de uma espécie por estarem relacionados à sobrevivência na fase terrestre (e.g. evitar predação) e ao escape de uma situação de stress (e.g. poças temporárias), respectivamente (REQUES & TEJEDO, 1997; TEJEDO et al., 2010). Conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento podem gerar padrões intra/interespecíficos sobre as respostas fisiológicas frente à pressão seletiva do ambiente (KATZENBERGER et al., 2012; TEJEDO et al., 2010). Além disso, os girinos estão restritos ao ambiente aquático, são isotérmicos em relação ao ambiente circundante devido ao seu pequeno tamanho, resultando em temperatura corporal igual ao do ambiente (SPOTILA et al. 1992; LUTTERSCHMIDT & HUTCHISON, 1997; WU & KAM, 2005). Ou seja, os girinos praticamente não conseguem regular a temperatura do corpo de maneira ideal para seu próprio organismo, principalmente nas flutuações das temperaturas (PUTNAN & BENNET, 1981). Com isso, o que os girinos podem fazer é procurar microambientes mais quentes ou mais frios nas poças, mas dependendo das temperaturas pode haver problemas sérios com suas demandas respiratórias e osmorregulatórias (BRATTSTROM, 1979), em função das limitações ambientais. Por isso, a fase larval dos anfíbios é um modelo interessante e eficiente no estudo de tolerâncias térmicas em ectotérmicos (BURGGREN & WARBURTON, 2007).

Estudos ecofisiológicos visam entender como os animais funcionam e respondem aos seus ambientes naturais, em todos os estágios dos ciclos de vida (WILLMER et al., 2005). Ademais, a fisiologia da conservação busca compreender as respostas fisiológicas dos organismos ao ambiente alterado, com a finalidade de avaliar as consequências e futuras ações para as espécies (WIKELSKI & COOKE, 2006). Dessa maneira, utilizar a ecofisiologia como uma ferramenta nos estudos com os anfíbios anuros, nos permite o entendimento e previsões de como as espécies diante das mudanças no clima - tanto naturais como antropogênicas - e assim desenvolver estratégias eficazes de conservação para as espécies (WILLIAMS & BLOIS, 2018). Com isso, definir parâmetros como CT_{max} , CT_{min} , T_{opt} , taxas de desenvolvimento e crescimento, bem como alterações da fenologia das espécies, serão essenciais para fornecer informações de quais espécies serão capazes de amortecer o impacto das alterações climáticas, e quais poderão enfrentar a extinção durante o próximo século (KATZENBERGER et al., 2012).

1.4 FENOLOGIA REPRODUTIVA DOS ANUROS

A reprodução dos anfíbios é altamente afetada pela distribuição das chuvas e pelo hidroperíodo das poças (SEMLITSCH et al., 1996). Como muitas espécies geralmente se reproduzem na mesma poça, uma estratégia usada pelos anfíbios para evitar a competição e a pressão de predação é segregação temporal no uso de lagoas (BLAIR, 1961). Porém, com o aumento da temperatura, o hidroperíodo das poças e a quantidade de precipitação podem ser extremamente afetados. As mudanças na fenologia reprodutiva já foram identificadas como uma importante consequência ecológica da mudança climática, (WALPOLE et al., 2012; KLAUS & LOUGHEED, 2013; FICETOLA & MAIORANO, 2016; SHERIDAN et al., 2017), e essas alterações podem modificar profundamente a estrutura das populações (BLAUSTEIN et al., 2001). Os anfíbios estão entre os táxons que apresentam a mais forte responsividade fenológica ao aquecimento das temperaturas (FICETOLA & MAIORANO, 2016). E estudos já demonstram claramente que as populações de anfíbios antecipam consistentemente períodos de reprodução, e que essa mudança é fortemente determinada pelas tendências do aquecimento global, particularmente latitudes (WHILE & ULLER 2014). Uma vez que, a fenologia das espécies em altas latitudes responde mais fortemente à temperatura, enquanto as espécies em latitudes mais baixas respondem igualmente à temperatura e à precipitação (Cohen et al., 2018).

Prevê-se que o aquecimento global acelere o início da reprodução da primavera, por anfíbios anuros em ambientes sazonais (GREEN et al., 2017), e a medida que a mudança climática se intensifica no próximo século, nossos resultados sugerem que os avanços na fenologia tendem a se tornar mais exagerados (COHEN et al., 2018). Como consequências dessas alterações, essas mudanças teriam o potencial para influenciar os níveis de sobreposição de nicho entre as espécies (TODD et al. 2011), trazer assincronia em interações mutualísticas, predador-presa e hospedeiro-parasita (COHEN et al., 2018) e afetar o sucesso reprodutivo e a persistência local (BEEBEE, 2002). Com isso, algumas espécies poderão ser mais afetadas que outras (HADDAD et al., 2007; LI et a., 2013), levando até o desaparecimento maior de espécies especialistas do que as generalistas (VAN ROOY & STUMPEL, 1995).

Por isso, entender como as espécies respondem às mudanças climáticas, é uma das questões mais importantes enfrentadas pelos ecologistas e biólogos evolucionistas hoje (SHERIDAN et al., 2017). Uma abordagem que pode ser útil é a implementação de modelos mais funcionais e fisiológicos, combinados com dados de campo sobre clima (LI et a., 2013). Uma vez que, ainda são limitadas as informações sobre as tolerâncias e preferências térmicas dos anfíbios (LI et a., 2013). Dessa forma, estudos com girinos, especialmente no bioma Pampa, que atualmente possui atualmente apenas 41% da cobertura original (excluindo florestas

nativas), sendo que 11% foram perdidos nos últimos 32 anos (sensu MAPBIOMAS, 2018). Dessa maneira, com estudos ecofisiológicos poderemos detectar o quão vulneráveis as espécies podem estar diante das mudanças climáticas, especialmente em um bioma que vem desaparecendo de forma assustadora.

1.5 ESPÉCIES DO ESTUDO E HIPÓTESES

Nesse trabalho, utilizamos girinos de três espécies de anuros filogeneticamente próximas (Leptodactylidae: Leiuperinae) como modelo em nosso estudo: *Physalaemus cuvieri*, *Physalaemus gracilis* e *Physalaemus henselii*. Essas espécies apresentam padrões distintos em fenologias de reprodução e distribuições geográficas: *Physalaemus cuvieri* possui reprodução na primavera / verão, com ampla distribuição geográfica que abrange o sul, sudeste, centro e nordeste do Brasil, leste do Paraguai e Argentina (Misiones, Corrientes e Entre Rios), norte do Uruguai. e nos departamentos de Beni e Santa Cruz, na Bolívia (Kwet et al., 2010, Frost, 2018). *Physalaemus gracilis* é também possui reprodução na de primavera / verão, com distribuição geográfica no estado brasileiro do Rio Grande do Sul e Uruguai (Maneyro e Carreira, 2012; Frost, 2018), enquanto as populações ocorrem no Paraná, Santa Catarina e no norte do Rio Grande do Sul pode ser *P. carrizorum* (Cardoso e Pereyra, 2018). Já *Physalaemus henselii* se reproduz nas estações mais frias de outono / inverno, com distribuição geográfica nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, em todo o Uruguai e nas províncias argentinas de Entre Rios e Buenos Aires (Maneyro e Carreira, 2012; Frost, 2018).

Para anfíbios, existem fortes evidências de que em uma mesma zona climática ou bioma, espécies podem apresentar padrões ecofisiológicos distintos. Duarte et al. (2012), observaram diferenças relevantes entre duas comunidades de anfíbios subtropicais, onde as espécies da comunidade de área aberta, expostas a temperaturas extremas altas, possuíam maiores limites máximos críticos (CTmax) e menor tolerância térmica (WT) que a comunidade da Mata Atlântica, com maior cobertura vegetal. Em escalas ainda menores, Katzenberger (2009) verificou em uma mesma comunidade de região temperada a existência de maiores temperaturas ótimas de performance fisiológica e limites térmicos críticos em espécies que se reproduzem na primavera/verão (estação quente) quando comparadas com espécies de outono/inverno (estação fria). Além disso, os autores observaram que, independente da comunidade de origem, existe uma forte influência da sazonalidade, tanto na CTmax quanto na temperatura ótima, o que pode indicar uma adaptação no nicho térmico das espécies de acordo com as condições ambientais locais (ANGILLETTA, 2009; RICHTER-BOIX et al., 2015). Portanto, ambientes que naturalmente vivenciam uma sazonalidade climática maior podem

contar com espécies em diferentes níveis de vulnerabilidade e performance biológica em uma mesma comunidade, dependendo da adaptação ecofisiológica das espécies para cada estação. Como é o caso das nossas espécies de estudo, que apesar de serem filogeneticamente próximas, podem apresentar padrões ecofisiológicos distintos. Dessa maneira, esperamos que *Physalaemus cuvieri* tenha maior tolerância a temperaturas mais altas, assim como *Physalaemus gracilis*, por serem expostas a temperaturas maiores devido a sua fenologia reprodutiva. Ao contrário de *Physalaemus henselii* que possivelmente é a espécie mais sensível em relação a temperatura, principalmente por que espécies especializadas em temperaturas mais baixas e com uma menor capacidade de aclimatação (Stillman, 2003), são as espécies que podem estar mais ameaçadas com o aumento das temperaturas. Testar tais hipóteses permite compreender a adaptação evolutiva do nicho fundamental atual das espécies ao caracterizar as relações do organismo com o ambiente e, conseqüentemente, sua vulnerabilidade frente às mudanças extremas de temperatura. Principalmente na fase larval, que possui muito poucos estudos (KATZENBERGER et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a performance biológica de três espécies de anfíbios anuros filogeneticamente próximas, as quais apresentam distintas fenologias reprodutivas, e analisar sua potencial vulnerabilidade ao aquecimento global.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar as curvas de sensibilidade térmica de três espécies de anuros que possuem diferentes estações reprodutivas;
- Comparar a performance biológica de espécies próximas filogeneticamente em diferentes tratamentos de aclimatação à temperatura;
- Analisar a vulnerabilidade ao aquecimento global utilizando estimativas da TSM (margem de segurança térmica) e WT (tolerância térmica), com base em suas TPC (curvas de sensibilidade térmica) e os valores de temperatura dos habitats aquáticos em diferentes escalas.

Esta Dissertação segue as normas da MDT (Manual de Dissertações e Teses) da UFSM. No entanto, o capítulo está organizado de acordo com as normas do periódico *Journal of Thermal Biology*, ao qual pretendemos submeter após a defesa.

3. Swimming in warm waters: tadpoles are already experiencing temperatures above the ideal?

Thaís Cibele André¹, Bruno Madalozzo², Cristian Dambrós¹ and Tiago Gomes dos Santos³

1 - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Departamento de Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima nº 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

2 - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, R. Fábio João Adolhe nº 1100, Floresta, CEP 98590-000, Santo Augusto, Rio Grande do Sul, Brazil

3 - Universidade Federal do Pampa, Av. Antônio Trilha nº 1847, Centro, CEP 97300-000, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding autor: T.C. André.
Email adress: thais.c.andre@gmail.com

3.1 Abstract

Climate change is closely related to the loss of biodiversity, and temperature increases influence upon survival, growth, breeding phenology, dispersal, and especially the variation of the species' thermal niche. The temperature also strongly influences the thermal profile of the aquatic habitats used by organisms. Ectotherms will potentially be the first to be affected by predicted temperature increases, which will include changes in thermal performance and impairment of vital processes. Among the ectotherms, amphibians are the most endangered vertebrates on the planet, due to their complex biphasic life cycle and other physiological and behavioural peculiarities. Thus, we used the larval phase of three species of phylogenetically close anurans (*Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis* and *P. henselii*) that co-occur in the Pampa biome of southern Brazil in order to investigate the thermal physiological performance. Tadpoles were collected using a long-handled metal mesh (mesh of 2mm²). We monitored the thermal profile of three breeding sites (ponds) using aquatic data loggers (HOBO pendant®). Temperature sensitivity curves of the tadpoles were estimated using six temperature treatments selected within the thermal range recorded in the monitored ponds. Each treatment consisted a total of 15 randomly selected tadpoles (n = 90 individuals of each species). The thermal sensitivity of tadpoles was estimated by the growth rate, defined as: $GR = (\text{Final Weight} - \text{Initial Weight}) / \text{number of days}$. We tested possible differences among species regarding survival time, as well as intra specific response in growth rate to the thermal acclimations. Next, we also calculate Thermal Safety Margin (TSM), Warming Tolerance (WT) and Cooling Tolerance (CT), adding a possible scenario of a +4°C increase in these parameters. The species with highest optimum temperature was *Physalaemus cuvieri* (31°C), followed by *Physalaemus gracilis* (29°C), and *Physalaemus henselii* (20°C). *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* showed significant increase in growth rate at high temperatures, and *Physalaemus henselii* showed high growth rates in low temperatures. Currently, *Physalaemus gracilis* and *P. henselii* already

experience temperatures in the ponds above the optimum. *Physalaemus henselii* presented the most worrying results regarding the TSM, since in all the habitats presented negative values because they already experienced temperatures above the optimum in these environments. Concerning WT, *Physalaemus gracilis* showed the most worrisome results, due to the difference in ambient temperature and maximum critical temperature (CT_{max}) being only 1.79°C. *Physalaemus cuvieri* and *Physalaemus henselii* showed the lowest CT results and possibly more are susceptible to stress at lower temperatures than *Physalaemus gracilis*. Studies like this are important in elucidating which species are the most sensitive, as well, as understanding the adaptive capacity to potential temperature increases in a climate change scenario.

Keywords: amphibian, *Physalaemus*, T_{opt} , TSM, climate change

4. Introduction

Habitat loss, introduction of invasive species, temperatures close to thermal physiological limits, exposition to UV-B radiation, and contact with infectious disease are the main factors that can affect species vulnerability (Brook et al., 2008; Halliday, 2008; Rezende et al., 2011; Katzenberger et al., 2018; Spencer et al., 2018). Many studies have tried to identify the species and communities currently living close to their upper thermal physiological limits, and that are exposed to higher risk of suffering physiological stress (Somero, 2005; Helmuth et al., 2010). The study on thermal sensitivity allows to identify species and/or communities most vulnerable to global warming, particularly for organisms extremely dependent on temperature, such as the amphibian group, which correspond to an important part of the world's biodiversity (Katzenberger et al., 2012) and currently presents at least 41% of species as threatened of extinction (IUCN, 2019). Thus, in the era of rapid anthropogenic climate change, understand these threats has become ever more important (Sunday et al., 2010; Rezende et al., 2011).

The increase in temperature and climate change has already been pointed out in several studies (Pachauri et al., 2014; IPCC, 2014), as well as its consequences for many organisms including amphibians (Tejedo et al., 2010; Duarte et al., 2012; Katzenberger et al., 2012; Richter-Boix et al., 2015; Gutiérrez-Pesquera et al., 2016; Oyamaguchi et al., 2017; Katzenberger et al., 2018; Vasconcelos et al., 2018). It was anticipated that changes in climate by 2070th could be the major factor for declines of amphibian populations along the world (Newbold, 2018), resulting in displacement of species geographical distribution (Zank et al., 2014; Vasconcelos and Nascimento, 2016; Vasconcelos et al., 2017), changes in the breeding phenology (Beebee, 2002; Walpole et al., 2012; Klaus and Loughheed, 2013; Li et al., 2013; Ficetola and Maiorano, 2016; Green, 2017; Cohen et al., 2018; Sheridan et al., 2017), and mainly variation in the thermal niche (Parmesan, 2006; Tejedo et al., 2012). These large effects

of global warming on species lifespan occur since temperature is a fundamental abiotic component influencing on the survival, growth and dispersion of organisms (Angilletta, 2009).

Negative effects on the increase in temperature have been reported for amphibians (Katzenberger et al., 2018; von May et al., 2019) and there is currently no quantification and extent of impacts, not even for the better studied groups such as birds and mammals (Pacifci et al., 2018).

Amphibians have a set of physiological, ecological and life history characteristics that make them quite susceptible to changes in the environment (Katzenberger et al., 2012), such as skin permeability, the need for numerous types of habitats (e.g., waterbodies, terrestrial shelters) to complete their complex two-phase life cycle (aquatic and terrestrial phase), as well as low dispersion capacity (Wells, 2007; Katzenberger et al., 2012). In amphibians, most physiological processes change rapidly over a range of body temperatures (Katzenberger et al., 2018) determining the thermal performance curve (TPC) (Huey and Stevenson, 1979). The curve gradually increases from a critical minimum temperature (CT_{min}), reaches an optimum (T_{opt}), and decreases rapidly to a critical maximum (CT_{max}). Temperatures above or below these limits (CT_{max} and CT_{min} , respectively) may affect the survival and performance of organisms through impairment of vital physiological systems, such as locomotion, growth, development, reproduction (Angilletta et al., 2002), and may lead to the organism death (Katzenberger et al., 2012). Information on the species performance and how changes in environmental temperatures affect physiologically species (Katzenberger et al., 2018) can be obtained through estimates of TPC, using the Thermal Safety Margin (TSM), Warming Tolerance (WT), Cooling Tolerance (CT), and Optimum Temperature (T_{opt}). This approach is used to describe the thermal state of a species (Deutsch et al. 2008), as well as to represent how much that species supports under the increase or decrease of temperatures, and where occurs the best physiological performance of species.

In the past, there are indications that the Brazilian southern region in lower quaternary, had a cold and dry climate with predominance of grasslands (Behling et al., 2004). Currently, the subtropical state of Rio Grande do Sul State (RS), in Southern South America, is a transitional zone between tropical and temperate climates with clear seasonality defining cold (autumn/winter) and heat (spring/summer) seasons, with rainfall evenly distributed throughout the year (Overbeck et al., 2007). This temporal heterogeneity in subtropical/temperate ones (along seasons) may determine thermal adaptation of species (Sunday et al., 2014; Madalozzo, 2018). There is evidence that anuran species co-distributed in the same climatic zone or biome can present distinct ecophysiological patterns, behaving sometimes as tropical or sometimes temperate species (Duarte et al., 2012). Being seasonality a factor that can influence both, CT_{max} and T_{opt} , which may indicate an adaptation in the thermal niche of species according to the local environmental conditions (Angilletta, 2009; Richter-Boix et al., 2015). Therefore, environments that naturally experience high climatic seasonality can count on species at different levels of vulnerability and biological performance in the same community, depending on the species' ecophysiological adaptations to each season (Katzenberger, 2014).

The temperature is the main determinant of the phenological change (Beever et al., 2017) in environments that exhibit greater environmental seasonality, and this temporal heterogeneity stimulate sympatric species to be active in different periods (Kearney et al., 2009; Huey et al., 2012). The increase of temperatures in open areas such as grasslands means the increase in evapotranspiration, which accompanied by the reduction of rainfall result in shorter hydroperiod of waterbodies (Katzenberger et al., 2012). Consequently, a decrease or even cessation of water flow in the ponds can result in increase of water temperature and modify thermal performance or increase mortality of tadpoles. And even if species could adjust rapidly to these shorter hydroperiods, and change their breeding phenology, overlapping breeding periods of several species can increase the density of tadpoles in the ponds, resulting in

competitive exclusion (Katzenberger et al., 2012). In this way, open areas and intense seasonality can present species with different thermal adaptations in order to adapt to different sources of environmental variation, and this is reflected in the observed interspecific divergence of the physiological limits within the microhabitats (Madalozzo, 2018). Being that, grasslands are quite susceptible to temperature increases due to their open areas with vegetation herb, shrub and treelet species co-occurring within the grass matrix, characteristic of the Pampa biome (Overbeck et al., 2007). And this susceptibility to temperature increases can affect species making them experience temperatures that can damage their performance. Therefore, understanding how the performance curves of these species work will enable us to know what are the vulnerabilities. In this way, the objective of the present study was to investigate the biological performance of phylogenetically close anuran species with different breeding phenologies and to analyze their potential vulnerability to the global warming scenario.

5. Material and methods

5.1. Sampling and studied species

Tadpoles are restricted to the aquatic environment, isothermal to the surrounding environment because of their small size and have limited potential for thermoregulation (Lutterschmidt and Hutchinson 1997; Wu and Kam 2005). Hence, intuitively, terrestrial stages are more likely to encounter more extreme temperatures than aquatic larvae, but they have also a greater opportunity for behavioural thermoregulation (Enriquez-Urzelai et al., 2019). Due to these conditions, aquatic larval amphibians are ideal models to analyse thermal adaptations (Gutiérrez- Pesquera et al., 2016). Here, we used tadpoles of three phylogenetically closed anuran species in order to demonstrate that patterns currently found (e.g. thermal limits patterns, optimum temperature) may be more closely related to responses to environmental changes of the microclimate experienced by species than their evolutionary history of phylogenetically

close species (according (Madalozzo, 2018)). We choice as biological model in our study Leiuperinae dwarf frogs (Leptodactylidae): *Physalaemus cuvieri*, *Physalaemus gracilis*, and *Physalaemus henselii*. These species present distinct patterns in both breeding phenologies and geographical distributions (Fig. 1): *Physalaemus cuvieri* is a spring/summer breeder, with wide geographical distribution encompassing south, southeast, central and northeast Brazil, eastern Paraguay and Argentina (Misiones, Corrientes and Entre Rios), northern Uruguay and in the Departments of Beni and Santa Cruz in Bolivia (Kwet et al., 2010, Frost, 2019). *Physalaemus gracilis* is a spring/summer breeder, with geographical distribution in the Brazilian state of Rio Grande do Sul and Uruguay (Maneyro and Carreira, 2012; Frost, 2019); populations occurring in Brazilian states of Paraná, Santa Catarina and northern Rio Grande do Sul probably are *P. carrizorum* (Cardoso and Pereyra, 2018). *Physalaemus henselii* is autumn/winter breeder, and belongs to the *Physalaemus* species group with the most austral distribution known (Lourenço et al., 2015), encompassing the Brazilian states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, Uruguay, as well as the Argentine provinces of Entre Rios and Buenos Aires (Maneyro and Carreira, 2012; Frost, 2019).

Tadpoles were collected (in the years 2017-2018) using a long-handled metal mesh (mesh of 2mm²) in the edges of natural ponds at the municipalities of São Sepé and Santa Margarida do Sul, in the Pampa biome of the Rio Grande do Sul state, southern Brazil (Fig. 1). The climate of this region is classified as temperate humid (TE UM) (Maluf, 2000), with seasonality mainly related to variation in temperature and photoperiod. Rainfall is evenly distributed throughout the year (Overbeck et al., 2007), but can occurs superficial water deficit during the summer months due to the high rates of water evaporation in this season (Radin, 2017; Wrege et al., 2012). Tadpoles were previously identified in field using the experience of one of the authors, it was stored in thermal plastic boxes containing pond's water and transported to the Laboratory of Herpetology of the Universidade Federal de Santa Maria

(UFSM), Santa Maria municipality, Brazil. In the lab, tadpoles were identification confirmed according to the original descriptions (Langone, 1989; Kolenc et al., 2006) and selected only those with developmental stages between 25–30 (Gosner, 1960) to compose the thermal acclimation treatments, avoiding possible changes in thermal resistance related to the metamorphosis climax (Floyd, 1983). Next, tadpoles were placed in plastic containers with similar densities (2 L) and maintained at 20°C under natural 12 L: 12 D photoperiod, and fed ad libitum for a minimum of 3–4 days' - time enough to allow a stabilization in thermal limits determination (Brattstrom, 1968).

5.2. Pond thermal predictors and regional thermal predictors

We monitored the thermal profile of three breeding sites (ponds) commonly used as reproduction sites of the three species in the municipalities of São Sepé (habitats 1 and 2) and Santa Margarida do Sul (habitat 3, Table 1), using aquatic data loggers recording (HOBO pendant®). Each data logger was installed in the deepest region of the breeding ponds and recorded water temperature every 15 minutes during the larval season (sampling days ranging from 30 to 497 days). The deepest region of ponds represents the microhabitat with the lowest temperatures (Newman, 1989) and is considered as the last refuge that the tadpoles could eventually occupy in events of extreme environmental temperatures (Duarte et al., 2012). We analysed the following microenvironmental climatic predictors for the months with species tadpole's presence (in lower case and italic to distinguish for analogous large climatic predictors): maximum (*tmax*), minimum (*tmin*) and mean daily temperatures (*tmean*). Also, we used historical data of Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) from meteorological stations (Bom Jesus, Bagé and Santa Maria) closer to cities where we had microclimatic data, in order to verify the relations of the temperature of the air and the water. Of these data, we use maximum, minimum, average compensated temperature and average wind speed. In addition,

we analysed the thermal profiles of ponds available in the municipalities of Pedras Altas (habitat 4) and Vacaria (habitat 5), in order to expand the range of thermal profiles available as breeding sites to the species used in the present study (Table 1).

5.3. Thermal acclimation treatments

Temperature sensitivity curves of the tadpoles were estimated using six temperature treatments selected within the thermal range recorded in the monitored ponds (15°C, 20°C, 23,5°C, 27°C, 31°C, and 35°C), which a priori allow some growth level. Each treatment consisted of a total of 15 randomly selected tadpoles (n = 90 individuals of each species), one tadpole for each plastic containers (containing 350 ml of water). The plastic containers in each treatment were arranged in plastic boxes containing water (baths) where the water level in the containers was below the level of the bath water, thus allowing the bath temperature to be the same as for the plastic containers. The temperature inside the baths was controlled with aquarium heaters connected to thermostats. In each bath, care was taken to avoid possible thermal gradients, temperature variations, or photoperiod (12 L: 12 D) using water circulators in each bath, artificially controlled photoperiod, and dataloggers inside the baths to monitor the temperature. The plastic containers with the tadpoles had an individual oxygenation system (aerator), avoiding oxygen drop due to the decomposition of food and faeces (Fig. 2). All baths were checked daily for oxygenation and water level, and each vessel was manually monitored for temperature using a fast reading thermometer Miller & Weber (accuracy of 0.1°C). The water in the containers was changed every two days, while food (rabbit feed) was daily administered (0.15 g) for each specimen. The experiments lasted for 11 days, and the tadpoles were weighed before starting the experiment, every two days during the experiment and at the end of the experiment. The tadpoles used in the experiments were anesthetized with 10%

lidocaine, preserved in 10% formalin, and housed in the Herpetological Collection of UFSM (ZUFMSM).

5.4. Statistical analyses

The thermal profile of the breeding ponds was determined by inspection of data obtained from data loggers using the HOBOWare® software (Onset Computer Corporation, 2019). We used only the temperatures of the months in which tadpoles of each species occurred in the habitat (i.e. the phenological period of each species). Thus, the natural variation of temperature in the ponds was determined by histograms of frequencies of the thermal data recorded in those specific months. The thermal sensitivity of tadpoles was estimated by the growth rate, defined as: $GR = (\text{Final Weight} - \text{Initial Weight}) / \text{number of days}$; expressed in g / days of growth through analysis of variance (two-way ANOVA). To calculate the survival difference in acclimations between species we use one-way ANOVA followed by Tukey's test. For each species, the performance amplitude was calculated (B80, temperature amplitude in which the performance values exceeded 80% of the maximum, Huey and Stevenson, 1979). Additionally, we calculate the performance range B50%. Growth curve adjustments were performed in the Statistica 10 software (Statsoft, 1984-2011). We calculate the Thermal Safety Margin (TSM), Warming Tolerance (WT) and Cooling Tolerance (CT) to evaluate species vulnerability. TSM as characterized as the difference between the optimum temperature of a species and the body's current environmental temperature (Katzenberger et al., 2012), that describes the state of a species (Deutsch et al., 2008), through the calculation $TSM = T_{opt} (\text{average temperature}) - Tamb$ (mean of ambient temperature). To estimate WT of species, we followed the proposal of Deutsch et al. (2008), where: $WT = CT_{max} - Tamb_{max}$ (maximum local ambient temperature), and to estimate CT as $(tmin - CT_{min})$ (sensu Gutiérrez- Pesquera et al., 2016). In addition, we added a scenario with a +4° C increase in TSM, WT and CT calculations with the intention of

understanding whether species may be vulnerable with the temperature increases predicted by the IPCC (2014) and in some climate models (Winter et al. 2016). To calculate the relations of the INMET data and the dataloggers we did a regression using R software (R development Core Team, 2016).

6. Results

6.1. Tadpole growth and tadpole survival

Tadpoles of *Physalaemus cuvieri* not showed significant growth between acclimations ($F = 4.37$; $p = 0.1656$), but showed little growth in colder temperatures, dying during 15°C acclimation (Table 2). The T_{opt} for this species was 31°C. According to the environmental predictors collected, *Physalaemus cuvieri* does not experience temperatures above the optimum in any of the three studied habitats (Fig. 3). T_{opt} of *Physalaemus gracilis* was 29°C, and currently it is already experiencing two temperatures above the optimum temperature (6% in habitat 1 and 30% habitat 2; Fig. 3 - d, f). In comparison with *Physalaemus cuvieri* and *Physalaemus henselii*, *P. gracilis* showed intermediate growth in relation to high and low temperatures ($F = 4.52$; $p < 0.001$). *Physalaemus henselii* presented the highest growth rates in relation to the other two species, with T_{opt} in the acclimation of 20°C. *Physalaemus henselii* showed lower growth in higher temperatures ($F = 3.34$; $p < 0.001$), and above 31°C the tadpoles died. Currently, *Physalaemus henselii* experiences temperatures above the optimum in two habitats (10% in habitat 1 and 25% habitat 2; Figure 3 - g, h). We found that the tadpole' survival time differed significantly among species and thermal acclimations: *Physalaemus cuvieri* ($p = 0.001$), *P. gracilis* ($p < 0.001$), and *P. henselii* ($p < 0.001$). For both *Physalaemus gracilis* and *P. henselii* there were differences in survival time mainly in hot acclimatization (35°C). Contrary, *Physalaemus cuvieri* there was a difference in the colder acclimatization (15°C) (see Table 2; Fig. 5).

6.2. Thermal Safety Margin (TSM), Warming Tolerance (WT) and Cooling Tolerance (CT)

Physalaemus henselii was the most vulnerable species, since tadpoles experienced temperatures above-optimal in all habitats monitored, resulting in negative values of TSM (Table 2). *Physalaemus gracilis* currently presents narrow TSM (i.e., optimal temperatures very close to ambient temperatures), especially in habitat 1 where the TSM was only 0.29. *Physalaemus cuvieri* is less vulnerable regarding to TSM since provided there is no increase in temperature. All species increased vulnerability (i.e. decreases in TSM) when considered a more unfavorable climatic scenario (with the increase of 4°C) (Table 3). Regarding WT, *Physalaemus gracilis* showed the most worrying results, since the difference between maximum environmental temperature and CTmax was very low (just 1.79°C). Contrary to TSM results, *Physalaemus henselii* presented the better results than other two species to WT. All species presented significant decreases of WT when considering a climatic scenario with increase of 4°C (Table 4). *Physalaemus cuvieri* showed the lowest CT results and possibly more are susceptible to stress at lower temperatures than *Physalaemus gracilis* and *P. henselii* (Table 5).

6.3. Microclimatic and macroclimatic data

We find a positive relation between the air temperature and pond water temperatures (Fig. 5). However, water temperature of ponds located in Pedras Altas and Santa Margarida do Sul presented stronger co-variation with air temperature (i.e. a straight correlation) than those reported for ponds in Vacaria and São Sepé (Fig. 6).

7. Discussion

We reported here that water temperature affected growth rate and survival of tadpoles, but that species differed in optimal temperatures, as well as in current and future susceptibility to thermic stress. The increases in water temperature negatively affect the three species, mainly *Physalaemus henselii* that not tolerated temperatures above 29°C. Increases in temperature will also affect aquatic habitats by shifting the thermal profiles of ponds, and possibly damaging the growth of tadpoles. Growth rates are one of the factors that determine the success of populations (Savage et al., 2004), because a larger size is associated with better physical conditioning, besides avoid predation in the case of tadpoles (Heyer et al., 1975; Richards and Bull, 1990). Still, size is largely related to the rates of growth throughout the life stages of individuals to adulthood (Kingsolver et al., 2004). The higher growth rate in hotter acclimations for tadpoles of *Physalaemus cuvieri* and higher growth rate in colder acclimations for both *P. gracilis* and *P. henselii* tadpoles is related to the thermal sensitivity of the species and, consequently, to breeding phenology. The environmental variation in the habitat of aquatic larvae also promotes changes in growth rates (Tejedo et al., 2010), which explains that species monitored in the same environment differed in growth along acclimations. Thus, species adapted to warmer environments with high heat tolerances (i.e. *P. cuvieri* and *P. gracilis*), present higher growth in high temperatures, while species adapted to cold (i.e. *P. henselii*) (Maneyro and Carreira, 2012; Nowakowski et al., 2017, Madalozzo, 2018) presented higher rates in colder temperatures.

In any monitored habitat *Physalaemus cuvieri* experiences higher temperatures than its T_{opt} , since ectotherms generally tend to select and occupy environments with temperatures below those at which fitness is highest (Martin and Huey, 2008). We found two species that already experience temperatures above the T_{opt} in three monitored habitats for *Physalaemus gracilis* and *P. henselii*, differently found in the work of Pérez (2013). Even at lower

frequencies, we cannot eliminate possibility of temperatures above the T_{opt} in ponds, can cause damages on species physiological performance since a range of processes such as reproductive success and individual physical fitness are affected by physiology (Seebacher and Franklin, 2012).

TSM's have been used to predict the variation of species vulnerability to climate warming (Gunderson and Stillman 2015) and may provide useful metrics for modelling vulnerability to new thermal environments resulting from habitat modification (Nowakowski et al. al., 2017). This metric measures the interaction between tolerance and exposure to high temperatures while explaining the ability of ectotherms to reduce body temperatures through microhabitat selection and evaporative cooling (Nowakowski et al. 2017). *Physalaemus henselii* may be vulnerable, similar to reported for some species of temperate climate (Duarte et al., 2012), since it is already experiencing temperatures above the optimum and any increases in these habitats can lead to performance damage. Since, lower the thermal safety margin in a given environment, the more likely an organism to overheat (and possibly die) with climate warming (Sinclair et al., 2016). *Physalaemus henselii* presented in habitat 1 (Figure 2a) a TSM narrower than *Physalaemus cuvieri*, because it already lives in habitats that exceed its T_{opt} . Here, we showed that an increase greater than 0.29°C in habitat 1 could possibly cause damage to this species. *Physalaemus cuvieri* is the least vulnerable species when we compare the TSM values of the other monitored species. Since *Physalaemus cuvieri* is widely distributed and frequently founded in hot and dry climates, the tendency is to persist or thrive locally in disturbed habitats (Frishkoff et al., 2016), although there is no detailed work evaluating this species as generalist in terms of thermal physiology.

It is expected that width of species thermal tolerance at the seasonal equatorial region present minimal variation, if compared to species at higher latitudes where the seasonality is more intense (Sunday et al., 2014), as in the case of the studied area. According to the increase

in temperature their warming tolerances may be relatively small (Duarte et al., 2012). *Physalaemus henselii* was the species that presented a small difference of WT in the scenario of increase of 4°C; this will generate great reductions in the physiological performance (Seebacher and Franklin, 2012), and even a large potential for greater local extinction risk (Duarte et al., 2012), a result that has been observed for other temperate species (Duarte et al., 2012; Gutiérrez-Pesquera et al., 2016). According to Gutiérrez-Pesquera (2016), tadpoles in temperate-zone had broader thermal tolerances than tropical ones due to its resistance to cold caused by falls in minimum temperatures. Species that acquire more cold resistance had an association cost in heat resistance, due to the physiological compensations between the thermal limits (Janzen, 1967). Since, the winter breeder's may have enhanced physiological cold resistance through the decrease of your optima thermal performance, as *Physalaemus henselii*, to occupy empty temporal niches in cold seasons (Madalozzo, 2018).

Our study was important because optimum temperature mapping provides an intuitive heuristic model in relation to temperature impacts or climate changes on the ecology and physiology of organisms (Sinclair et al., 2016). Mainly to understand the physiological plasticity capacity of organisms, and understand the limits to compensate for this environmental change (Evans and Hoffman, 2012), since studies (McCaffery and Maxell, 2010) assume that behavioural adaptation will be minimal. Thus, the conservation physiology can make a significant contribution because the understanding of the plasticity of the physiological responses of the species will allow the modelling of ecological responses (Moritz et al., 2012, Steffensen et al., 2008) and predictions of the impact of future environmental changes. Since TPC's offer us at least an opportunity to explore broad-based climate change (Sinclair et al., 2016), especially when considering micro-climatic data scales. Studies have already highlighted the importance of local data and their influence on the thermal adaptation of the species (Navas et al., 2013; Gutiérrez-Pesquera et al., 2016; Madalozzo, 2018; Katzenberger et

al., 2018). Microclimate and life history details (e.g. phenological adjustments and phylogenetic history) can provide more realistic data on which species experience for traditional macro-scaling research (Scheffers et al., 2014; Gutiérrez-Pesquera et al., 2016). We can observe that the air temperature had a greater influence on the shallower ponds (Pedras Altas and Santa Margarida do Sul) than on the deeper ponds (Vacaria and São Sepé; Fig. 6). Therefore, habitat heterogeneity should be taken in account when metrics of anuran breeding sites are incorporated in these analyses. In fact, microclimates can mitigate extreme temperatures caused by heat or dry waves (i.e. warming of the atmosphere) by substantially altering the thermal amplitude on a local scale (Potter et al., 2013). Environments with high heterogeneity of thermal microhabitats can enable species with high thermal plasticity (behavioural thermoregulation or acclimatization) to maintain body temperature close to optimum performance, avoiding the selection force (Huey et al., 2012). In addition, extreme temperatures of microhabitats in aquatic habitats play an important role in the adjustment of physiological resistance through thermal selection (Angilletta, 2009). However, predicting an organism's response to climate change can be challenging due to the interactions among extrinsic and intrinsic factors (Oyamaguch et al., 2017), but analysis of thermal performance curves of the species is an important component in understanding species vulnerability. Specially, if used as tool in modelling niche to anticipate the climate change species distribution of a wide range of taxa and also to generate conservation strategies (Vasconcelos et al., 2018) in face of the climate change.

Acknowledgments

We are grateful to ICMBio-IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - licence no. 59715-1) and CEUA-UFSM (Comitê de ética da Universidade Federal de Santa Maria) for providing the sample and experiments permit, respectively. T.C. André is grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal

de Nível Superior) for the MSc fellowship. T.G. Santos is grateful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the research fellowship (process #307352/2013–7).

References

- Angilletta, M.J., Niewiarowski, P.H., Navas, C.A., 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of thermal Biology*, 27(4), 249–268.
- Angilletta, M.J.J., 2009. *Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis*. Oxford University Press, Oxford.
- Beebee, T.J., 2002. Amphibian Phenology and Climate Change. *Conservation Biology*, 16(6), 1454–1455.
- Beever, E.A., Hall, L.E., Varner, J., Loosen, A.E., Dunham, J.B., Gahl, M.K., Smith, F.A., Lawler, J.J., 2017. Behavioral flexibility as a mechanism for coping with climate change. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15, 299–308.
- Behling, H., Pillar, V.D., Orlóci, L., Bauermann, S.G., 2004. Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 203(3–4), 277–297.
- Brattstrom, B.H., 1968. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comparative Biochemistry and physiology*, 24(1), 93–111.
- Brook, B.W.; Sodhi, N.S., Bradshaw, C.J.A., 2008. Synergies among extinction drivers under global change. *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 453–460.
- Cardozo, D.E., Pereyra, M.O., 2018. A new species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) from the Atlantic Forest of Misiones, northeastern Argentina. *Zootaxa*, 4387(3), 580–90.
- Cohen, J.M., Lajeunesse, M.J., Rohr, J.R., 2018. A global synthesis of animal phenological responses to climate change. *Nature Climate Change*, 8, 224–228.
- Collins, J.P., Crump, M.L., 2009. *Extinction in our times: global amphibian declines*. Oxford University Press, England, UK.
- Green, D.M., 2017. Amphibian breeding phenology trends under climate change: predicting the past to forecast the future. *Global Change Biology*, 23, 646–656.
- Deutsch C.A., Tewksbury J.J., Huey R.B., Sheldon K.S., Ghalambor C.K., Haak D.C., Martin P.R., 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *PNAS*, 105, 6668–6672.

- Duarte, H., Tejedo, M., Katzenberger, M., Marangoni, F., Baldo, D., Beltrán, J.F., Martí, D.A., Richter-Boix, A., and Gonzalez-Voyer, A., 2012. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Glob. Change Biol.*, 18, 412–421.
- Enriquez-Urzelai, U., Sacco, M., Palacio, A. S., Pintanel, P., Tejedo, M., Nicieza, A. G., 2019. Ontogenetic reduction in thermal tolerance is not alleviated by earlier developmental acclimation in *Rana temporaria*. *Oecologia*, <https://doi.org/10.1007/s00442-019-04342-y>.
- Evans, T.G., Hofmann, G.E., 2012. Defining the limits of physiological plasticity: how gene expression can assess and predict the consequences of ocean change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 367, 1733–1745.
- Ficetola, G.F., Maiorano, L., 2016. Contrasting effects of temperature and precipitation change on amphibian phenology, abundance and performance. *Oecologia*, 181(3), 683–693.
- Floyd, R.B., 1983. Ontogenetic change in the temperature tolerance of larval *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae). *Comp Biochem Physiol.*, 75, 267–271.
- Frishkoff, L.O., Karp, D.S., Flanders, J.R., Zook, J., Hadly, E.A., Daily, G.C. et al., 2016. Climate change and habitat conversion favour the same species. *Ecol. Lett.*, 19, 1081–1090.
- Frost, D. R., 2019. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190.
- Gunderson, A.R., Stillman, J.H., 2015. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. In: *Proc. R. Soc. B. The Royal Society*, 282(1808), 20150401.
- Gutiérrez-Pesquera, L.M. et al., 2016. Testing the climate variability hypothesis in thermal tolerance limits of tropical and temperate tadpoles. *Journal of Biogeography*, 43(6), 1166–1178.
- Halliday, T.R., 2008. Why amphibians are important. *International Zoo Yearbook*, 42, 7–14.
- Helmuth B., Broitman B.R., Yamane L., Gilman S.E., Mach K., Mislan K.A.S, Denny M.W., 2010. Organismal climatology: analyzing environmental variability at scales relevant to physiological stress. *Journal of Experimental Biology*, 213, 995–1003.
- Heyer, W.R., McDiarmid, R.W., Weigmann, D.L., 1975. Tadpoles, Predation and Pond Habitats in the Tropics. *Biotropica*, 7(2), 100–111.
- Hoffmann, M. et al., 2010. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, 1194442.

Huey, R.B., Kearney, M.R., Krockenberger, A., Holtum, J.A., Jess, M., Williams, S.E., 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 367(1596), 1665-1679.

Huey, R.B., Stevenson, R.D., 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A discussion of approaches. *Integr Comp Biol.* 19, 357–366.

IPCC. In: Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., et al. (Eds.), 2014. Emergent risks and key vulnerabilities. *Climate Change Impacts, Adaptation, and Vulnerability Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1039–1099). Cambridge, NY: Cambridge University Press, UK and New York.

IPCC. Hoegh-Guldberg, O., Jacob, D., Taylor, M., Bindi, M., Brown, S., Camilloni, I., Diedhiou, A., Djalante, R., Ebi, K., Engelbrecht, F., et al., 2018. Impacts of 1.5°C global warming on natural and human systems. In: *Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty.* Cambridge, NY: Cambridge University Press, UK and New York.

IUCN. 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. Available in: <https://www.iucnredlist.org>.

Janzen, D.H., 1967. Why mountain passes are higher in the tropics. *The American Naturalist*, 101(919), 233-249.

Katzenberger, M., Tejedo, M., Duarte, H., Marangoni, F., Beltrán, F., 2012. Tolerância e sensibilidade térmica em anfíbios. *Revista da Biologia*, 8, 25-32.

Katzenberger, M., Hammond, J., Duarte, H., Tejedo, M., Calabuig, C., Relyea, R. A., 2014. Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. *PloS one*, 9(5), e98265.

Katzenberger, M., Hammond, J., Tejedo, M., Relyea, R., 2018. Source of environmental data and warming tolerance estimation in six species of North American larval anurans. *Journal of Thermal Biology*, 76, 171-178.

Kearney, M., Shine, R., Porter, W.P., 2009. The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3835-3840.

Kingsolver, J.G., Izem, R., Ragland, G.J., 2004. Plasticity of Size and Growth in Fluctuating Thermal Environments: Comparing Reaction Norms and Performance Curves. *Integr. Comp. Biol.*, 44, 450–460.

Klaus, S.P., Loughheed, S.C., 2013. Changes in breeding phenology of eastern Ontario frogs over four decades. *Ecology and Evolution*, 3(4), 835–845.

- Kolenc, F., Borteiro, C., Tedros, M., Núñez, D., Maneyro, R., 2006. The tadpole of *Physalaemus henselii* (Peters) (Anura: Leiuperidae). *Zootaxa*, 1360(1), 41–50.
- Kwet, A., Lingnau, R., Di-Bernando, M., 2010. Pró-Mata: anfíbios, amphibien – amphibians, Serra Gaúcha. Porto Alegre: EdiPUCRS.
- Langone, J.A., 1989. Descripción de la larva de *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 12, 1–11.
- Li, Y. Cohen, J. M. R., Rohr, J. R., 2013. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology*, 8(2), 145-61.
- Lourenço, L.B., Targueta, C.P., Baldo, D., Nascimento, J., Garcia, P.C.A. 2015. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92, 204-216.
- Lutterschmidt, W.I., Hutchison, V.H., 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1561-1574.
- Madalozzo, B., 2018. Variação latitudinal nos limites de tolerância e plasticidade térmica em anfíbios em um cenário de mudanças climáticas: efeito dos micro-habitats, sazonalidade e filogenia. 2018. 163 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Biodiversidade Animal) – Universidade Federal de Santa Maria.
- Maluf, J.R.T., 2000. Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 8, 141-150.
- Maneyro, R., Carreira, S., 2012. Guía de anfíbios del Uruguay. Montevideo: ediciones de la Fuga.
- Martin, T.L, Huey, R.B., 2008. Why “suboptimal” is optimal: Jensen’s inequality and ectotherm thermal preferences. *American Naturalist*, 171, 102–118.
- McCaffery, R.M., Maxell, B.A., 2010 Decreased winter severity increases viability of a montane frog population. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 8644–8649.
- Moritz, C., Langham, G., Kearney, M., Krockenberger, A., VanDerWal, J., Williams, S., 2012. Integrating phylogeography and physiology reveals divergence of thermal traits between central and peripheral lineages of tropical rainforest lizards. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367, 1680-1687.
- Navas, C.A., Carvajalino-Fernandez, J.M., Saboya-Acosta, L.P., Rueda-Solano, L.A., Carvajalino-Fernandez, M.A., 2013. The body temperature of active amphibians along a tropical elevation gradient: patterns of mean and variance and inference from environmental data. *Functional Ecology*, 27, 1145–1154.
- Newbold, T., 2018. Future effects of climate and land-use change on terrestrial vertebrate community diversity under different scenarios. *Proc. R. Soc. B.*, 285(1881).

- Newman, R.A., 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, 70,1775-1787.
- Nowakowski, A.J., Watling, J.I., Whitfield, S.M., Todd, B.D., Kurz, D.J., Donnelly, M.A., 2017. Tropical amphibians in shifting thermal landscapes under land-use and climate change. *Conserv. Biol.*, 31, 96– 105.
- Onset Computer Corporation., 2019. HOBOWARE: Software para dispositivos e registradores de dados HOBO. vs 3.7.12.
- Overbeck, G.E., Müller, S.C., Fidelis, A., Pfadenhauer, J., Pillar, V.D., Blanco, C.C., Forneck, E.D., 2007. Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 9(2), 101-116.
- Oyamaguchi, H.M., Grewal, K., Do, R., Erwin, E., Jeong, N., Tse, K., et al., 2017. Thermal sensitivity of a Neotropical amphibian (*Engystomops pustulosus*) and its vulnerability to climate change. *Biotropica*, 50(2), 326–337.
- Pachauri, R.K. et al., 2014. Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC.
- Pacifici, M., Visconti, P., Butchart, S.H.M., Watson, J.E.M., Cassola, F.M., Rondinini, C., 2018. Species' traits influenced their response to recente climate change. *Nature Climate Change*, 7, 205–208.
- Parmesan, C., 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37, 637-669.
- Pérez, L. P., 2013. Fisiología de la conservación: una aproximación a la vulnerabilidad de anfibios ante el calentamiento global. 33 p. Dissertação. (Mestrado em Etologia) - Universidade de Córdoba.
- Potter, K.A., Arthur Woods, H., Pincebourde, S., 2013. Microclimatic challenges in global change biology. *Global change biology*, 19(10), 2932-2939.
- R Core Team., 2019. R: A language and environment for statistical computing. Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available in: <https://www.R-project.org>.
- Radin, B., Matzenauer, R., de Melo, R.W., Wrege, M.S., Steinmentz, S., 2017. Quantificação e distribuição sazonal da precipitação pluvial nas regiões ecoclimáticas do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 10(4), 1161–1169.
- Rezende, E.L., Tejedo, M., Santos M., 2011. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications. *Funct. Ecol.* 25, 111–121.
- Richards, S.J., Bull, C.M., 1990. Size-Limited Predation on Tadpoles of Three Australian Frogs. *Copeia*, 4, 1041-1046.

- Richter-Boix, A., Katzenberger, M., Duarte, H., Quintela, M., Tejedo, M., Laurila, A., 2015. Local divergence of thermal reaction norms among amphibian populations is affected by pond temperature variation. *Evolution*, 69, 2210-2226.
- Savage, V.M., Gillooly, J.F., Woodruff, W. H., West, G. B., Allen, A.P., Enquist, B. J., Brown, J. H., 2004. The predominance of quarter-power scaling in biology. *Functional Ecology*, 18(2), 257-282.
- Scheffers, B.R., Edwards, D.P., Diesmos, A., Williams, S.E., Evans, T.A., 2014. Microhabitats reduce animal's exposure to climate extremes. *Glob. Chang Biol*, 20, 495-503.
- Seebacher, F., Franklin, C.E., 2012. Determining environmental causes of biological effects: the need for a mechanistic physiological dimension in conservation biology. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 367, 1607–1614.
- Sheridan, J.A., Caruso, N.M., Apodaca, J.J., Rissler, L.J., 2017. Shifts in frog size and phenology: Testing predictions of climate change on a widespread anuran using data from prior to rapid climate warming. *Ecology and Evolution*, 8(2), 1316–1327.
- Sinclair, B.J., Marshall, K.E., Sewell, M.A., Levesque, C.L., Willett, C.S., Slotsbo, S., Dong, Y., Harley, C.D.G., Marshall, D.J., Helmuth, B.S., Huey, R.B., 2016. Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecology Letters*, 19, 1372-1385.
- Somero, G.N., 2005. Linking biogeography to physiology: evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. *Front Zool*. 2(1), 1-9.
- Spencer, R.J., Dyke, J.V., Petrov, K. Ferronato, B., McDougall, F., Austin, M., Keitel, C., Georges, A., 2018. Profiling a possible rapid extinction event in a long-lived species. *Biological Conservation*, 221, 190–197.
- Statsoft, Inc., 1984-2011. STATISTICA (data analysis software system), vs. 10. www.statsoft.com.
- Steffensen, J.P., Andersen, K.K., Bigler, M., Clausen, H.B., Dahl-Jensen, D., Fischer, H., Goto-Azuma, K., Hansson, M., Johnsen, S.J., Jouzel, J., et al., 2008. High-resolution Greenland ice core data show abrupt climate change happens in few years. *Science*, 321, 680–684.
- Sunday, J.M, Bates, A.E, Dulvy, N.K., 2010. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 278, 1823–1830.
- Sunday, J.M., Bates, A.E., Kearney, M.R., Colwell, R.K., Dulvy, N.K., Longino, J.T., Huey, R.B., 2014. Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), 5610-5615.
- Tejedo, M., Duarte, H., Gutiérrez-Pesquera, L. M., Beltrán, J. F., Katzenberger, M., Marangoni, F., Navas, C. A., Nicieza, A. G., Relyea, R. A., Rezende, E. L., et al., 2012. El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 23(2), 2- 27.

- Tejedo, M., Marangoni, F., Pertoldi, C., Richter-Boix, A., Laurila, A., Orizaola, G., Nicieza, A.G., Álvarez, D., Gomez-Mestre, I., 2010. Contrasting effects of environmental factors during larval stage on morphological plasticity in post- metamorphic frogs. *Climate Research*, 43, 31–39.
- Vasconcelos, T.S., Antonelli, C.P., Napoli, M.F., 2017. Mutualism influences species distribution predictions for a bromeliad-breeding anuran under climate change. *Austral Ecology*, 42, 869–877.
- Vasconcelos, T.S., Nascimento, B.T.M. do, Prado, V.H.M., 2018. Expected impacts of climate change threaten the anuran diversity in the Brazilian hotspots. *Ecology and Evolution*, 8, 7894–7906.
- Vasconcelos, T.S., Nascimento, B.T.M. Do., 2016. Potential Climate-Driven Impacts on the Distribution of Generalist Treefrogs in South America. *Herpetologica*, 72(1), 23–32.
- von May, R., Catenazzi, A., Santa-Cruz, R., Gutierrez, A.S., Moritz, C., Rabosky, D.L. 2019. Thermal physiological traits in tropical lowland amphibians: Vulnerability to climate warming and cooling. *Plos One*, 14(8), e0219759.
- Walpole, A.A., Bowman, J., Tozer, D.C., Badzinski, D.S., 2012. Community-level response to climate change: shifts in anuran calling phenology. *Herpetological Conservation and Biology*, 7(2), 249–257.
- Wells, K.D., 2007. Complex life cycles and the ecology of amphibian metamorphosis. The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago Press, Chicago.
- Winter, M., Fiedler, W., Hochachka, W.M., Koehncke, A., Meiri, S., De la Riva, I., 2016. Patterns and biases in climate change research on amphibians and reptiles: a systematic review. *R. Soc. open sci.*, 3, 160158.
- Wrege, M.S., Steinmetz, S., Júnior, C.R., Almeida, I.R.De., Garrastazu, M.C., Caramori, P. H., Herter, F.G., Matzenauer, R., Radin, B., Braga, H.J., Pandolfo, C., Prestes, S.D., Cunha, G R.Da., Maluf, J.R.T., 2012. Atlas Climático dos Estados da Região Sul do Brasil: Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Embrapa Clima Temperado: Pelotas.
- Wu, C.S., Kam, Y.C., 2005. Thermal tolerance and thermoregulation by Taiwanese rhacophorid tadpoles (*Buergeria japonica*) living in geothermal hot springs and streams. *Herpetologica*, 61, 29–35.
- Zank, C., Becker, F.G., Abadie1, M., Baldo, D., Maneyro, R., Borges-Martins, M., 2014. Climate Change and the Distribution of Neotropical Red- Bellied Toads (*Melanophryniscus*, Anura, Amphibia): How to Prioritize Species and Populations?. *Plos One*, 9(4):e94625.

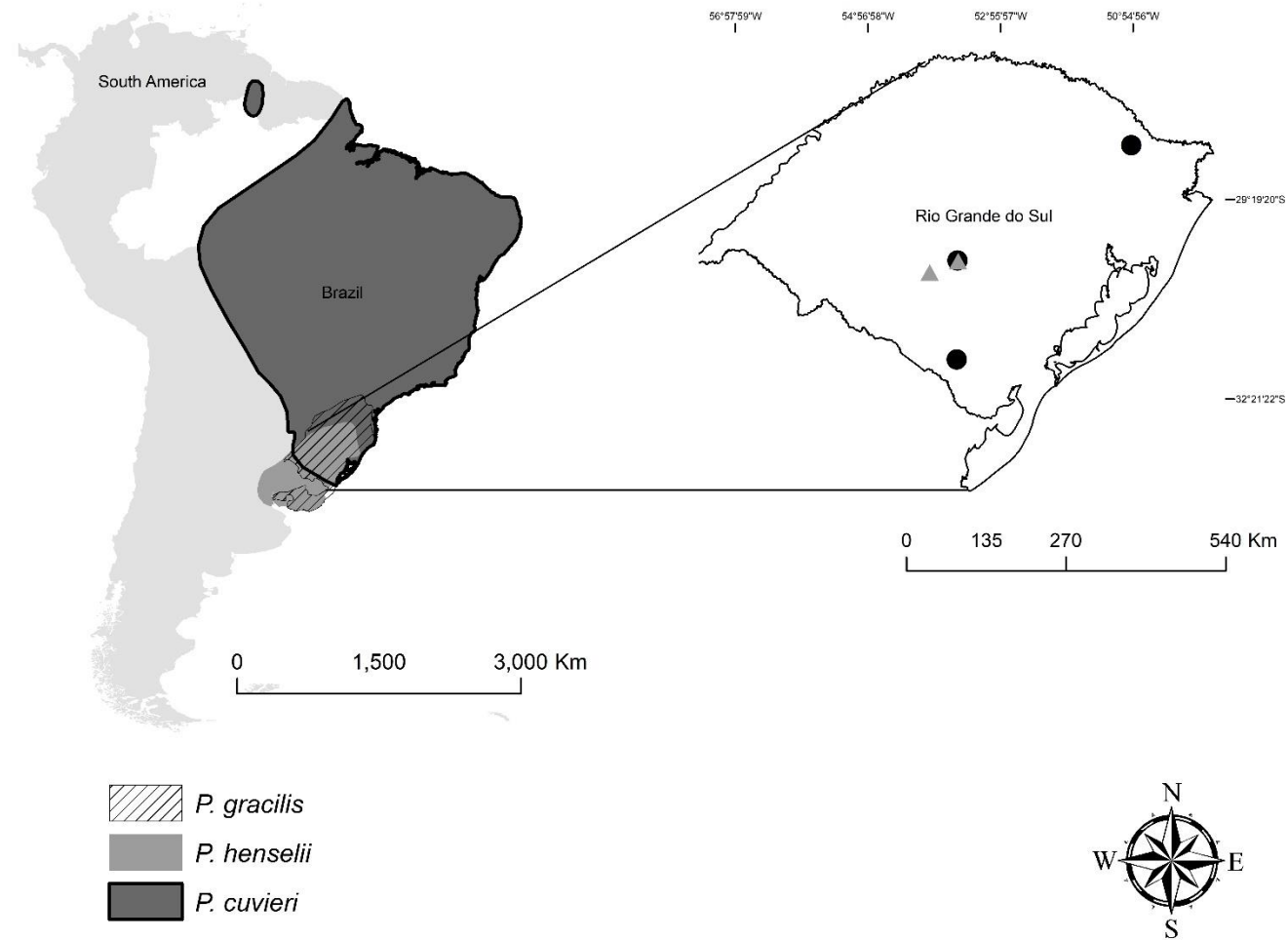


Fig. 1. Map of the distribution of the species of study (*Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis* and *P. henselii*) in South America. And microhabitats where the species were collected for the present work (grey triangle), and temperature data local (black circle).

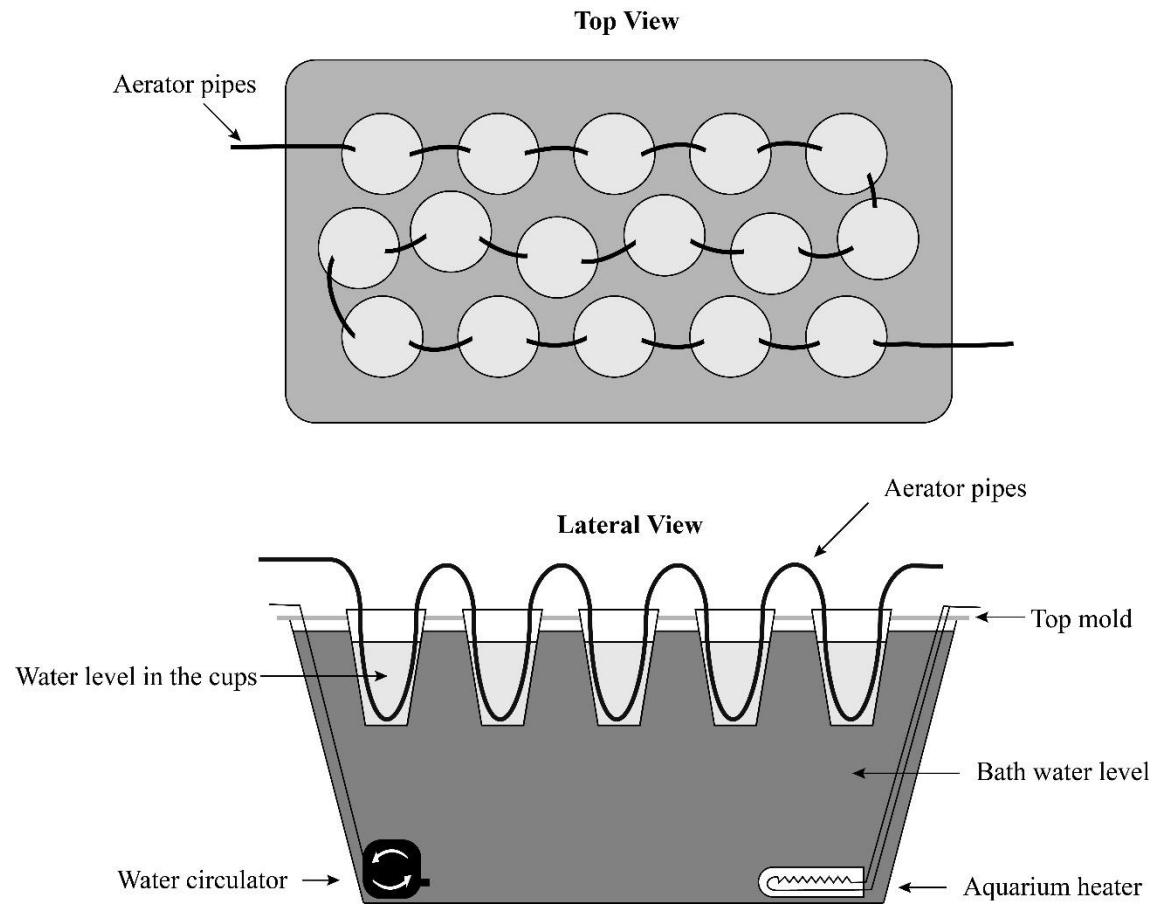


Fig. 2. Model simulating the experiments used to perform tadpole acclimation.

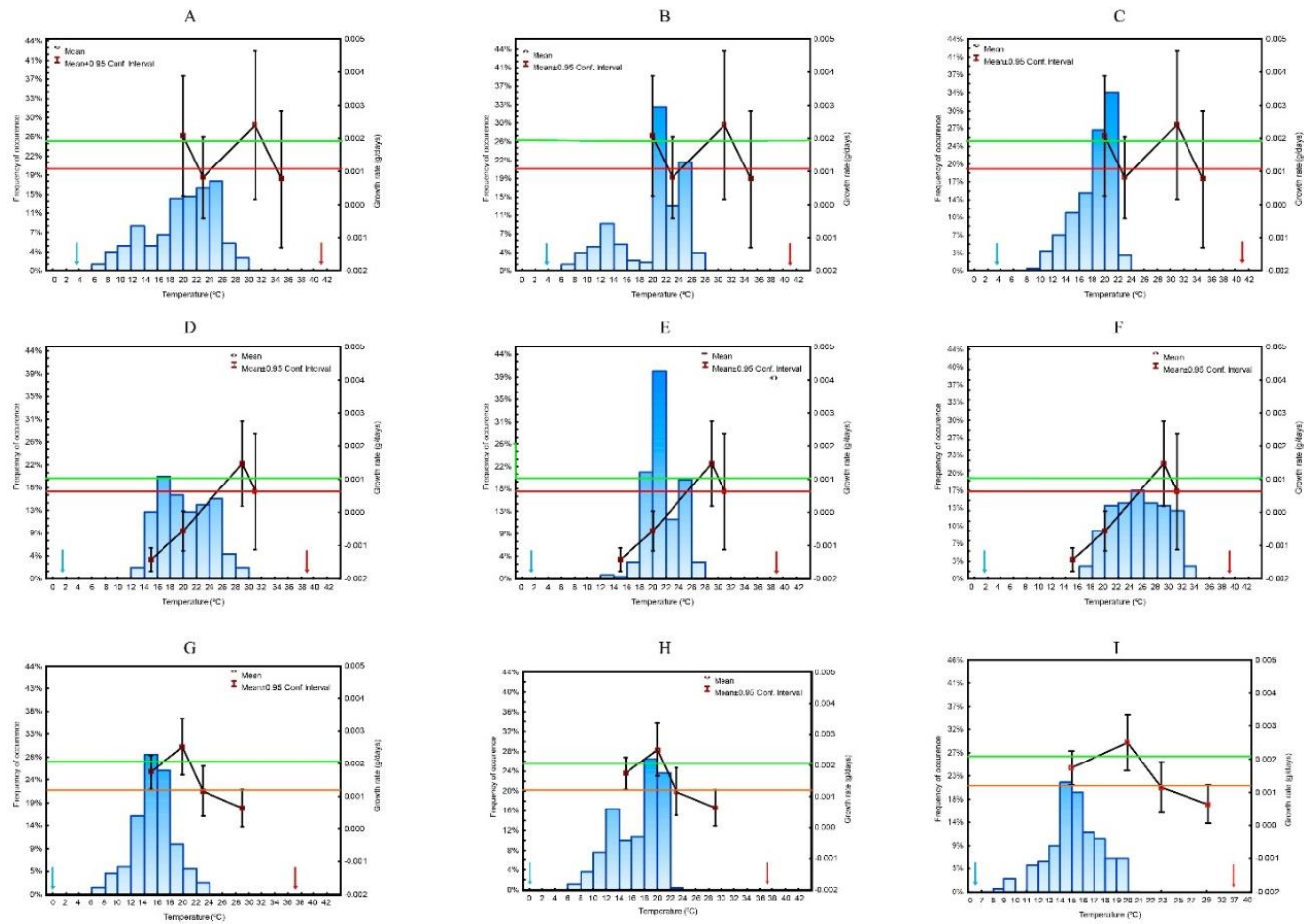


Fig. 3. Representation of growth rate (g/day) for tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (a, b, c), *P. gracilis* (d, e, f), and *P. henselii* (g, h, i) (middle black line \pm confidence intervals 95%). The blue bars represent the histogram of frequency for occurrence of temperatures ($^{\circ}$ C) in three aquatic habitats for each species. The two horizontal lines represent the performance amplitude that exceeded 80% of the maximum (green line), and 50% of the maximum (orange line). Arrows represent the thermal limits of the species according to Madalozzo (2018): CTmin (blue arrow), and CTmax (red arrow).

Table 1. Environmental and climatic characteristics of the habitats used in the analyzes. (Tmax = maximum temperature, Tmin = minimum temperature, reached in these habitats according to *dataloggers*).

Ponds	Depth	Tmax °C	Tmin °C
Vacaria (habitat 5)	150 cm	22.42	13.07
Pedras Altas (habitat 4)	35 cm	33.22	10.74
São Sepé (habitat 1)	150 cm	29.25	6.87
São Sepé (habitat 2)	50 cm	26.87	6.87
Santa Margarida do Sul (habitat 3)	90 cm	25.51	13.07

Table 2. One-way ANOVA followed by Tukey's test comparing differences in survival time for tadpoles of *Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis*, and *P. henselii* raised in six thermal acclimations. P < 0.01 Significant values in bold; P partially significant values underlined (0.05 < P < 0.06).

Species	Acclimation	P
<i>Physalaemus cuvieri</i>	20 °C – 15 °C	<0.001
	23.5 °C – 15 °C	0.186
	29 °C – 15 °C	<u>0.029</u>
	31 °C – 15 °C	<u>0.025</u>
	35 °C – 15 °C	<u>0.060</u>
	23.5 °C – 20 °C	0.309
	29 °C – 20 °C	0.778
	31 °C – 20 °C	0.807
	35 °C – 20 °C	0.610
	29 °C – 23.5 °C	0.972
	31 °C – 23.5 °C	0.963
	35 °C – 23.5 °C	0.996
	31 °C – 29 °C	0.999
	35 °C – 29 °C	0.999
	35 °C – 31 °C	0.999
<i>Physalaemus gracilis</i>	20 °C – 15 °C	0.996
	23.5 °C – 15 °C	0.999
	29 °C – 15 °C	0.999
	31 °C – 15 °C	0.919
	35 °C – 15 °C	<0.001
	23.5 °C – 20 °C	0.956
	29 °C – 20 °C	0.998
	31 °C – 20 °C	0.672
	35 °C – 20 °C	<0.001
	29 °C – 23.5 °C	0.998
	31 °C – 23.5 °C	0.987
	35 °C – 23.5 °C	<0.001
	31 °C – 29 °C	0.894
	35 °C – 29 °C	<0.001
	35 °C – 31 °C	<0.001
<i>Physalaemus henselii</i>	20 °C – 15 °C	0.999
	23.5 °C – 15 °C	0.961
	29 °C – 15 °C	0.961
	31 °C – 15 °C	<0.001
	35 °C – 15 °C	<0.001
	23.5 °C – 20 °C	0.905
	29 °C – 20 °C	0.989
	31 °C – 20 °C	<0.001
	35 °C – 20 °C	<0.001
	29 °C – 23.5 °C	0.565
	31 °C – 23.5 °C	<0.001
	35 °C – 23.5 °C	<0.001
	31 °C – 29 °C	<0.001
	35 °C – 29 °C	<0.001
	35 °C – 31 °C	<u>0.068</u>

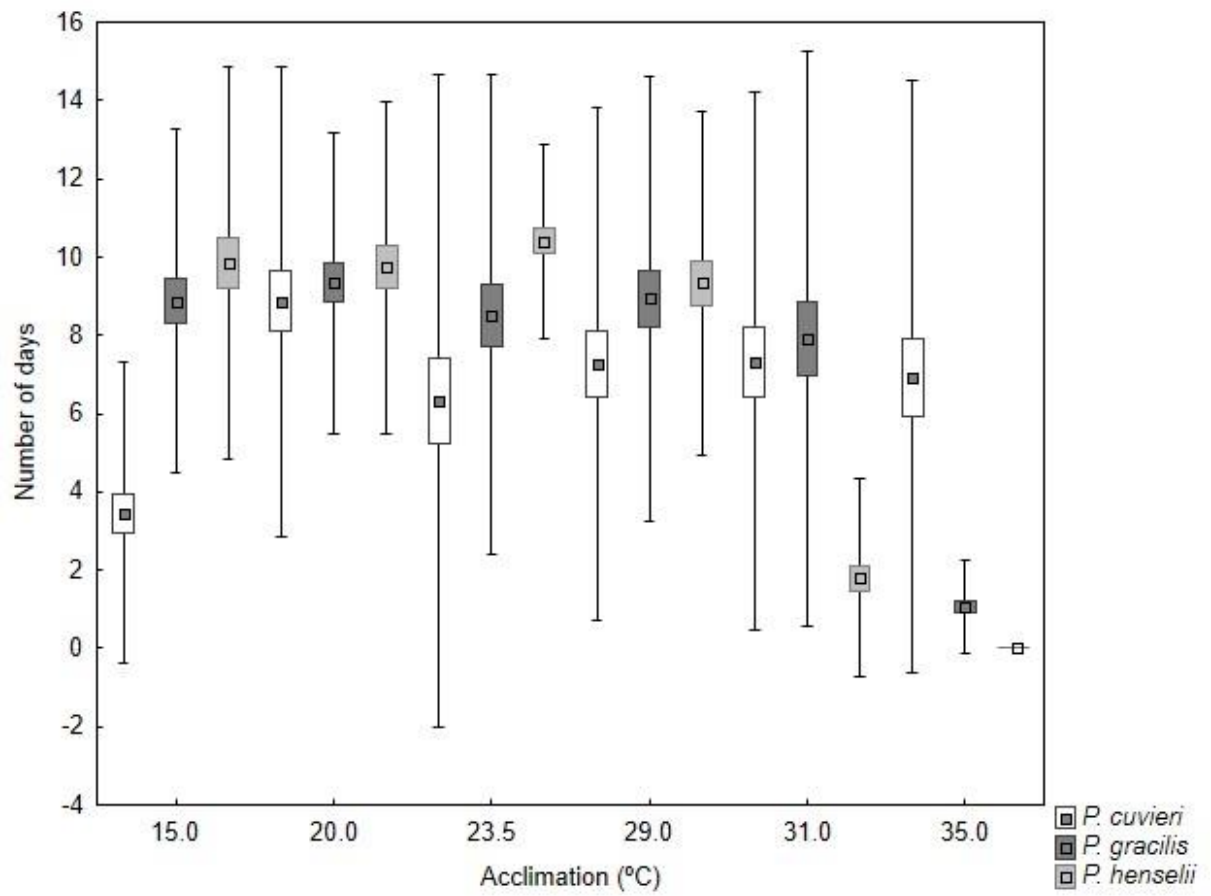


Fig. 4. Boxplot representing the survival time (number of days) for tadpoles of *Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis*, and *P. henselii* raised in six thermal acclimations. Central squares represent mean, and lines represent standard deviation.

Table 3. Thermal Safety Margin (TSM) for tadpoles of *Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis*, and *P. henselii* in three aquatic habitats monitored in the Brazilian Pampa biome, considering current temperatures (i.e. temperatures that species already experience) and according to the heating forecast (temperatures that species may experience in the future, with an increase in 4°C *sensu* IPCC, 2014).

Species	TSM					
	Habitat 1		Habitat 2		Habitat 3	
	Currently	Prediction +4°C	Currently	Prediction +4°C	Currently	Prediction +4°C
<i>Physalaemus cuvieri</i>	2.29	-1.71	5.82	1.82	8.8	4.8
<i>Physalaemus gracilis</i>	0.29	-3.71	3.82	0.18	2.29	-1.71
<i>Physalaemus henselii</i>	-2.54	-6.54	-1.99	-5.99	1	-3

Table 4. Warming Tolerance (WT) for tadpoles of *Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis*, and *P. henselii* in three aquatic habitats monitored in the Brazilian Pampa biome, considering current temperatures (i.e. temperatures that species already experience) and according to the heating forecast (temperatures that species may experience in the future, with an increase in 4°C *sensu* IPCC, 2014).

Species	WT					
	Habitat 1		Habitat 2		Habitat 3	
	Currently	Prediction +4°C	Currently	Prediction +4°C	Currently	Prediction +4°C
<i>Physalaemus cuvieri</i>	12.25	8.25	14.63	10.63	19.08	15.08
<i>Physalaemus gracilis</i>	9.6	5.76	12.14	8.14	5.79	1.79
<i>Physalaemus henselii</i>	13.66	9.66	15.2	11.2	19.1	15.1

Table 5. Cooling Tolerance (CT) for tadpoles of *Physalaemus cuvieri*, *P. gracilis*, and *P. henselii* in three aquatic habitats monitored in the Brazilian Pampa biome, considering current temperatures (i.e. temperatures that species already experience) and according to the heating forecast (temperatures that species may experience in the future, with an increase in 4°C *sensu* IPCC, 2014).

Species	CT					
	Habitat 1		Habitat 2		Habitat 3	
	Currently	Prediction +4°C	Currently	Prediction +4°C	Currently	Prediction +4°C
<i>Physalaemus cuvieri</i>	2.93	6.93	2.93	6.93	4.74	8.74
<i>Physalaemus gracilis</i>	5.36	9.36	5.36	9.36	9.23	13.23
<i>Physalaemus henselii</i>	6.69	10.69	6.69	10.69	8.64	12.64

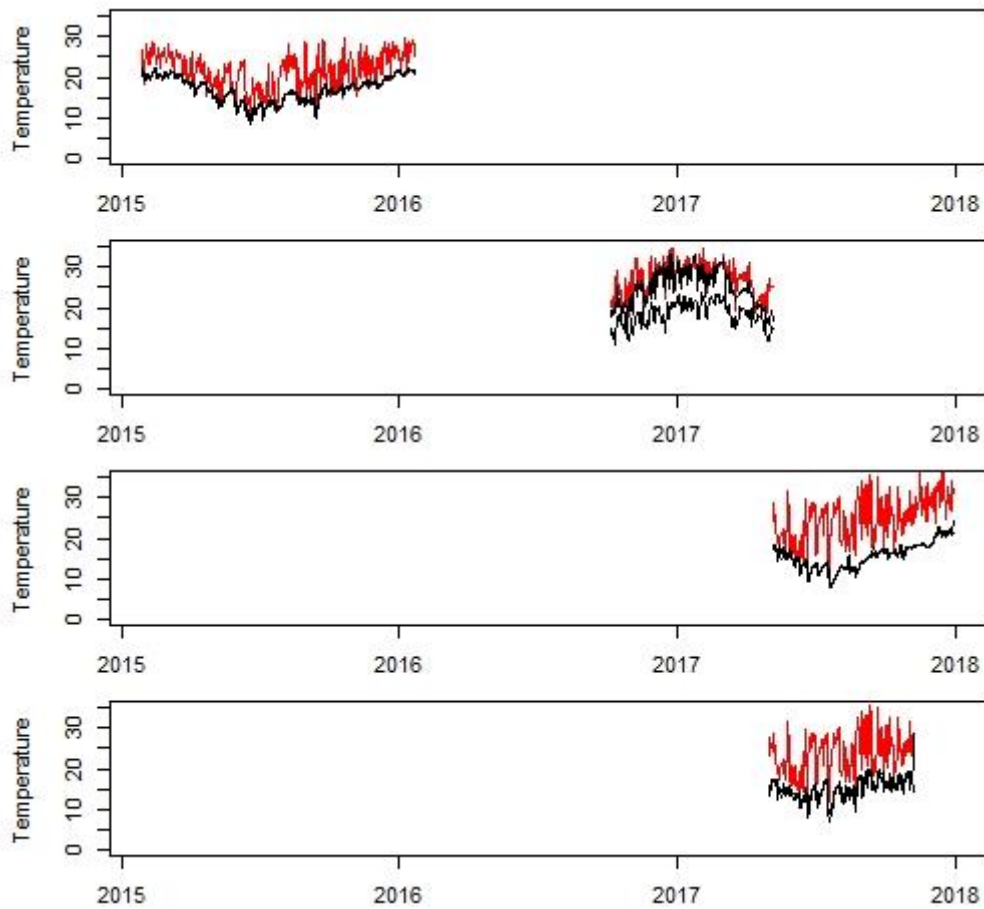


Fig. 5. Comparison of air and water temperatures in microhabitats (municipalities of Vacaria, Pedras Altas, São Sepé e Santa Margarida do Sul, respectively), using the data from INMET (red lines) and aquatic dataloggers (black lines).

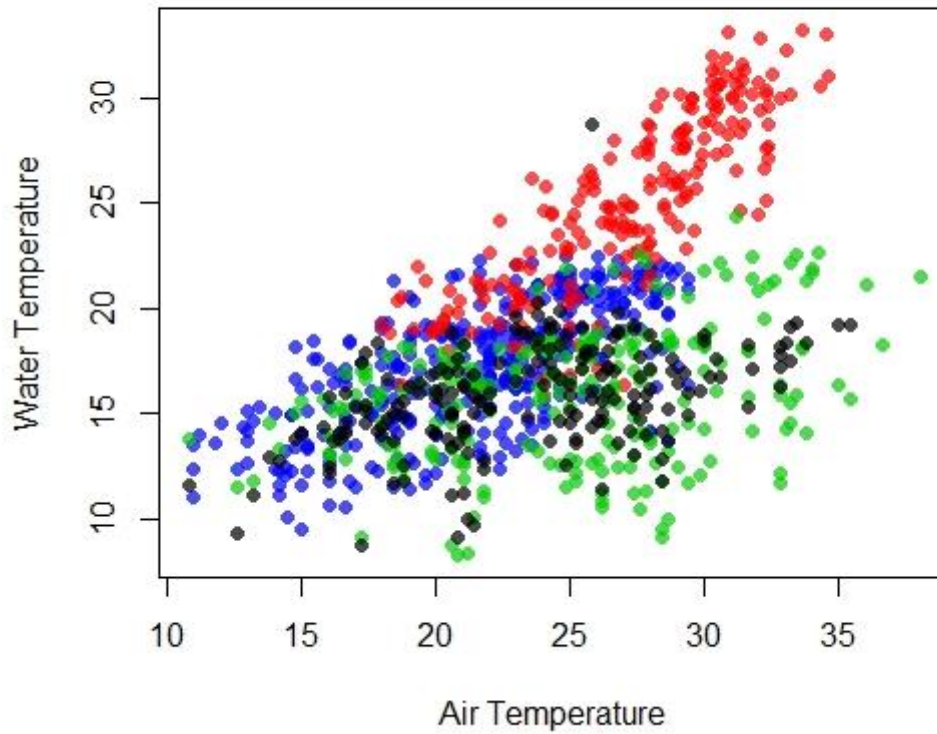


Fig. 6. Relation positive between water temperature (dataloggers' data) and air temperature (INMET' data) of habitats in the municipalities of Vacaria (black points), Pedras Altas (red points), São Sepé (green points), and Santa Margarida do Sul (blue points).

Referências

- ANGILLETTA, M. J. J. **Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis**. Oxford University Press, Oxford, 2009.
- ANGILLETTA, M. J.; NIEWIAROWSKI, P. H.; NAVAS, C. A. The evolution of thermal physiology in ectotherms. **Journal of thermal Biology**, v. 27, n. 4, p. 249-268, 2002.
- ARCHIS, J. N.; AKCALI, C.; STUART, B. L.; DAVID KIKUCHI, D.; CHUNCO, A. J. Is the future already here? The impact of climate change on the distribution of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*). **PeerJ.**, 6,4647, 2018.
- ARRHENIUS, S. On the Influence of Carbonic Acid in the Air upon the Temperature of the Ground. **Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 41, p. 237-276, 1896.
- BEEBEE, T. J. Amphibian Phenology and Climate Change. **Conservation Biology**, v. 16. n. 6, p.1454–1455, 2002.
- BEEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, 125, pp. 271–285, 2005.
- BLAIR, W. F. Calling and spawning seasons in a mixed population of anurans. **Ecology**, n. 42 p. 99–110, 1961
- BLANCHARD, S.; SLOGNAY, G.; VERHEGGEN, F.; DETRAIN, C. Today and tomorrow: impact of climate change on aphid biology and potential consequences on their mutualism with ants. **Physiological Entomology**, 2019.
- BLAUSTEIN, A. R.; BELDEN, L. K.; OLSON, D. H.; GREEN, D. M.; ROOT, T. L.; KIESECKER, J. M. Amphibian Breeding and Climate Change. **Conservation Biology**, v. 15. n. 6, p. 1804-1809, 2001.
- BRATTSTROM, B. H. Amphibian temperature regulation studies in the field and in the laboratory. **Am. Zool.**, v. 19, p. 345–356, 1979.
- BRATTSTROM, B. H. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. **Comparative Biochemistry and physiology**, v. 24, n.1, p. 93-111, 1968.
- BRATTSTROM, B. H. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. **Comp Biochem Physiol.**, v. 24, v.1, p.93-111, 1968.
- BRETT, J. R. Some principles in the thermal requirements of fishes. **Q. Rev. Biol.**, v. 31, p. 75–87, 1956.
- BROOK, B. W.; SODHI, N. S.; BRADSHAW, C. J. A. Synergies among extinction drivers under global change. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 8, p. 453-460, 2008.
- BUCKLEY, L. B.; MILLER, E. F.; KINGSOLVER, J. G. Ectotherm thermal stress and specialization across altitude and latitude. **Integrative and comparative biology**, v. 53, n. 4, p. 571-581, 2013.

BURGGREN, W. W.; WARBURTON, S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. **ILAR J.**, v. 48 n.3, p. 260-9, 2007.

COHEN, J. M.; LAJEUNESSE, M. J.; ROHR, J. R. A global synthesis of animal phenological responses to climate change. **Nature Climate Change**, 8, 224–228, 2018.

COWLES, R. B. et al. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. **Bulletin of the AMNH**, v. 83, 1944.

DEUTSCH, C. A. et al. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 18, p. 6668-6672, 2008.

DUARTE, H. et al. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. **Global Change Biology**, v. 18, n. 2, p. 412-421, 2012.

DUNSON, W. A.; TRAVIS, J. The role of abiotic factors in community organization. **The American Naturalist**, v. 138, n. 5, p. 1067-1091, 1991.

DUSENGE, M. E.; DUARTE, A. G.; WAY, D. A. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. **New Phytologist**, v. 221 p. 32–49, 2019.

FARALLO, V. R.; WIER, R.; MILES, D. B. The Bogert effect revisited: Salamander regulatory behaviors are differently constrained by time and space. **Ecology and Evolution**, p. 1–11, 2018.

FICETOLA, G. F.; MAIORANO, L. Contrasting effects of temperature and precipitation change on amphibian phenology, abundance and performance. **Oecologia**, v. 181, n. 3, 683-93 2016.

FODEN, W. B.; YOUNG, B. E.; AKÇAKAYA, H. R.; GARCIA, R. A.; HOFFMANN, A. A.; STEIN, B. A.; THOMAS, C. D.; WHEATLEY, C. J.; BICKFORD, D.; CARR, J. A.; HOLE, D. G.; MARTIN, T. G.; PACIFICI, M.; PEARCE-HIGGINS, J. W.; PLATTS, P. J.; VISCONTI, P.; WATSON, J. E. M.; HUNTLEY, B. 2018. Climate change vulnerability assessment of species. **WIREs Clim Change**, v.10, 2018.

GILMAN, E., E. J.; JUNGBLAT, V.; VANLAVIEREN, H.; WILSON, L.; AREKI, F.; BRIGHOUSE, G.; BUNGITAK, J.; DUS, E.; HENRY, M.; SAUNi Jr., I.; KILMAN, M.; MATTHEWS, E.; TEARIKI-RUATU, N.; TUKIA, S.; YUKNAVAGE, K. Adapting to Pacific Island mangrove responses to sea level rise and other climate change effects. **Climate Res.**, v.32, p. 161–176, 2006.

GREEN, D. M. Amphibian breeding phenology trends under climate change: predicting the past to forecast the future. **Global Change Biology**, v. 23, p.646–656, 2017.

HADDAD, C. B. F.; GIOVANELLI, J. G.; ALEXANDRINO, J. M. B. **O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios.** In press in M. S. Buckeridge (ed.), *A Biologia e as Mudanças Climáticas no Brasil*, 2007.

HALLIDAY, T. R. Why amphibians are important. **International Zoo Yearbook**, v. 42, n. 1, p. 7-14, 2008.

HILLMAN, S.S. **Ecological and environmental physiology of amphibians**. Oxford University Press, UK, 2009.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution**. Oxford University Press, Oxford, 2002.

HOFFMANN, M. et al. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, p. 1194442, 2010.

HUEY, R. B.; STEVENSON, R. D. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. **American Zoologist**, v. 19, n. 1, p. 357-366, 1979.

HUTCHINSON, G. E. The Paradox of the Plankton. **The American Naturalist**, v. 95, n. 882, 1961.

IPCC. 2014. Emergent risks and key vulnerabilities. In C.b. Field, V.r. Barros, D. J. Dokken, K. J. Mach, M. D. Mastrandrea, T. E. Bilir, M. Chatterjee, K. L. Ebi, Y. O. Estrada, R. C. Genova, B. Girma, E. S. Kissel, A. N. Levy, S. MacCracken, P. R. Mastrandrea & L. L. White (Eds.), *Climate Change 2014 Impacts, Adaptation, and Vulnerability Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1039–1099). Cambridge, UK and New York, NY: Cambridge University Press.

IPCC. 2018. O. Hoegh-Guldberg, D. Jacob, M. Taylor, M. Bindi, S. Brown, I. Camilloni, A. Diedhiou, R. Djalante, K. Ebi, F. Engelbrecht, J. Guiot, Y. Hijikata, S. Mehrotra, A. Payne, S. I. Seneviratne, A. Thomas, R. Warren, G. Zhou. Impacts of 1.5°C global warming on natural and human systems. In: *Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty* [V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.)]. In Press.

JANZEN, D. H. Why mountain passes are higher in the tropics. **The American Naturalist**, v. 101, n. 919, p. 233-249, 1967.

KATZENBERGER, M., TEJEDO, M., DUARTE, H., MARANGONI, F., BELTRÁN, F. Tolerância e sensibilidade térmica em anfíbios. *Revista da Biologia*, v. 8, p. 25-32, 2012.

KATZENBERGER, M., HAMMOND, J., TEJEDO, M., RELYEA, R. Source of environmental data and warming tolerance estimation in six species of North American larval anurans. **Journal of Thermal Biology**, v. 76, p. 171-178, 2018.

KINGSOLVER, J. G. The Well-Tempered Biologist. **The American Naturalist**, v. 174, n. 6, 2009.

- KLAUS, S. P.; LOUGHEED, S. C. Changes in breeding phenology of eastern Ontario frogs over four decades. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p.835–845, 2013.
- LI, Y. COHEN, J. M.; R. ROHR, J. R. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. **Integrative Zoology**, n. 8: p. 145–161, 2013.
- LISTER, B. C.; GARCIA, A. Climate-driven declines in arthropod abundance restructure a rainforest food web. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 44 p. 10397-10406, 2018.
- LUTTERSCHMIDT, W. I.; HUTCHISON, V. H. The critical thermal maximum: history and critique. **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, n. 10, p. 1561-1574, 1997.
- MAPBIOMAS (Projeto MapBiomass). (2018): Coleção 2017 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso de Solo do Brasil. Available at: <http://mapbiomas.org>. Acesso em:10 Janeiro de 2019.
- MITCHELL , K. A.; HOFFMANN, A. A. Thermal ramping rate influences evolutionary potential and species differences for upper thermal limits in *Drosophila*. **Functional Ecology**, v. 24, p. 694–700, 2010.
- NEWBOLD, T. Future effects of climate and land-use change on terrestrial vertebrate community diversity under different scenarios. **Proc. R. Soc. B.**, n. 285, 2018.
- NORSTRÖM, A. V.; NYSTRÖM, M.; JOUFFRAY, J.B.; FOLKE, C.; GRAHAM, N. A. J.; MOBERG, F.; OLSSON, P.; WILLIAMS, G. J. Guiding coral reef futures in the Anthropocene. **Front Ecol Environ**, v. 14, n. 9, p. 490–498, 2016.
- PACHAURI, R. K. et al. **Climate change 2014: synthesis report**. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, 2014.
- PACIFICI, M.; VISCONTI, P.; BUTCHART, S. H. M.; WATSON, J. E. M.; CASSOLA, F. M.; RONDININI, C. Species' traits influenced their response to recente climate change. **Nature Climate Change**, v.7, p. 205–208, 2018.
- PARMESAN, C.; YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. **Nature**, n. 421, 2003.
- POESCH, M. S.; CHAVARIE, L.; CHU, C.; PANDIT, S. N.; TONN, W. 2016. Climate Change Impacts on Freshwater Fishes: A Canadian Perspective. **Fisheries**, v. 41, n.7, 2016.
- PUTNAM, R. W.; BENNETT, A. F. Thermal dependence of behavioural performance of anuran amphibians. **Anim. Behav.**, v. 29, p. 502-509, 1981.
- RANK, N. E.; DAHLHOLFF, E. P. Allele frequency shifts in response to climate change and physiological consequences of allozyme variation in a montane insect. **Evolution**, v. 56, n. 11, p.2278-89, 2002.

REQUES, R.; TEJEDO, M. Reaction norms for metamorphic traits in natterjack toads to larval density and pond duration. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 10, p. 829–851, 1997.

SANKAR, T. V.; PATEL, R. D.; SUGARAJ, S.; AMARANATH, G. **Reducing the Impacts of Greenhouse Gases**. Emerging Trends of Nanotechnology in Environment and Sustainability, SpringerBriefs in Environmental Science, 2018.

SCHIVO, F.; BAUNI, V.; KRUG, P.; QUINTANA, R. D. Distribution and richness of amphibians under different climate change scenarios in a subtropical region of South America. **Applied Geography**, v.103, p. 70–89, 2019.

SEMLITSCH, R. D.; SCOTT, D. E.; PECHMANN, J. H. K.; GIBBONS., J. W. **Structure and dynamics of an amphibian community: evidence from a 16-year study of a natural pond**. Academic Press, San Diego, California, 1996.

SHERIDAN, J. A.; CARUSO, N. M.; APODACA, J. J.; RISSLER, L. J. Shifts in frog size and phenology: Testing predictions of climate change on a widespread anuran using data from prior to rapid climate warming. **Ecology and Evolution**, v. 8, p. 1316–1327, 2018.

SINCLAIR, B. J.; MARSHALL, K. E.; SEWELL, M. A.; LEVESQUE, C. L.; WILLETT, C. S.; SLOTSBO, S.; DONG, Y.; HARLEY, C. D. G.; MARSHALL, D. J.; HELMUTH, B. S.; HUEY, R. B.. Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? **Ecology Letters**, v. 19, p. 1372-1385, 2016.

SMITH, J. A.; FLOWERS, P.; MICHAEL LARKIN, M. Interpretative Phenomenological Analysis: Theory, Method and Research. 2009 p. 232, 2009.

SPOTILA, J. R. Role of temperature and water in the ecology of lungless salamanders. **Ecological Monographs**, n. 42, p. 95–125, 1972.

STILLMAN, J. H. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. **Science**, n. 301, 2003.

TEJEDO, M.; MARANGONI, F.; PERTOLDI, C.; RICHTER-BOIX, A.; LAURILA, A.; ORIZAOLA, G.; NICIEZA, A. G.; ÁLVAREZ, D.; GOMEZ-MESTRE, I. Contrasting effects of environmental factors during larval stage on morphological plasticity in post- metamorphic frogs. **Climate Research**, v. 43, p. 31-39, 2010.

TODD, B. D.; SCOTT, D. E, PECHMANN, J. H. K.; GIBBONS, J. W. Climate change correlates with rapid delays and advancements in reproductive timing in an amphibian community. **Proc R Soc Lond B**, p. 2191–2197, 2011.

VAN ROOY, P. T. J. C.; STUMPEL, A. H. P. Ecological impact of economic development on sardinian herpetofauna. **Conservation Biology**, v. 9, p.263-269, 1995.

VASCONCELOS, T. S.; NASCIMENTO, B. T. M. DO.; PRADO, V. H. M. Expected impacts of climate change threaten the anuran diversity in the Brazilian hotspots. **Ecology and Evolution**, v. 8, p. 7894–7906, 2018.

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p.11466–11473, 2008.

WALPOLE, A. A.; BOWMAN, J.; TOZER, D. C.; BADZINSKI, D. S. Community-level response to climate change: shifts in anuran calling phenology. **Herpetological Conservation and Biology**, v.7, n.2, p. 249–257, 2012.

WELLS, K. D. 2007. Complex life cycles and the ecology of amphibian metamorphosis. The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago Press, Chicago, 599-644.

WHILE, G. M.; ULLER, T. Quo vadis amphibia? Global warming and breeding phenology in frogs, toads and salamanders. **Ecography**, n. 37, p. 921–929, 2014.

WIKELSKI, M.; COOKE, S. J. Conservation physiology. **Trends Ecol Evol.**, v. 21, n.1, p.38-46, 2006.

WILLIAMS, J. E.; BLOIS, J. L. Range shifts in response to past and future climate change: Can climate velocities and species' dispersal capabilities explain variation in mammalian range shifts? **Journal of Biogeography**, v. 45. p. 2175 – 2189, 2018.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental Physiology of Animals**. 2^a ed, p. 779, 2005.

WU, C. S.; KAM, Y. C. Thermal tolerance and thermoregulation by Taiwanese rhacophorid tadpoles (*Buergeria japonica*) living in geothermal hot springs and streams. *Herpetologica*, v. 61, p. 29-35, 2005.

ZACHOS, J.; PAGANI, M.; SLOAN, L.; THOMAS, E.; BILLUPS, K. Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. **Science**, n. 292, 2001.