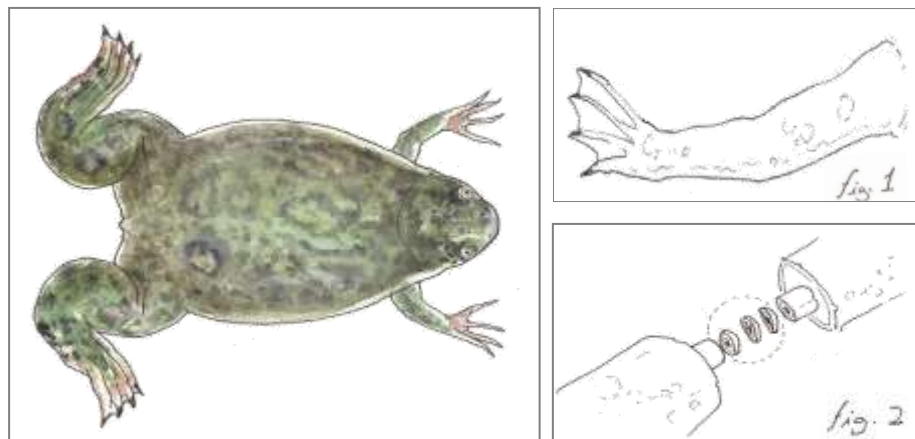




UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Estrutura etária e crescimento das populações invasoras
da rã *Xenopus laevis* em Portugal: um estudo
esqueletocronológico



Ana Catarina Oliveira Ferreira

Orientador: Prof. Aux. Doutor Rui Miguel Borges Sampaio e Rebelo
Co-Orientador: Prof. Aux. Doutor Paulo Alexandre da Cunha e Sá de Sousa

Mestrado em Biologia da Conservação

Relatório de Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Estrutura etária e crescimento das populações invasoras
da rã *Xenopus laevis* em Portugal: um estudo
esqueletocronológico

Ana Catarina Oliveira Ferreira

Orientador: Prof. Aux. Doutor Rui Miguel Borges Sampaio e Rebelo

Co-Orientador: Prof. Aux. Doutor Paulo Alexandre da Cunha e Sá de Sousa

Mestrado em Biologia da Conservação

Relatório de Dissertação

Évora, 2014

Agradecimentos

Contrariando o título desta secção, e provavelmente quebrando algum tradicionalismo (pedindo desde já perdão aos mais sensíveis) gostaria de exprimir aqui os meus mais sinceros sentimentos. Considero que a palavra agradecer não traduz a dimensão de toda a minha gratidão para com aqueles que tiveram a generosidade de partilhar comigo o seu tempo e o seu saber para que este trabalho fosse possível. Sem obedecer a formalismos, pretendo “apenas” enaltecer, aplaudir, mostrar profunda admiração e elogiar de uma forma muito especial todos aqueles que contribuíram para eu chegar a este estádio da minha vida académica.

Cumpre-me, portanto, enumerá-los:

- Todas as instituições participantes no programa de erradicação de *Xenopus laevis* em Portugal, sendo elas o Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (Coordenador do projeto), a Câmara Municipal de Oeiras (pelo transporte e apoio técnico no terreno), o Centro de Biologia Ambiental (Coordenação científica) e o Instituto Gulbenkian de Ciência (cedência de instalações). Esta tese beneficiou dos trabalhos conduzidos no âmbito deste programa. À Dra. Mónica Sousa pela cedência do mapa da área de estudo;
- Museu Nacional de História Natural e da Ciência - MUHNAC, por ter permitido o acesso aos indivíduos de *Xenopus laevis* aí depositados e pela cedência de espaço e materiais para o tratamento de amostras;
- Dra. Catarina Correia, representante da SANEST, pela disponibilização de dados não publicados sobre as análises realizadas à água da área de estudo;
- Prof. Solveig e toda a equipa do laboratório de BD da FCUL pela disponibilização do Criostato, e por toda a ajuda preciosíssima na manutenção deste equipamento (não foi fácil!!). Obrigada à Andreia e Patrícia pela ajuda que me prestaram, foi crucial para acabar a tempo;
- Toda a equipa do laboratório de Ecologia Pesqueira da FCUL pela preciosa disponibilização do microscópio e máquina fotográfica, sem os quais não teria sido possível concluir esta Tese;
- Prof. Rui Rebelo, meu orientador, a quem devo manifestar o meu especial apreço pela sua disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas e pela capacidade de me motivar em momentos de algum desânimo;
- Prof. Paulo Sá Sousa, meu co-orientador, sempre presente embora geograficamente distante;
- Colega e amigo Gonçalo Rosa, por dicas bastante úteis sobre a técnica de esqueletocronologia;
- Dra. Graça Saraiva, por me ter facultado documentos valiosos da área de trabalho;

- Pedro Alves, artista e amigo, o criador de esquemas aqui utilizados e que enriqueceram o trabalho;
- Amigo e artista Romeu Ribeiro pelas ilustrações usadas nesta tese;
- Amiga e “Tia” Guiomar pela correção do Português do trabalho, que tornou consideravelmente melhor a sua compreensão;
- Pais, e Irmão, pelas palavras de ânimo e carinho que me fizeram vencer todos os obstáculos, pelas condições favoráveis que me proporcionaram e tornaram possível a concretização de mais um sonho. Uma parte deste trabalho é, sem dúvida, uma conquista desta minha especial família.
- Tio Paulo e “tio” Eric que apesar da distância sempre foram os amigos que me souberam apoiar e fazer rir, pelo incentivo que sempre me deram para abraçar o meu gosto pela Biologia, com uma amizade sem igual;
- Tia Rosário, que desde cedo me encorajou a seguir o caminho da Ciência
- Os meus avós “ausentes” mas presentes naquilo que me transmitiram e fizeram de mim o Ser que orgulhosamente Sou
- A minha equipa de apoio de Portoleiros, Filomena e Toni, que me acolheu em momentos que precisava de silêncio e sossego para refletir e escrever;
- Os amigos, Diogo Amaro, todo o Grupo Flamingo, Joana Almeida, Ana Baptista, Helena Silva e Sara Coelho pelo apoio e companheirismo durante esta etapa e por garantirem que eu estava bem. Os momentos de café, trabalho de campo e muitos outros de cavaqueira foram imprescindíveis para manter a minha sanidade intelectual!
- O meu melhor amigo e companheiro de vida André Machado por apoio científico bastante rigoroso, incentivo extraordinário e constante que garantiram e vão garantir sempre que eu dê o melhor de mim apesar do cansaço e dos dias mais difíceis. Esta tese é tão minha quanto tua.
- Todos os restantes amigos e colegas, que apesar de aqui não estarem mencionados, de certa forma me ajudaram a chegar aqui.

Não esquecerei este apoio e irei fazer tudo para demonstrar a minha admiração por todos vós.

Nota prévia

A presente dissertação enquadra-se no Plano de Controlo de *Xenopus laevis* nas ribeiras de Oeiras. Este projeto iniciou em 2010 através da parceria estabelecida entre o Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (CBA/FCUL), a Câmara Municipal de Oeiras (CMO), o Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) e o Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). Foi ao abrigo deste projeto que se obtiveram todas as amostras da rã estudada nesta dissertação. Não obstante, a tese final escrita que se finalizou, assim como a grande maioria dos dados e respetivos resultados que daí advieram, resultam sobretudo do esforço e dedicação individual da mestranda.

Índice

AGRADECIMENTOS	4
NOTA PRÉVIA.....	6
ÍNDICE	7
1. RESUMO	9
2. ABSTRACT.....	10
3. INTRODUÇÃO.....	11
4. OBJETIVOS.....	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1. ÁREA DE ESTUDO	21
5.2. MÉTODOS E TÉCNICAS DE CAMPO	22
5.2.1.Amostragem.....	22
5.2.2.Calendarização.....	24
5.2.3.Método de captura	24
5.2.4.Medição e determinação do sexo dos indivíduos.....	25
5.3. MÉTODOS E TÉCNICAS LABORATORIAIS	25
5.3.1.Esqueletocronologia.....	25
5.3.2.Estimativa de idades	28
5.4.TAXA DE CRESCIMENTO E SULMÁXIMO.....	29
5.5.TRATAMENTO ESTATÍSTICO	29
6. RESULTADOS	31
6.1.ESTRUTURA DE TAMANHOS	31
6.2.ESQUELETOCRONOLOGIA.....	32
6.2.1.Reabsorção do osso periosteal	35
6.3.ATRIBUIÇÃO DE IDADES	35

6.4.CRESCIMENTO ÓSSEO.....	36
6.4.1.Diâmetro ósseo e tamanho corporal.....	36
6.4.2.Diâmetro da cavidade e tamanho corporal.....	37
6.4.3.Diâmetro ósseo e cavidade medular	38
6.5.ESTRUTURA DE IDADES E MATURAÇÃO SEXUAL.....	39
6.6.RELAÇÃO ENTRE TAMANHO CORPORAL E IDADE: CRESCIMENTO.....	41
7. DISCUSSÃO.....	44
7.1.ESTRUTURA DE TAMANHOS	44
7.2.ESQUELETOCROLOGIA: CRESCIMENTO ÓSSEO	45
7.2.1.LAGs falsas e duplas	45
7.2.2.Reabsorção óssea	45
7.3.ESTRUTURA ETÁRIA DA POPULAÇÃO	46
7.4.CRESCIMENTO	49
8. CONCLUSÃO	51
9. ANEXOS.....	53
10. REFERÊNCIAS.....	56

1. Resumo

Há duas populações invasoras da rã *Xenopus laevis* em Portugal, nas ribeiras da Laje e de Barcarena, em Oeiras. Aparentemente essas duas populações estão isoladas entre si. Estudou-se a documentada diferença de tamanhos das rãs entre as duas ribeiras, usando a esqueletocronologia para avaliar a estrutura etária, longevidade e crescimento delas. A população da rib^a da Laje está envelhecida, pois as rãs apresentam maiores valores de tamanho corporal, idade e maturação sexual mais tardia nas fêmeas. Na rib^a de Barcarena há uma estrutura etária jovem, com valores menores de tamanho e idade. Isto sugere que a rib^a Barcarena pode ter boas condições de reprodução, mas piores condições de sobrevivência de adultos, ao contrário da rib^a Laje. Aqui a estrutura etária está envelhecida, porventura em resultado da anterior campanha de erradicação de rãs. Porém, tais resultados também poderão ser justificáveis em face das diferenças nas condições ambientais vigentes nas ribeiras.

Palavras-chave: *Xenopus laevis*, esqueletocronologia, crescimento, estrutura etária, longevidade.

Age structure and growth of invasive populations of the frog *Xenopus laevis* in Portugal: a skeletochronological approach

2. Abstract

There are two populations of *Xenopus laevis* in Portugal, living in two streams, Laje and Barcarena, located in Oeiras, Portugal. Previous studies have found differences in the size of individuals of both populations. The present work intends to analyze this size difference through the analysis of the age structure, longevity and the growth of these animals, using skeletochronology. Laje's is characterized by an aged population with higher values of individual length, age and longevity. Barcarena's depicted a younger age structure with lower values of individual length, age and longevity. These results suggest that Barcarena may have better conditions for reproduction, but worse conditions for adult survival, while the opposite may happen in Laje. The environmental differences could explain these results, but the aged population of Laje may also be a result of the eradication program. We suggest different approaches for the continuation of the eradication program.

Key-words: *Xenopus laevis*, skeletochronology, growth, age structure, longevity.

3. Introdução

Os anfíbios enquanto seres poiquilotérmicos, dependem bastante das condições ambientais, seja para se alimentarem, crescerem, sobreviverem, acumularem energia e para se reproduzirem (Peters 1964). Entre os fatores ambientais que influenciam as características vitais destes animais predominam as variações sazonais na temperatura e na disponibilidade de água. Estas podem por sua vez afetar a disponibilidade de alimento, qualidade do habitat para reprodução e sobrevivência da descendência (Iturra-Cid et al. 2010). A temperatura do ambiente afeta em especial a expressão das características de vida dos seres poiquilotérmicos (Morrison et al. 2004; Liao et al. 2011), interagindo com um grande número de variáveis biológicas e taxas fisiológicas, incluindo os padrões de crescimento (Smith-Gill and Keith 1979; Berven 1982).

Dentro da área de distribuição geográfica de uma espécie, eventualmente ocorrem diferenças nos parâmetros de vida entre as várias populações locais, uma vez que cada uma destas é afetada por diferentes fatores como a temperatura, recursos tróficos, competição intra e interespecíficas e interações predador-presa. O crescimento nos anfíbios está relacionado com a idade de maturação, reprodução, fecundidade, longevidade, tamanho dos ovos entre outras características de vida (Hemelaar 1988; Smirina 1994; Miaud and Juha 2001; Navas 2006). A variação interpopulacional na taxa de crescimento, tamanho corporal e idade de maturação afetam por sua vez a fecundidade dos adultos, designadamente no número e tamanho dos ovos e comprovam a influência das pressões seletivas impostas pelo ambiente na fisiologia dos anfíbios (Iturra-Cid et al. 2010).

É sabido que os anfíbios, especialmente os anuros, são um bom exemplo de seres que desenvolveram um ciclo de vida bastante complexo apresentando a ocorrência de um período inicial que corresponde ao estadio larvar, seguindo-se após à metamorfose o estadio adulto (Crespi and Denver 2005). Neste grupo de animais o crescimento dos juvenis metamorfoseados e dos adultos é anual e cíclico, com alternância entre períodos de crescimento relativamente rápidos e outros relativamente lentos. Este crescimento cíclico expressa-se na produção de marcas de crescimento nos ossos, fornecendo um padrão anual de informação que permite a determinação precisa da idade (Smirina 1994). A periodicidade do crescimento ósseo aparece, nas preparações sobre lâmina de vidro, como zonas visíveis menos densas (associadas aos períodos de crescimento rápido) e zonas mais finas e densas denominadas por *annuli* (Halliday

and Verrel 1988), ou *LAGs* (*Lines of arrested growth*), neste caso estão associadas aos períodos de diminuição da taxa de crescimento. Em termos gerais é assumido que os anfíbios e répteis apresentam um crescimento indeterminado, pelo que o tamanho corporal e a idade do indivíduo estão positivamente relacionados até à maturação sexual (Halliday and Verrel 1988), após a qual esta correlação poderá estar totalmente ausente (Wake and Castanet 1995). Nas zonas temperadas, com estações do ano contrastantes e bem marcadas, a sazonalidade climática tem um grande efeito nas atividades fisiológicas dos anfíbios. Estas alterações sazonais afetam o crescimento dos ossos, definindo um período de crescimento ativo durante a época mais quente, a que se segue um crescimento reduzido durante a época mais fria, levando à formação de linhas cíclicas nos tecidos ósseos (Halliday and Verrel 1988). Este fenómeno já foi amíude comprovado noutras espécies de climas temperados (Tsiora and Kyriakopoulou-Sklavounou 2002; Gibbons and McCarthy 1983).

Em termos gráficos as curvas de crescimento dos anfíbios apresentam tipicamente uma forma sinusoidal. Nesta, a passagem de uma fase de crescimento rápido para uma fase posterior assintótica deve-se a uma alocação de energia diferencial entre o crescimento e a reprodução, correspondendo esta assim à maturação sexual e ao início da reprodução (Measey 2001). Apesar da análise da distribuição da frequência de tamanhos poder ser utilizada para prever a idade dos indivíduos, esta abordagem apenas é viável até à idade de maturação (Üzüm 2009). Uma vez atingido este ponto é difícil incluir os indivíduos em grupos de idades de forma fiável, pois o crescimento começa a ser muito lento devido à transferência de energia de crescimento somático para a reprodução (Halliday and Verrel 1988). Assim, a idade dos indivíduos adultos não pode ser baseada no tamanho corporal ou massa, uma vez que o primeiro parâmetro pode ser bastante afetado por fatores ambientais e predisposição genética (Rozenblut and Ogielska 2005).

Neste intuito a esqueletocronologia constitui uma das técnicas laboratoriais mais utilizadas para a atribuição de idades individuais em vertebrados. Esta técnica histológica é considerada relativamente robusta na determinação da idade, tanto em répteis como em anfíbios, nos quais o crescimento anual é cíclico. Assim a esqueletocronologia é aplicada há mais de 20 anos para avaliar a idade e crescimento em anfíbios (Castanet and Smirina 1990; Matthews and Miaud 2007), tanto de climas temperados (Hemelaar 1988; Kyriakopoulou-Sklavounou et al. 2008; Guarino and Erismis 2008; Liao and Lu 2010), subtropicais (Morrison et al. 2004), como tropicais (Khonsue et al. 2000; Liao et al. 2011). Em concreto esta técnica baseia-se na contagem

de *LAGs* marcadas em secções de ossos longos (Halliday and Verrel 1988; Castanet and Smirina 1990), a qual permite estimar a idade dos indivíduos, a idade de maturação dos mesmos e a respetiva longevidade. Fornece assim informação sobre as populações de anuros de um modo mais rápido do que a metodologia de captura-recaptura (Halliday and Verrel 1988). De facto, o período de crescimento aparece registado nos ossos como constituindo uma camada menos densa de osso periosteal, enquanto que o período de hibernação aparece como uma camada hematoxilínofílica, fina e densa, chamada de período de descanso ou *LAG*. Tal marca um ano de crescimento para anfíbios que vivem em locais com ciclos climáticos previsíveis, aqueles onde alternam entre tempo quente e frio, ou húmido e seco (Halliday and Verrel 1988). Assim, é possível determinar por quantos invernos (ou épocas críticas) um indivíduo passou, através da contagem das suas *LAGs* (Mao et al. 2012) (Fig.1).

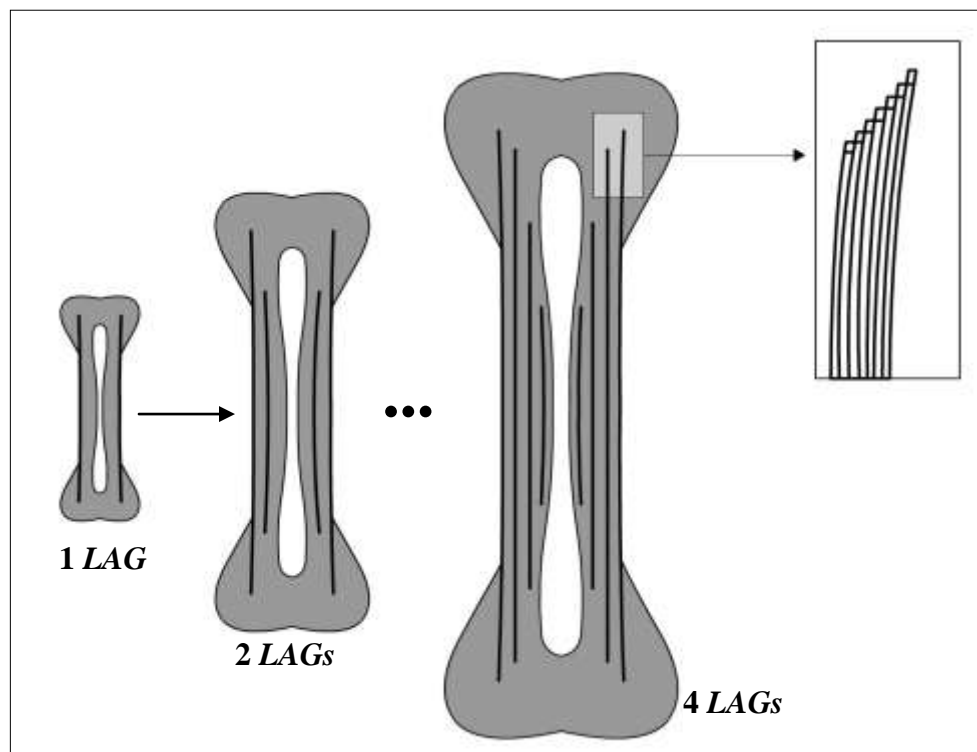


Figura 1. Esquemática da representação de deposição de *LAGs* em secções longitudinais de ossos longos de anuros após o 1º, 2º e 4º inverno, mostrando que a zona central do osso (diáfise) é a ideal para a observação do maior número de *LAGs* possíveis. Esquema de Rozenblut and Ogielska (2005), e adaptado ao presente estudo pelo ilustrador Pedro Alves.

Este método esqueletocronológico poderia implicar o sacrifício de um grande número de indivíduos (Measey 2001). Para evitar causar danos nas populações naturais frequentemente (ou sempre que possível) usa-se uma falange. Deste modo basta a remoção de um único dedo, o que permite a posterior libertação dos animais, sem comprometer a sua sobrevivência (Measey 2001). Não obstante, a técnica apresenta algumas dificuldades, as quais se prendem com o fenómeno da reabsorção do osso periosteal nos ossos longos. Este processo começa na camada óssea mais interna (membrana endosteal) dos ossos, e leva ao aumento da cavidade medular à medida que o indivíduo cresce. O processo acaba por destruir uma ou mais linhas de crescimento (Guarino et al. 1995), podendo enviesar a sua contagem e a consequente atribuição de idades (Kyriakopoulou-Sklavounou et al. 2008). A ocorrência desta reabsorção também poderá ser verificada pela presença ou ausência da linha de Kastschenko. Esta linha que corresponde à interface entre o osso endosteal e periosteal foi inicialmente descrita por Kastschenko em 1881 (Rozenblut and Ogielska, 2005) O enviesamento causado pela reabsorção de *LAGs* pode ser diminuído através da análise do diâmetro de cada linha de crescimento em animais de idade conhecida, o que permite calcular quantas *LAGs* poderão ter sido reabsorvidas em animais com uma grande cavidade medular ou camada de osso endosteal (Kyriakopoulou-Sklavounou et al. 2008). Outra dificuldade de interpretação resulta de também poderem ocorrer falsas *LAGs* (Smirina 1994), em resultado de condições intrasazonais de paragem de crescimento (Crivelli et al. 2002), ou até a deposição de *LAGs* duplas anuais (Measey 2001) .

A determinação da idade dos indivíduos é importante para obter informação básica sobre a demografia de espécies ameaçadas, necessária à sua conservação (Hemelaar 1988; Sagor et al. 1998; Eaton et al. 2005; Miaud et al. 2001). No entanto é igualmente importante conhecer a ecologia básica de espécies invasoras, visando a sua correta gestão. As acções de erradicação requerem um conhecimento bastante aprofundado sobre os processos biológicos que acompanham o sucesso de uma espécie invasora (Schmeller et al. 2007).

Xenopus laevis (Daudin, 1802), vulgarmente conhecida como rã-de-unhas-africana, é um anuro Pipidae originário da África sub-sahariana. Esta espécie tem sido bastante utilizada nos últimos 50 anos como animal de laboratório, sendo um dos vertebrados mais comuns para este tipo de estudos (Gurdon 1996). Apresenta um corpo oval e achatado com uma pele viscosa de

coloração castanho-acinzentada e padrão manchado. Os seus membros anteriores são pequenos com dedos débeis e de forma cônica. Por sua vez os membros posteriores são fortes com membranas interdigitais muito desenvolvidas e apresentam garras escuras (Carruthers 2008), igualmente cônicas, na ponta dos três primeiros dedos (Maddin et al. 2009). Os indivíduos adultos apresentam um comprimento focinho-uróstilo (SUL, *snout urostyle lengh*) médio entre 110 e 130 mm, sendo que as fêmeas atingem um tamanho até cerca de 35% maior que os machos (Tinsley et al. 1996). Esta diferença de tamanhos é um claro dimorfismo sexual (Bernardes 2008), tal como a coloração da zona interna dos membros anteriores, que nos machos é mais escura que nas fêmeas (Rebelo et al. 2010b) e que constituem almofadas nupciais, usadas para para agarrar as fêmeas durante o amplexo (Kelley 1996). A partir do primeiro ano de vida estas últimas apresentam características sexuais secundárias que se caracterizam por uma cloaca inchada e avermelhada antes da postura (Rebelo et al. 2010a).

Os adultos desta espécie são generalistas, alimentando-se maioritariamente de invertebrados de diferentes tamanhos (Measey and Tinsley 1998). Os indivíduos são capazes de capturar as presas na água através de sucção (Sokol 1969) ou no meio terrestre através de movimentos de impulso para fora de água, como descrito em Measey (1998). Adicionalmente, a espécie é também conhecida por apresentar comportamentos necrófagos e até canibais, alimentando-se dos próprios ovos ou juvenis (Tinsley et al. 1996).

Dentro das espécies que comumente predam *X.laevis* no seu habitat nativo incluem-se anhingas (*Anhinga melanogaster*), corvos-marinhos (*Phalacrocorax africanus*), lontras, cágados, cobras-de-água (Channing 2001) e achigãs (*Micropterus salmoides*) (Prinsloo et al. 1981). No Chile, as populações invasoras são predadas por garças noturnas (*Nycticorax nycticorax*), gaiivota-de-Kelp (*Larus dominicanus*) e coruja-buraqueira (*Speotyto cunicularia*) segundo Lobos and Jaksic (2005).

A espécie utiliza qualquer tipo de corpo de água, sem preferência de biótopos específicos, com amplitudes variadas de pH e temperatura. No entanto prefere águas com temperatura entre 17-24°C e com pH entre 7,4 e 7,5, apesar de serem capazes de ocupar locais com temperatura entre 10-30°C e pH entre 5 e 9 (Tinsley et al. 1996). Evita grandes lagos e rios, geralmente habitados por peixes (Tinsley et al. 1996). Embora sejam animais maioritariamente aquáticos, há registos de movimentações por terra, muitas das vezes sem a necessidade de ocorrência de

corredores ecológicos (Measey and Fouquet 2006). No Reino Unido foram observados indivíduos que percorreram uma distância de 0,2 km em 48 horas, ultrapassando diversos obstáculos como rios, bosques e estradas (Measey 1998). Na Califórnia indivíduos juvenis foram observados a dispersar de um charco aproveitando os cursos de água existentes durante a época das chuvas (McCoid and Fritts 1980). Sugere-se que esta dispersão não é realizada de forma aleatória, mas sim direcionada para a colonização de novos locais (Measey and Fouquet 2006), cuja presença é sentida através de recetores olfativos (Freitag et al. 1995).

No que toca à reprodução, os machos atraem as fêmeas através de vocalizações sub-aquáticas, criando uma acentuada competição entre os primeiros e formando uma hierarquia vocal (Tobias et al. 2004). Ignora-se se os animais deste género são territoriais, mas foi associado um comportamento agressivo em animais confinados no mesmo aquário (Rabb and Rabb 1965). Perante uma elevada densidade populacional e escassez de abrigo em condições laboratoriais, os animais de maior porte (machos e fêmeas) tendem a perseguir os indivíduos mais pequenos da sua coorte (Chum et al. 2013).

Após a metamorfose, as fêmeas ficam sexualmente maduras ao fim de 10 a 24 meses (Kelley 1996), se bem que já se tenha observado ovulação de fêmeas com 6 meses numa população invasora na Califórnia (McCoid and Fritts 1995). Nesta população, a maturação sexual aos 6 meses foi observada tanto para fêmeas como para os machos, correspondendo a indivíduos com um SUL médio de 65 mm, e apresentando as primeiras um crescimento mais rápido que os segundos após a maturação. No entanto, na população invasora de Portugal verificou-se um macho adulto reprodutor com um SUL de 57,34 mm (Bernardes 2008). Os machos, apesar de atingirem a maturação sexual aos 6 meses, não possuem espermatozóides em quantidade suficiente para fertilizar uma postura com sucesso até que completem um ano após a metamorfose (Kazuya and Witcshi 1963).

Nas fêmeas a oogénese é um processo contínuo e assíncrono, ovulando ao longo de todo o ano, sob condições ótimas (Dumont 1972). A época de reprodução está relacionada com a temperatura (McCoid and Fritts 1989) e disponibilidade de alimento, sendo estimulada pela precipitação (Tinsley et al. 1996). Neste sentido, dependendo dos locais, esta época poderá decorrer por longos períodos de tempo (África do Sul) segundo Deuchar (1975); de forma esporádica ao longo do ano, como entre Março e Junho na Califórnia (McCoid and Fritts 1989) e

em Portugal, entre Maio e Setembro (Bernardes 2008); ou de forma pontual e bastante restrita, como no Reino Unido (Measey 2001). Para as fêmeas esta fase significa um grande investimento energético, que se reflete no peso total do indivíduo. Este está relacionado com o aumento de peso das gónadas, chegando a representar cerca de 11 a 15% do peso corporal, e com o tamanho corporal (Bernardes 2008). Durante a época de reprodução as fêmeas podem depositar entre centenas a milhares de ovos (McCoid and Fritts 1989).

Em laboratório, o crescimento e desenvolvimento dos girinos é mais rápido nas primeiras 3 semanas, seguindo-se um crescimento mais lento até ao aparecimento dos primeiros indivíduos metamórficos (Bernardes 2008). A duração do período larvar médio em condições laboratoriais foi de 8 meses no estudo de Bernardes (2008). No entanto, esta é bastante variável, registando-se uma duração de 2 meses sob condições laboratoriais favoráveis (Tinsley and McCoid 1996). Ao longo desta fase os girinos encontram-se bastante vulneráveis às alterações do ambiente circundante (como a disponibilidade de alimento), situação que poderá provocar diferenças no tamanho, durante e no momento final do período larvar (Wassersug 1996). A taxa de crescimento e o tamanho à metamorfose dos indivíduos também poderão ser reduzidos devido a situações de sobrepopulação (Parker et al. 1947).

Após o término da metamorfose, os indivíduos adultos sofrem um crescimento anual contínuo, igualmente dependente das condições exteriores (McCoid and Fritts 1995). É o caso da temperatura e profundidade da água, disponibilidade de abrigo e alimento, e densidade populacional (Hilken et al. 1995). A temperatura apresenta uma influência especial, uma vez que zonas com um período curto de temperatura ótima se refletem numa taxa de crescimento dos indivíduos relativamente baixa (Measey 2001). A qualidade inferior do habitat poderá igualmente levar a uma diminuição da taxa de crescimento nos adultos (Bernardes 2008).

Relativamente à longevidade da espécie, sabe-se que poderá atingir até 30 anos e 4 meses, em condições laboratoriais ótimas (Channing 2001), podendo ser consideravelmente mais baixa no meio selvagem (Tinsley et al. 1996). Um indivíduo de *X. laevis* foi recapturado após 14 anos no Sul de Gales, Reino Unido (Measey 1998). Para além disto, a longevidade pode variar conforme o sexo, sendo que o fenómeno pode ser devido ao investimento diferencial na reprodução (Bernardes 2008).

A sua utilização como animal de laboratório e o seu aproveitamento em aquarofilia tem permitido a rápida disseminação fora do seu local de origem (Tinsley and McCoid 1996). As primeiras invasões registadas para esta espécie ocorreram no Reino Unido onde se conhecem três localizações para a espécie (Tinsley and McCoid 1996), e posteriormente um pouco por todo o Mundo, abrangendo preferencialmente regiões temperadas com um clima mediterrânico como a Califórnia (Tinsley and McCoid 1996), Chile (Lobos and Jaksic 2005) e alguns países da Europa. Nestes últimos incluem-se Portugal (Rebelo et al. 2010a), Espanha (Pascual et al. 2007), França (Measey and Fouquet 2006), Itália (Lillo et al. 2005), Alemanha e Holanda (Tinsley and McCoid 1996). Nos Estados Unidos sabe-se que a espécie ocupa um total de 13 estados federados (Measey et al. 2012), apresentando apenas reprodução com sucesso na já referida Califórnia e no Arizona (Tinsley and McCoid 1996). No Japão estão registadas três localidades com presença comprovada de *X. laevis* (Measey et al. 2012).

Na população do Sul de Gales a taxa de crescimento verificada é relativamente baixa devido à curta época de crescimento, porque os indivíduos se encontram perto do seu limite climático. Esta corresponde a 1/3 da registada para uma população invasora em San Diego, Califórnia, onde as condições permitem a reprodução e o crescimento ao longo do ano. Nesta população concluiu-se que havia uma relação positiva acentuada entre o SUL e a massa corporal, tendo-se observado um claro aumento da primeira medida ao fim dos dois anos de idade (Measey 2001).

Têm sido realizadas tentativas de erradicação desta espécie e, na Califórnia, o método de envenenamento da água tem produzido efeitos positivos (Tinsley and McCoid 1996). Foram ainda aplicadas outras estratégias de remoção desta espécie através da colocação de armadilhas, redes, pesca eléctrica, drenagem dos lagos e introdução de peixes predadores (Prinsloo et al. 1981). Em Portugal tem vindo a ser desenvolvido desde 2010 o plano de erradicação de *X. laevis* de duas ribeiras em Oeiras. Apesar de ambas as populações não estarem em contacto verificou-se uma diferença de tamanhos corporais entre as populações existentes nas duas ribeiras (Rebelo et al. 2010b).

Measey (2001) aplicou pela primeira vez a técnica de esqueletocronologia a esta espécie, combinando-a com dados morfométricos. Este autor verificou que as LAGs eram depositadas anualmente com base num método de captura-recaptura utilizado em paralelo. Desta forma foi

possível determinar histórias de vida específicas para cada indivíduo e compreender a sua dinâmica populacional, concluindo que a sua invasibilidade no País de Gales se encontra relativamente condicionada por condições ambientais. Esta conclusão foi possível com dados sobre o estado das populações, reprodução e taxas de crescimento, mostrando que a esqueletocronologia poderá ser aplicada para conhecer a potencialidade invasora desta espécie.

4. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral perceber a razão da diferença de tamanhos corporais entre as duas populações de rãs invasoras. Pretende-se assim compreender de forma mais pormenorizada a dinâmica populacional das duas populações existentes, que permita comparações com outras nativas e invasoras e a aplicação de medidas de erradicação mais adequadas para cada uma das populações existentes. Como objetivos específicos pretendeu-se conhecer a estrutura etária e parâmetros vitais como a longevidade e crescimento dos indivíduos, através da aplicação da técnica de esqueletocronologia. Com o objetivo de explorar diferentes causas para a ocorrência de diferentes tamanhos corporais entre os indivíduos das duas ribeiras, testámos as seguintes hipóteses:

- A existência de diferenças na estrutura etária para ambos os sexos;
- A existência de diferenças na longevidade dos indivíduos, para ambos os sexos;
- A existência de diferenças nas taxas de crescimento para ambos os sexos.

Na posse desta informação sobre o estado das populações desta rã invasora em Portugal, poder-se-ão esboçar táticas que facilitem a sua erradicação definitiva.

5. Materiais e Métodos

5.1 Área de estudo

A área de estudo, está quase toda inserida no concelho de Oeiras e abrange toda a distribuição geográfica conhecida da espécie em Portugal. Compreende as pequenas bacias hidrográficas das ribeiras da Laje e de Barcarena (Fig.2). A rib^a Laje apresenta uma extensão de 15,8 km enquanto que a rib^a Barcarena tem 19,2 km, criando bacias hidrográficas de 42,3 km² e 33,6 km², respetivamente. Ambas nascem a leste da Serra de Sintra e desaguam no rio Tejo, respetivamente nas praias de Santo Amaro de Oeiras e Caxias, distando entre si aproximadamente 5 km (Rebelo et al. 2010b). A zona envolvente e ambas as ribeiras são influenciadas pela proximidade ao rio Tejo e ao oceano Atlântico, que leva a uma amenidade climática com fracas amplitudes térmicas. Estes fatores determinam que a área de estudo se insira numa zona com clima de transição entre o tipo marítimo e continental de invernos tépidos, com precipitação muito variável, e verões quentes e secos (Miguel et al. 2000). A região apresenta uma precipitação anual que varia entre 1000 mm a norte e 700 mm a sul, classificando-se como um clima moderadamente chuvoso. A temperatura média anual da zona onde se inserem as ribeiras varia entre 14 e 16°C (Miguel et al. 2000). Nos últimos três anos (2010-2013) e considerando o período de maior atividade de *X. laevis* em Portugal (Abril-Setembro/Outubro) (Bernardes 2008), foram registadas temperaturas médias da água de 22,5°C na rib^a Barcarena e de 20,9 °C na rib^a Laje. Igualmente durante esse período verificaram-se valores de 8,27 no pH para a rib^a Barcarena e de 8,81 para a rib^a Laje (SANEST, dados não publicados).

As margens de ambas as ribeiras são densamente urbanizadas, excetuando a zona mais próxima da Serra de Sintra, que se encontram relativamente naturalizadas (Vale 2010). Ao longo da sua extensão, as ribeiras apresentam zonas de cascatas, rápidos e poças com limo/lodo (pegos) com elevada variação de caudal ao longo do ano (Kondolf et al. 2010). Comparativamente à rib^a Barcarena, com profundidades entre 34 e 50 cm (Vale 2010) e correntes com velocidade média e rápida (Miguel et al. 2000) entre Abril e Setembro, a rib^a Laje apresenta zonas de pegos mais profundos, entre 39 e 81 cm (Vale 2010), e águas relativamente mais calmas (Rebelo et al. 2011) com velocidades lentas, médias e nalguns locais até nulas. Os fundos de ambas as ribeiras são compostos por areão grosso com blocos de pedras e cascalho médio, apresentando adicionalmente a Laje zonas com terra (Miguel et al. 2000).

Relativamente à qualidade da água de ambas as ribeiras, verificou-se uma percentagem semelhante de oxigénio dissolvido na água, com valores de 78,67% para a rib^a Barcarena e de 78,03% para a rib^a Laje. Ambas as ribeiras revelaram a presença de nitratos (NO₃), com valores de 7,32 mg/L registados para a rib^a Barcarena e 12,08 para a rib^a Laje (SANEST, dados não publicados).

Apesar da reduzida qualidade da água e da artificialidade das ribeiras, os troços de água mostram algumas comunidades biológicas de espécies autóctones: *Cobitis paludica* (verdemã-comum), *Iberochondrostoma lusitanicum* (boga-portuguesa), *Pelophilax perezi* (rã-verde); *Mauremys leprosa* (cágado-mediterrânico), *Natrix maura* (cobra-de-água-viperina), *Rhinechis scalaris* (cobra-de-escada) e *Hemorrhois hippocrepis* (cobra-de-ferradura) (Rebelo et al. 2010b).

5.2 Métodos e técnicas de campo

5.2.1 Amostragem

No presente estudo, foram utilizados indivíduos capturados no âmbito do plano de erradicação anteriormente referido, com a seguinte distribuição:

- a.** Para a rib^a Laje, foram definidos sete pontos de amostragem, à semelhança de estudos anteriormente realizados (Rebelo et al. 2010b), distanciados de 1 km (Vale 2010): Ponte Talaíde, Parque Municipal de Oeiras, Hortas da Laje, Bairro dos Navegadores, Bairro da Laje, Estação Agronómica Nacional e Jardim do Palácio do Marquês de Pombal. Para o presente estudo apenas foram utilizados indivíduos provenientes dos últimos quatro locais.

- b.** Para a rib^a Barcarena, foram definidos oito pontos de amostragem, igualmente distanciados entre si de 1 km (Vale 2010): Ponte de São Marcos, Lugar do Bico, Fábrica da Pólvora, Ribeira-a-baixo, Quinta Nossa Senhora da Conceição, Pedreira Italiana, Murganhal e Ponte de Barcarena. No presente estudo foram utilizados indivíduos provenientes de todos estes locais, excetuando a Pedreira Italiana.

5.2.2 Calendarização

A recolha de indivíduos decorreu ao longo dos três anos, durou 5 semanas sobretudo nos meses em que esta espécie exótica se encontra mais ativa, de Abril a Setembro (Bernardes 2008), sendo as campanhas divididas em três etapas. A calendarização destas últimas, exceto a de 2013 para a qual apenas foram utilizados 8 indivíduos juvenis, está resumida na Tabela 1.

Tabela 1. Calendarização das campanhas de amostragem de 2010 e 2011

Calendarização de Amostragem			
Ano de amostragem	1º Época	2ª Época	3ª Época
2010	17-28 Maio	28 Junho-9 Julho	30 Agosto-3 Setembro
2011	14-24 Junho	18-29 Julho	22-26 Agosto

5.2.3 Método de captura

Para a captura de indivíduos adultos e juvenis foram utilizadas duas metodologias:

a. Armadilhagem

Nos três anos de amostragem dispuseram-se nas ribeiras várias armadilhas de funil iscadas com comida enlatada para gato. Estas armadilhas foram construídas a partir de garrações de água de 5 litros, aos quais se cortou e inverteu o topo, encaixando-o depois na base. Cada armadilha foi atada a uma estrutura fixa na margem e imersa no corpo de água, preferencialmente junto ao fundo em zonas com pouca corrente (pegos) e com a abertura orientada para o sentido contrário ao da corrente, variando de local para local consoante as características do sítio, nomeadamente as dimensões dos pegos de cada ribeira.

b. Pesca elétrica

Durante os três anos de amostragem foi utilizado um aparelho de transporte dorsal (SAMUS-725MP) com bateria, a operar com corrente alterna, com uma frequência de 30Hz. A duração dos períodos de pesca variou em função da extensão e profundidade dos troços percorridos.

Todos os indivíduos capturados foram colocados em sacos individuais devidamente identificados (Nº indivíduo, sexo, local, data), transportados em geleiras e, após eutanásia no período máximo de uma noite após a sua captura, mantidos em arcas frigoríficas.

5.2.4 Medição e determinação do sexo dos indivíduos

A cada um dos indivíduos capturados foi medido o seu comprimento desde o focinho até ao uróstilo (SUL), pressionando levemente as costas do animal contra uma superfície plana, com uma craveira, até aos 0,1 mm. Posteriormente para os mesmos foi determinado o sexo pela verificação de caracteres sexuais secundários nos machos. Observou-se também que as fêmeas apresentavam extensões da cloaca, tal como descrito por Measey (2001). Os juvenis (animais pequenos e sem caracteres sexuais secundários) foram dissecados para identificação do sexo.

5.3 Métodos e técnicas laboratoriais

5.3.1 Esqueletocronologia

Uma vez que os indivíduos em análise foram sacrificados, foi possível utilizar os ossos dos membros anteriores para aplicação desta técnica, ao contrário de Measey (2001), que apenas utilizou falanges. Após a medição e sexagem de cada um dos animais, foi removido um dos membros anteriores, e armazenado em álcool a 75 %. Os indivíduos foram conservados em álcool a 75 %, com vista ao seu depósito nas colecções do Museu Nacional de História Natural e da Ciência – Museu Bocage (MUHNAC, Lisboa; Códigos da espécie: MB04-408 até MB04-478).

Os ossos foram descarnados após a colocação do membro em água a ferver durante 5 a 10 minutos. O úmero, radioulna e falange foram conservados em álcool a 75% em *eppendorfs* devidamente identificados por indivíduo. A escolha do osso utilizado nesta técnica baseou-se numa análise prévia de relação entre o diâmetro de vários ossos e o SUL dos indivíduos. O úmero apresentou uma secção grande e cilíndrica que permite a obtenção de cortes com diâmetros mais uniformes (Fig. 3).

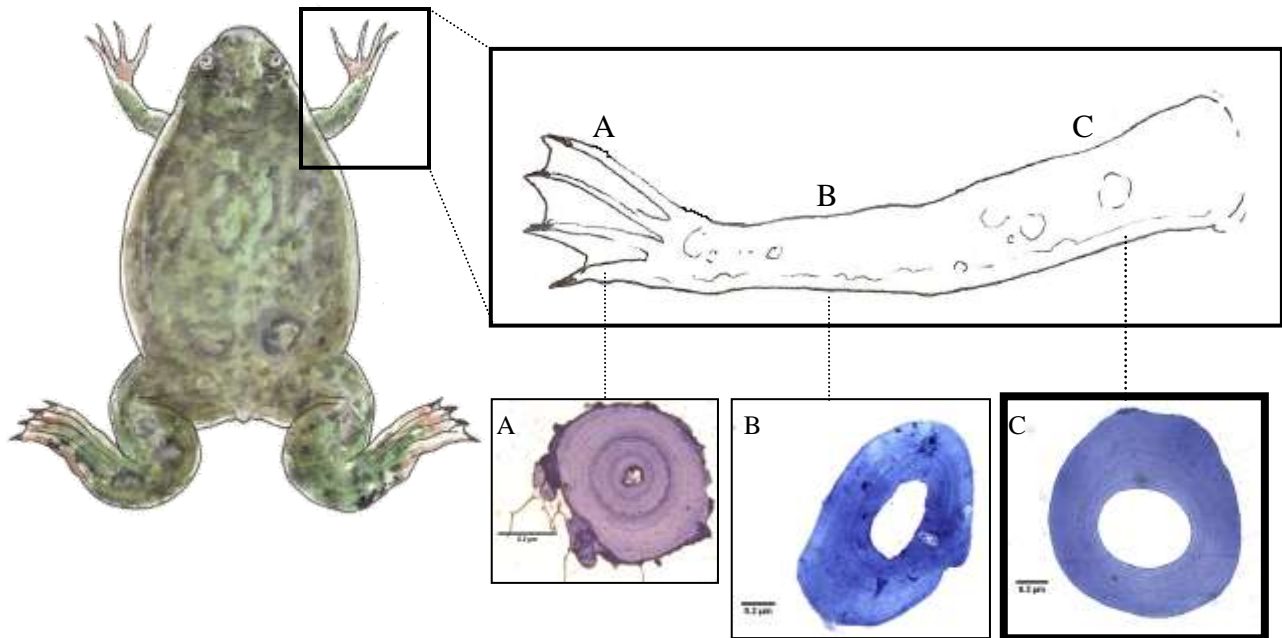


Figura 3. Pormenor dos ossos do membro anterior de *X. laevis* e respetivas secções obtidas através de esqueletocronologia: falange (A); radioulna (B) e úmero (C). Barra de escala: 20 μm . Desenhos do ilustrador Romeu Ribeiro. Fotos da autora.

O protocolo utilizado foi adaptado de Rebelo and Leclair (2003) e otimizado para *X. laevis*, através dos seguintes processos (Fig.A Anexos):

a. Descalcificação

O úmero de cada indivíduo foi descalcificado em 10 ml de ácido nítrico a 3% durante aproximadamente 1 hora. A duração da exposição do osso ao ácido dependeu da peça óssea em questão, podendo variar de 10 a 15 minutos para ossos de juvenis ou 30 a 60 minutos para ossos de adultos. Considerou-se que os ossos ficaram descalcificados assim que apresentaram maleabilidade total ao longo do seu comprimento.

Após descalcificação, os ossos foram colocados num gobelé com 50 ml de água destilada para lavagem, pelo menos durante 12 horas (de um dia para o outro).

b. Seccionamento

Depois das 12 horas de lavagem procedeu-se ao seccionamento dos ossos em criostato (Clinicut Bright), utilizando o meio de inclusão Tissue - Tek O.C.T. Os cortes foram efetuados com 14 μm de espessura na zona da diáfise do osso de modo a que o corte tenha o maior número de LAGs visíveis (Fig.4). Estes foram recolhidos para caixas de petri devidamente identificadas.

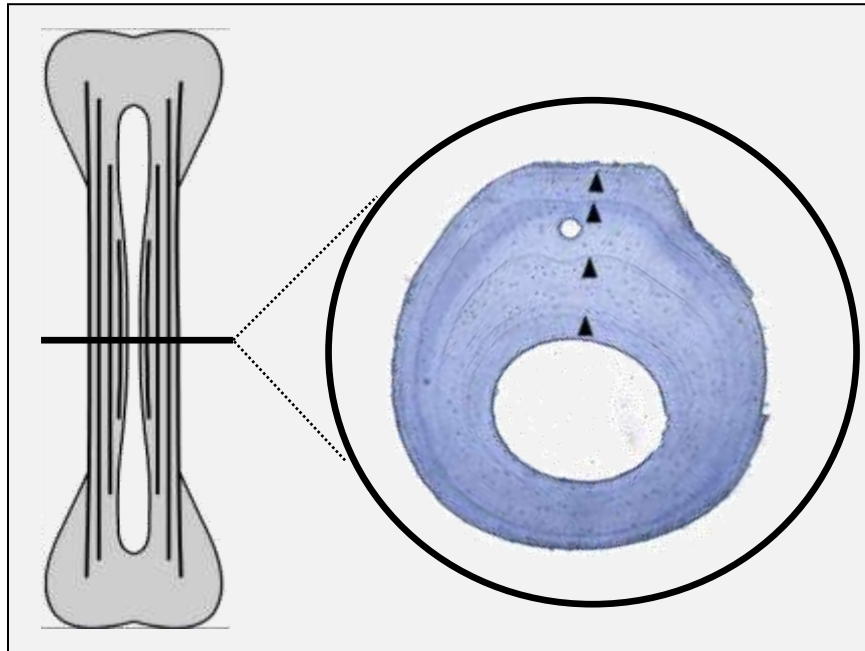


Figura 4. Secção do osso cortado na zona da diáfise, mostrando um indivíduo com 4 LAGs, esquema adaptado de Rozenblut and Ogielska (2005) pelo ilustrador Pedro Alves. Foto da autora.

c. Coloração

A cada caixa de petri foi adicionada água destilada suficiente para perfazer apenas o fundo da mesma. De seguida juntaram-se duas gotas de Hematoxilina de Erlich a cada caixa de petri durante 20 minutos. Seguiu-se o processo de *bluing* (conversão da hematoxilina) através da adição de 10 ml de água da torneira deixada previamente a descansar (pelo menos 24 horas com recipiente da água bem arejado). Os ossos permaneceram em coloração durante pelo menos 12 horas (de um dia para o outro).

d. Preparações definitivas dos cortes

Foram recolhidos os cortes de cada caixa que aparentavam ter melhor qualidade (melhor visualização dos anéis de crescimento, pouca deteriorização do corte e menor tamanho da cavidade medular). No total foram recolhidos no mínimo 10 cortes por osso para lâminas etiquetadas. O meio de montagem foi a clara de ovo.

5.3.2 Estimativa de idades

Inicialmente todos os cortes foram analisados ao microscópio, obtendo-se um conjunto de fotografias para cada indivíduo, escolhendo-se preferencialmente as que apresentavam melhor qualidade. Cada preparação definitiva com os cortes foi fotografada com uma máquina fotográfica Leica DFC290 aplicada a um microscópio Leica DM2000. Posteriormente cada um dos cortes foi analisado e medido através do programa ImageJ, versão 1.46r.

Foi inicialmente definido o valor máximo do diâmetro da 1ª linha de crescimento dos ossos dos indivíduos juvenis (recém-metamorfoseados ou com 1 ano), calculando-se o seu valor médio e respectivo intervalo de confiança (Castanet and Smirina 1990). Estes valores foram comparados com o diâmetro da cavidade medular dos ossos de todos os animais, de modo a avaliar a probabilidade de reabsorção desta linha. Para a medição dos diâmetros dos ossos foram efetuadas duas medidas, realizando-se a raiz quadrada da multiplicação desses valores para obter uma aproximação ao diâmetro médio, uma vez que nem todos os ossos apresentavam um diâmetro circular perfeito.

O diâmetro da 2ª linha foi medido nos indivíduos para os quais foi possível ter a certeza da existência da 1ª linha. Para os indivíduos cuja 1ª linha apresentou um diâmetro total superior ao intervalo de confiança da 1ª linha dos indivíduos juvenis de idade conhecida, essa primeira *LAG* foi considerada como correspondendo ao 2ª inverno. Só indivíduos que apresentavam uma 1ª e 2ª linha bem definidas foram sujeitos a medições.

Desta forma foram analisados sucessivamente os seguintes anéis de crescimento. O processo de atribuição de idades foi sempre realizado tendo em conta o diâmetro das primeiras *LAGs*, de forma a ter certeza que as mesmas correspondiam às linhas de 1º, 2º inverno e seguintes.

Para garantir que a estimativa de idade fosse o mais precisa possível, foi tomado em conta o mês de captura dos indivíduos. Assim, linhas incompletas na periferia do osso foram consideradas uma *LAG* para os indivíduos capturados em Maio ou início de Junho, uma vez que terá havido pouco crescimento desde o fim da hibernação. Por outro lado, nos indivíduos que apresentavam a linha incompleta e foram capturados em Agosto ou mais tarde esta não foi considerada como correspondendo a um inverno.

A atribuição de uma idade individual a cada corte foi realizada por dois observadores separadamente, sendo que qualquer discordância foi analisada em conjunto até se chegar a um acordo.

5.4 Taxa de crescimento e SULmáximo

A avaliação do crescimento dos indivíduos foi realizada através de uma regressão não-linear aplicando a equação de Von Bertalanffy (Bertalanffy 1957), que já foi usada para outros estudos com anuros (Kyriakopoulou-Sklavounou et al. 2008; Sarasola-Puente et al. 2011; Iturra-Cid et al. 2010; Liao and Lu 2010; Matthews and Miaud 2007; Mao et al. 2012; Xuan et al. 2010; Leclair et al. 2005). Este modelo permite definir a relação entre o SUL e a idade dos indivíduos através da seguinte equação:

$$\text{SUL} = \text{SUL}_{\text{máx}} * (1 - \text{EXP}[-k * (\text{idade} - t_0)])$$

em que $\text{SUL}_{\text{máx}}$ é o tamanho máximo que o indivíduo pode atingir, k é o coeficiente de crescimento que corresponde à taxa à qual $\text{SUL}_{\text{máx}}$ é atingido, determinando a forma da curva de crescimento e t_0 é a idade teórica correspondente a um tamanho inicial, que neste estudo é considerado de 0. Foram obtidos valores de cada um dos parâmetros estimados para cada sexo em cada uma das ribeiras.

5.5 Tratamento estatístico

Para a comparação entre os tamanhos e as idades dos indivíduos de ambos os sexos e entre ambas as populações foi utilizado o teste t , sendo o pressuposto de normalidade testado com o teste de Levene, ou o teste não-paramétrico Mann-Whitney, quando o pressuposto de normalidade não foi verificado.

A existência de relações entre o SUL e o diâmetro total dos ossos e diâmetro da cavidade medular e entre o diâmetro total e da cavidade dos ossos foi testada com correlações de Pearson. Para analisar a correlação e significância entre o número de linhas reabsorvidas e o tamanho dos indivíduos efetuou-se um teste de correlação de Spearman.

Para a obtenção de parâmetros de crescimento (e respectivas curvas) para ambos os sexos e em ambas as ribeiras fizeram-se regressões não-lineares ajustadas à equação de Von Bertalanffy.

Os testes estatísticos realizados foram calculados com o Software SPSS (v. 22.0). Todos os valores estão mencionados com o valor de \pm SD. Toda esta análise foi realizada com um nível de significância de 0,05.

6. Resultados

6.1 Estrutura de tamanhos

À semelhança dos resultados obtidos por Rebelo et al. (2011), também neste estudo se verificaram diferenças significativas entre sexos nas rãs: Na amostra da rib^a da Laje houve uma diferença significativa no tamanho corporal médio dos indivíduos de cada sexo ($U=28$; $P<0,001$) (Fig.5), exibindo as fêmeas os maiores tamanhos. Considerando as duas ribeiras, concluiu-se que havia diferenças significativas no tamanho para ambos os sexos (Machos: $t_{39}= -3,51$; $P<0,01$; Fêmeas: $U=63,5$; $P <0,001$), sendo a rib^a Laje o local com maiores indivíduos (Tabela.2). Tal como observado no estudo acima mencionado, manteve-se aqui a diferença de tamanhos entre populações.

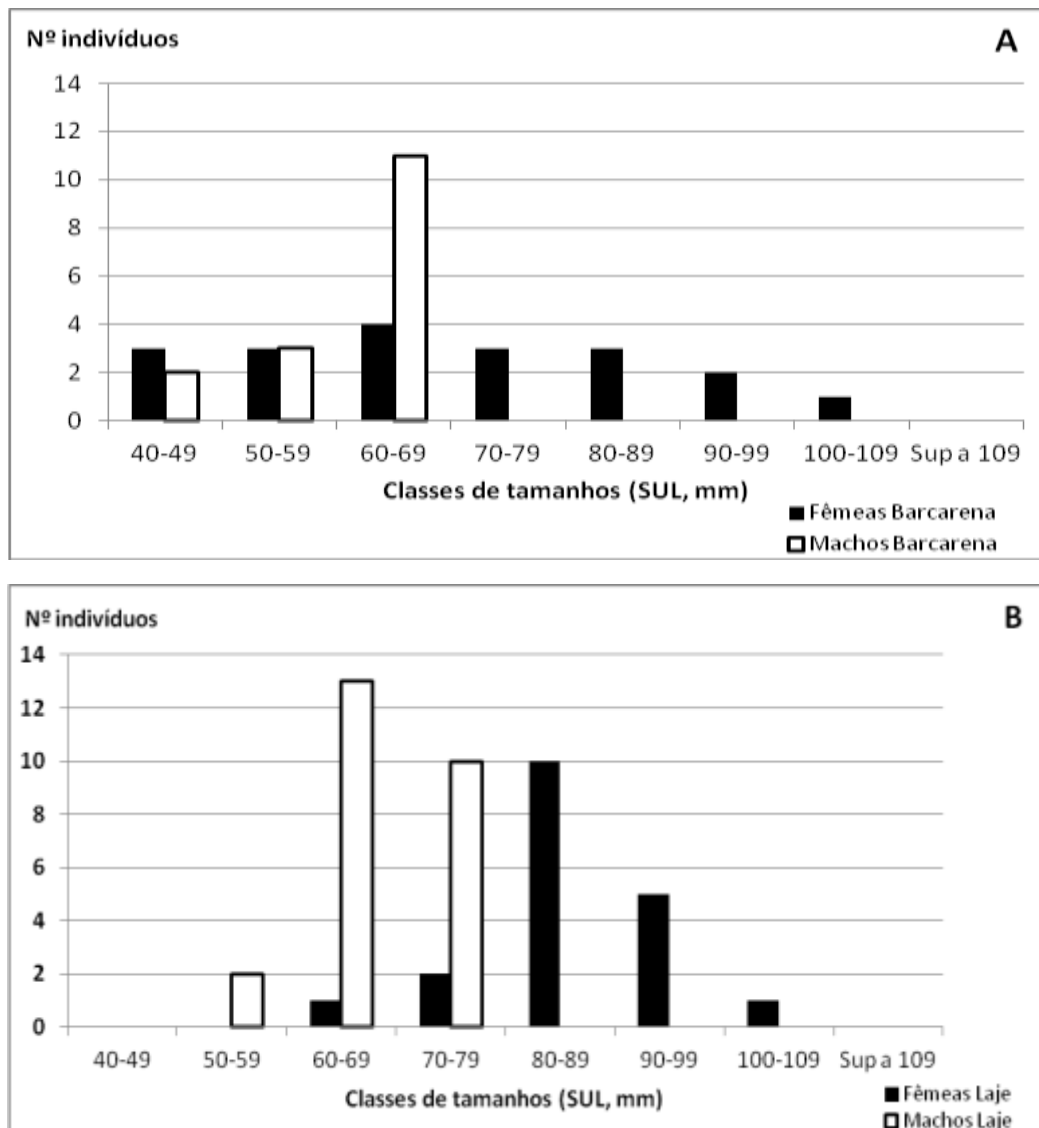


Figura 5. Distribuição do tamanho corporal (SUL, mm) dos indivíduos capturados nas ribeiras de Barcarena (A) e da Laje (B) com distinção entre sexos. 31

Tabela 2. Valores médios de tamanho corporal (SUL, mm) para as ribeiras de Barcarena e da Laje.

População	n	SUL médio (mm)
Barcarena		
Fêmeas	19	68,1±4
Machos	16	60,4±1,7
Laje		
Fêmeas	19	86,4±10
Machos	25	67,5±5,6

6.2 Esqueletocronologia

Todos os cortes obtidos apresentaram anéis concêntricos corados, correspondentes a *LAGs*, e secções mais largas com menor coloração (*annuli*) correspondentes a cada período de crescimento dos indivíduos. As *LAGs* foram observadas em todos os indivíduos com diferentes graus de nitidez e de regularidade (Figs.6 e 7).

Nos cortes correspondentes a ossos de indivíduos juvenis com 1 ano ou menos foi ainda possível observar o osso juvenil, formado antes da metamorfose (Fig.6 A). Na grande maioria dos ossos, as *LAGs* manifestaram deformidades de crescimento bastante variadas que se refletiam principalmente em irregularidades causadas por apófises (Fig.7 D). Uma vez que grande parte dos indivíduos da amostra foi capturada entre Junho e Agosto, os seus ossos prefiguravam uma nova linha de crescimento à periferia do osso (Fig.7 B).

Nalguns ossos verificou-se a ocorrência de *LAGs* falsas que se exibem como linhas mal coradas ou linhas incompletas, e *LAGs* duplas as quais se unem num determinado curso da sua trajetória (Fig.7 C). Verificou-se a ocorrência de *LAGs* duplas em 85,7% dos indivíduos da rib^a Barcarena e em 88,6% dos da rib^a da Laje. *LAGs* falsas foram verificadas em 82,9% dos indivíduos da rib^a Barcarena e em 65,9% dos indivíduos da rib^a Laje.

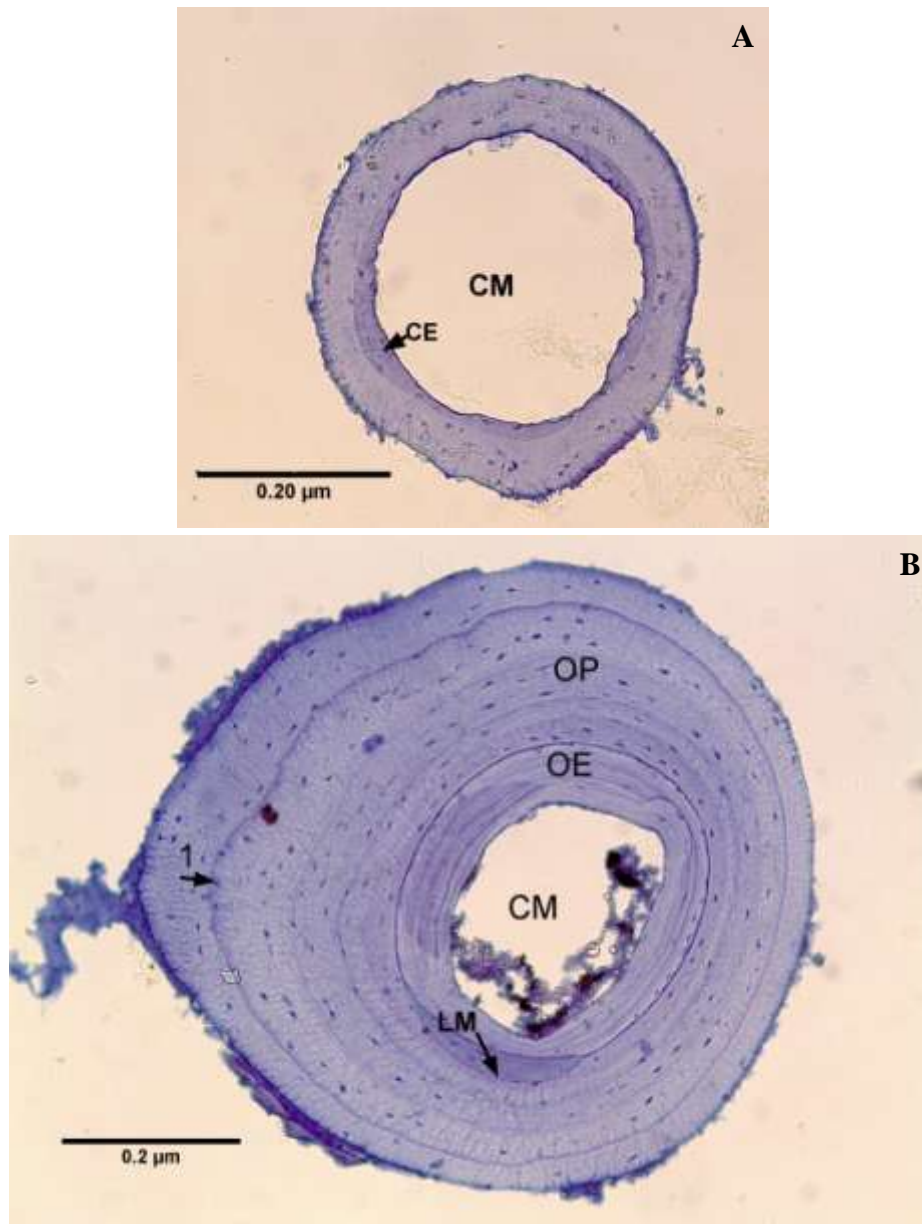


Figura 6. Secções de úmeros de juvenis corados com hematoxilina. **A:** Juvenil recém-metamorfoseado com SUL de 25,72 mm, capturado na rib^a Barcarena em 2013, apresentando uma leve sombra de cartilagem embrionária (CE) e cavidade medular (CM); **B:** Indivíduo juvenil com SUL de 40,01 mm capturado na rib^a Barcarena em 2013, com presença de 1 LAG (seta preta), linha de metamorfose (LM), CM, osso endosteal (OE), osso periosteal (OP). Fotos da autora.

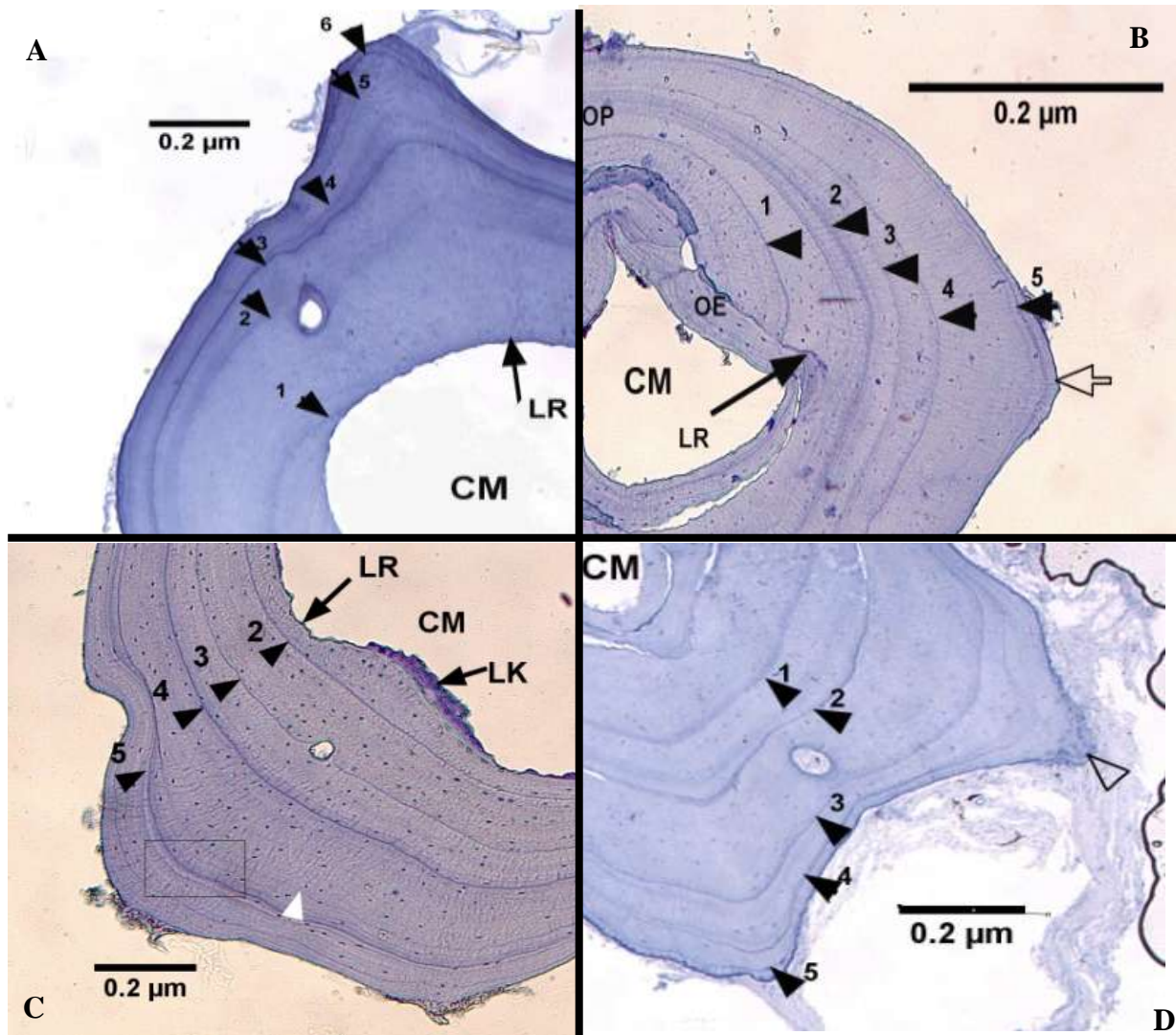


Figura 7. Secções de úmeros de adultos corados com hematoxilina. **A:** Fêmea adulta com SUL de 93,29 mm, capturada na rib^a Barcarena em 2011 apresentando 6 LAGs (setas pretas), linha de reabsorção (LR) com 1^a linha parcialmente reabsorvida, cavidade medular (CM); **B:** Fêmea adulta com SUL de 81,51 mm, capturada na rib^a Laje em 2011 apresentando CM, 5 LAGs (linhas pretas), deposição de novo osso na periferia (seta aberta), osso endosteal (OE), e LR com 1^a e 2^a linhas parcialmente reabsorvidas; **C:** Fêmea adulta com SUL de 88,04 mm, capturada na Laje em 2011 apresentando CM, 5 LAGs (setas pretas), LAGs falsas (retângulo) e duplas LAGs (seta branca), LR com total reabsorção da 1^a linha de crescimento, e linha de Kastschenko (LK) (Rozenblut and Ogielska 2005); **D:** Macho adulto com SUL de 63,09 mm, capturado na rib^a Barcarena em 2011, apresentando 5 LAGs (setas pretas), apófise (seta aberta) e CM. Fotos da autora.

6.2.1 Reabsorção do osso periosteal

Estimámos a frequência de reabsorção da 1ª e da 2ª linhas de crescimento (Figs.7 B e C). Para a ribª de Barcarena, verificou-se 36,8% das fêmeas com reabsorção da *LAG*_1 e 21,1 % com reabsorção das *LAGs*_1 e 2. Para os machos desta ribeira verificou-se apenas reabsorção da *LAG*_1 em 18,8% dos indivíduos (Tabela 3). Para a ribeira da Laje verificou-se que em 78,8% das fêmeas houve reabsorção da *LAG*_1 e em 26,3% reabsorção das *LAGs* 1 e 2. Para os machos desta ribeira verificou-se reabsorção da *LAG*_1 para 44% dos indivíduos e reabsorção das *LAGs*_1 e 2 em apenas 4% dos indivíduos.

Apenas as fêmeas da ribª Barcarena revelaram uma correlação positiva entre o seu tamanho corporal e o número de *LAGs* reabsorvidas ($r_s= 0,7$, $P<0,01$).

Tabela 3. Frequência da reabsorção das *LAGs* em ambos os sexos, para as ribeiras de Barcarena e da Laje.

<i>LAGs</i> reabsorvidas	Barcarena		Laje	
	Fêmeas n=19	Machos n=16	Fêmeas n=19	Machos n=25
1	36,8%	18,8%	78,9%	44%
1 e 2	21,1%	---	26,3%	4%

6.3 Atribuição de idades

No total dos cortes obtidos, 22 apresentaram-se com deformações e má qualidade que impossibilitaram a atribuição de idades, tendo sido posteriormente descartados da análise final.

Face ao total de ossos utilizados na análise final foi possível proceder à atribuição de idades em 38 fêmeas, 41 machos e 8 juvenis. Verificou-se que ocorreu uma discordância entre os dois observadores relativamente à idade de 31 indivíduos, em que 23 dos quais correspondia apenas a uma diferença de 1 ou 2 anos, resultante da não contabilização de linhas totalmente reabsorvidas por parte de um dos observadores. Para as situações verificadas de *LAGs* duplas ou falsas, estas não foram contabilizadas para a atribuição de idades, não sendo consideradas como *LAGs* reais.

6.4 Crescimento ósseo

6.4.1 Diâmetro ósseo e tamanho corporal

Houve correlações positivas significativas e fortes entre o tamanho corporal dos indivíduos e o diâmetro total dos ossos para ambos os sexos na rib^a Barcarena (Fêmeas $r=0,97$; Machos, $r=0,94$; ambos com $P < 0,001$) e na rib^a Laje (Fêmeas $r= 0,95$; Machos $r= 0,92$, ambos com $P < 0,001$) (Fig. 8).

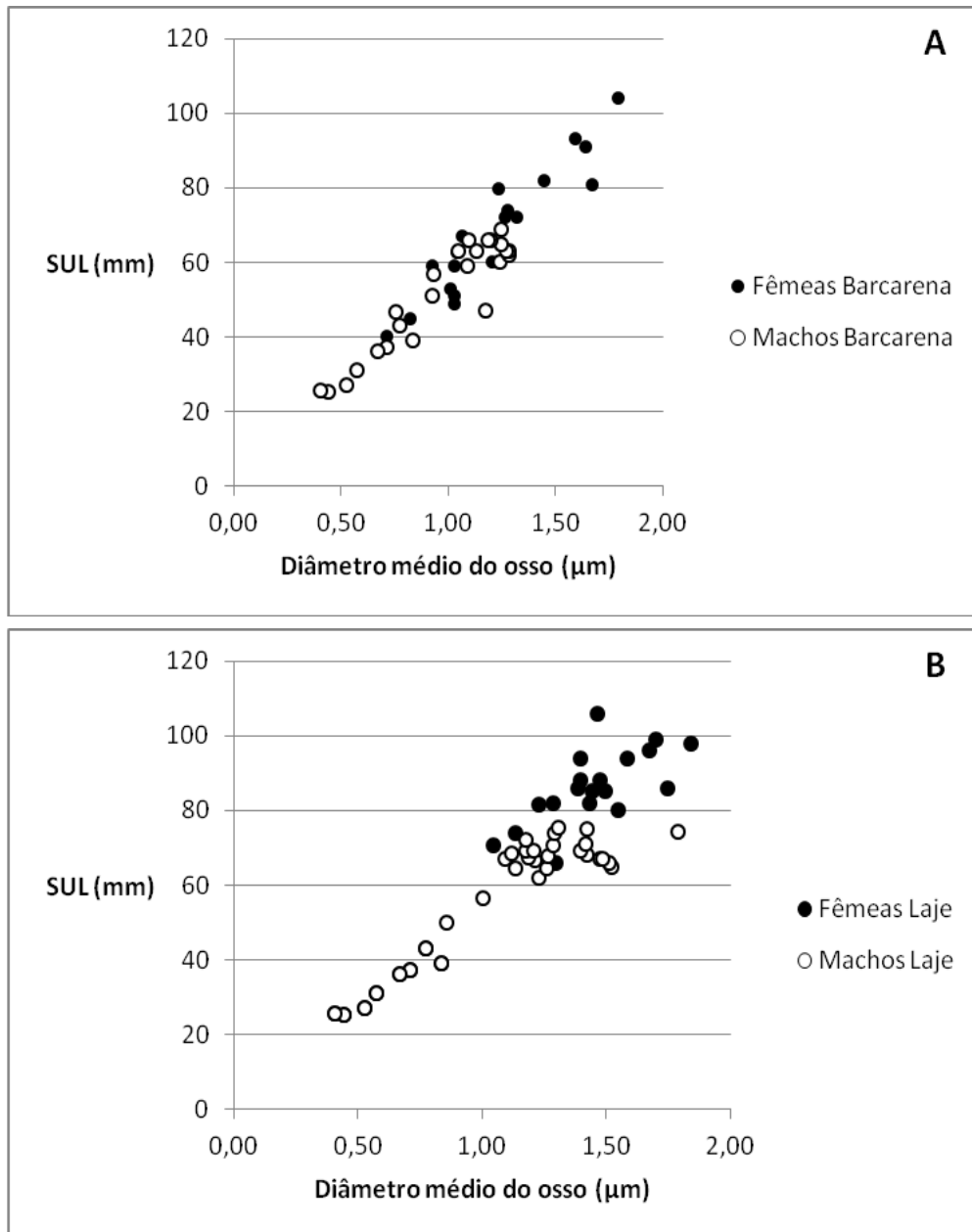


Figura 8. Relação entre o tamanho corporal (SUL, mm) e o diâmetro médio dos ossos (μm) para as ribeiras de Barcarena (A) e da Laje (B).

6.4.2 Diâmetro da cavidade e tamanho corporal

Observaram-se correlações positivas e significativas entre o tamanho corporal (SUL, mm) dos indivíduos e o diâmetro da cavidade dos ossos para ambos os sexos na rib^a Barcarena (Fêmeas $r= 0,84$, $P < 0,001$ e Machos $r= 0,54$, $P < 0,01$) e na ribeira da Laje (Fêmeas $r= 0,80$; Machos $r= 0,58$, ambos com $P < 0,001$) (Fig.9).

Para ambos os locais esta correlação foi mais forte para as fêmeas.

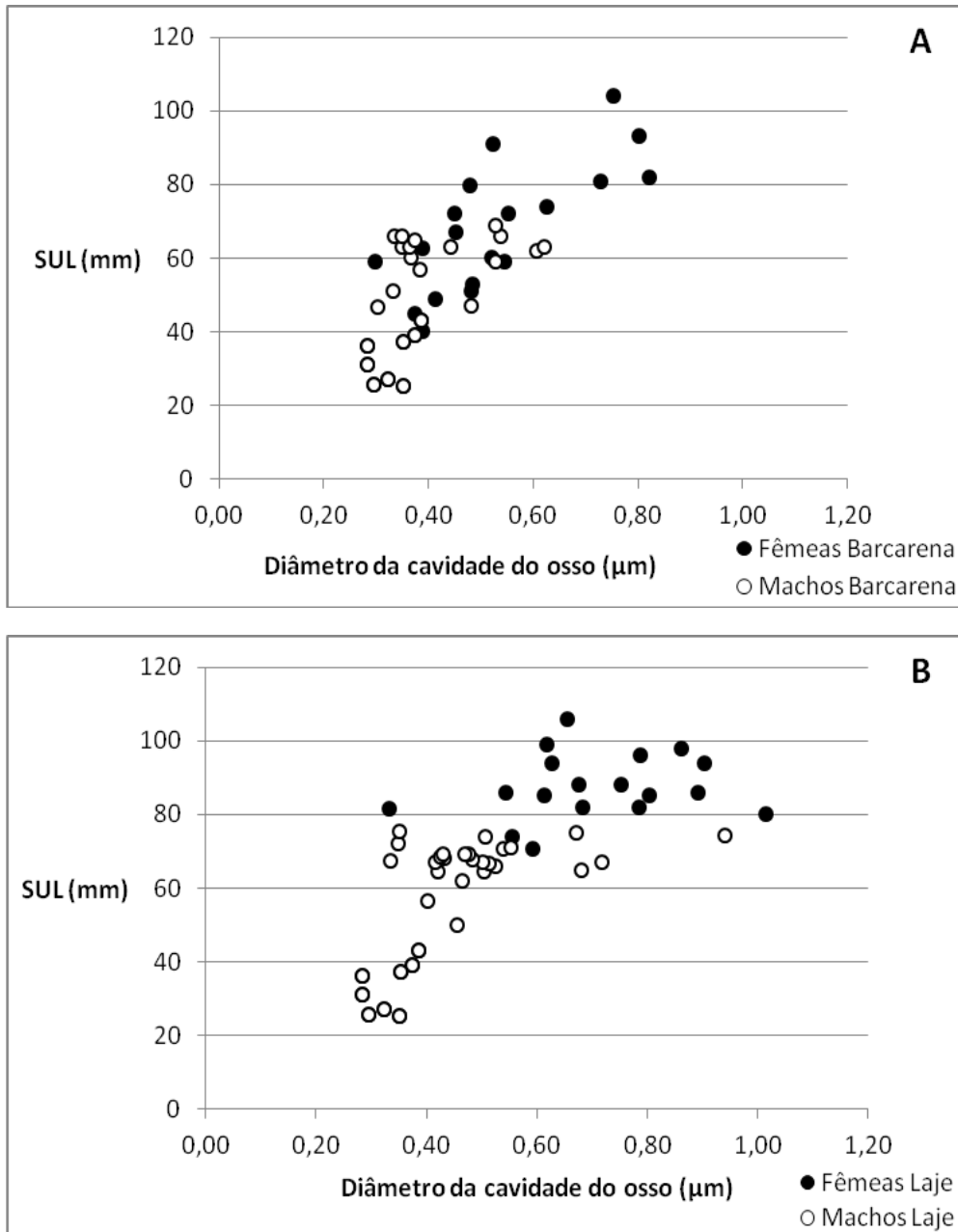


Figura 9. Relação entre o tamanho corporal (SUL, mm) e o diâmetro da cavidade dos ossos (µm) para as ribeiras de Barcarena (A) e da Laje (B).

6.4.3 Diâmetro ósseo e cavidade medular

Houve também correlações positivas e significativas entre o diâmetro da cavidade medular e o diâmetro dos ossos dos indivíduos para ambos os sexos na rib^a Barcarena (Fêmeas $r= 0,87$; Machos $r= 0,67$, ambos com $P < 0,001$) e para a Laje (Fêmeas $r= 0,87$; Machos $r= 0,77$, ambos com $P < 0,001$) (Fig.10). Observando os gráficos, compreende-se que a reabsorção do osso periosteal faça desaparecer as *LAGs* mais internas nos indivíduos com maior tamanho.

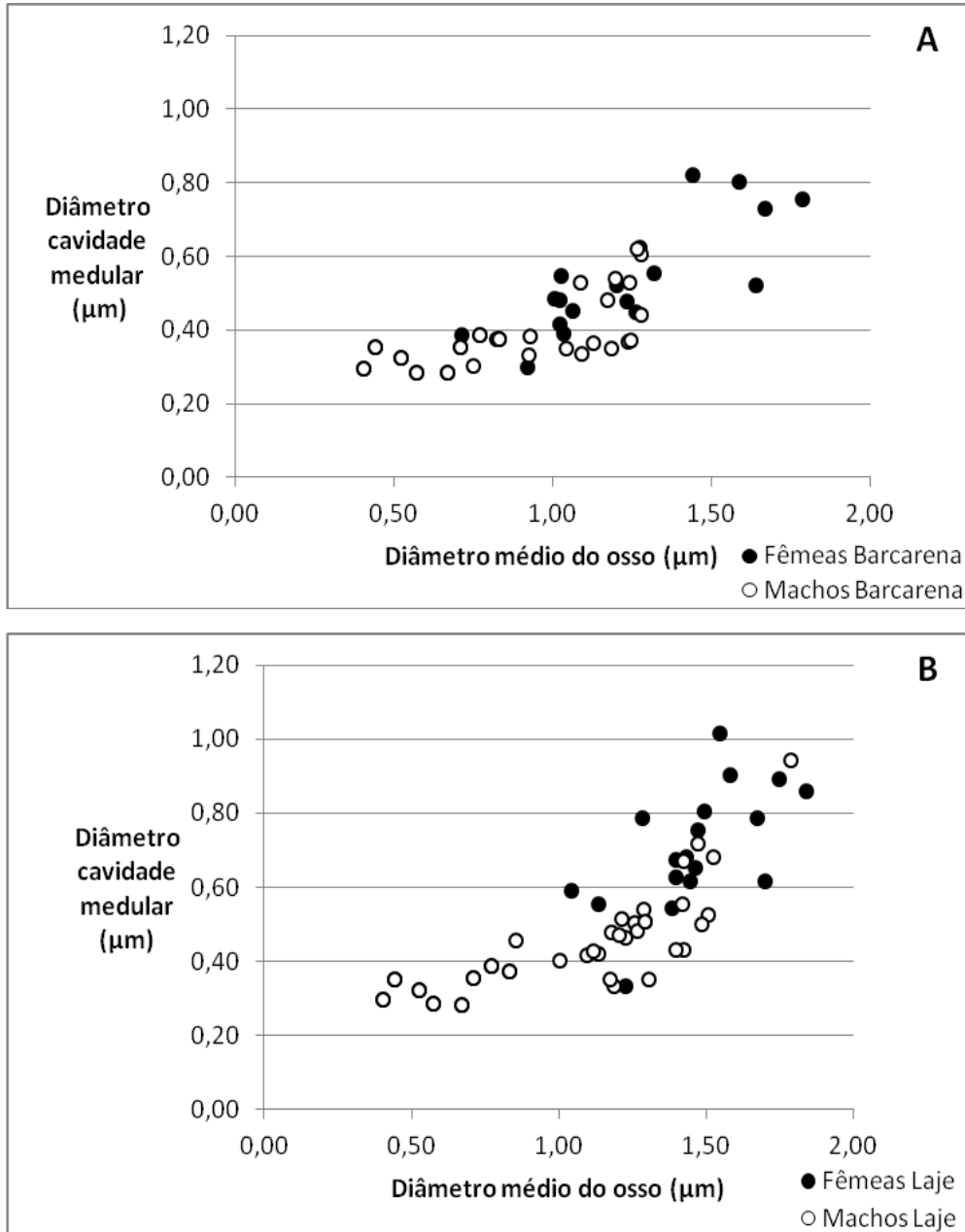


Figura 10. Relação entre o diâmetro da cavidade medular e o diâmetro médio dos ossos (μm) para as ribeiras de Barcarena (A) e da Laje (B).

6.5 Estrutura de idades e maturação sexual

Através da análise da pirâmide populacional para cada uma das ribeiras, foi possível verificar que as idades obtidas variaram entre 1 e 7 anos para as fêmeas e entre 1 e 6 anos para os machos (Fig. 11).

Na rib^a Barcarena as fêmeas mostraram uma média de idades ligeiramente superior à dos machos, mas esta diferença não foi significativa. Por outro lado, na rib^a Laje obtiveram-se diferenças significativas entre a idade dos dois sexos ($t_{42}=3,411$, $P<0,01$) tendo as fêmeas uma idade média superior à dos machos. Entre as duas ribeiras verificaram-se diferenças significativas entre a idade dos machos e das fêmeas (Machos: $t_{39}=-2,213$, $P<0,05$; Fêmeas: $t_{36}=-3,884$, $P<0,001$), apresentando tanto os machos como as fêmeas da rib^a Laje uma idade mais elevada (Tabela 4).

As idades máximas registadas para as fêmeas foram de 5 e 7 anos, para a rib^a Barcarena e a rib^a Laje respetivamente. Para os machos estes valores foram inferiores, assinalando-se uma idade máxima de 4 e 6 anos para a rib^a Barcarena e para a rib^a Laje, respetivamente.

Para a elaboração da estrutura de idades para cada ribeira foram contabilizados machos e fêmeas capturados em dois anos - 2010 e 2011. Para estes últimos foi necessário retirar um ano à idade estimada por forma a poder construir uma pirâmide etária referente ao ano de 2010. Esta análise não incluiu os juvenis uma vez que se considerou (tal como para outros anfíbios) que, estes ocupam geralmente habitats diferentes daqueles que são ocupados por adultos, não sendo de um modo geral capturáveis pelos mesmos métodos. Assim, o *ratio* juvenis/adultos numa amostra de *X. laevis* não reflete realmente a estrutura etária de uma população (Smirina 1994).

A rib^a Barcarena apresenta uma estrutura de idades mais equilibrada entre os dois sexos. Nesta há um maior número de indivíduos com menor idade, e a idade modal foi de 3 anos para indivíduos de ambos os sexos, que poderá indicar a idade em que todos os indivíduos já terão iniciado a sua reprodução. Por outro lado na rib^a Laje há uma distribuição mais desequilibrada, salientando-se os indivíduos mais velhos. Aqui a idade modal para as fêmeas corresponde aos 5 anos e para os machos aos 3 anos, indicando prováveis diferenças na idade de maturação sexual entre os dois sexos.

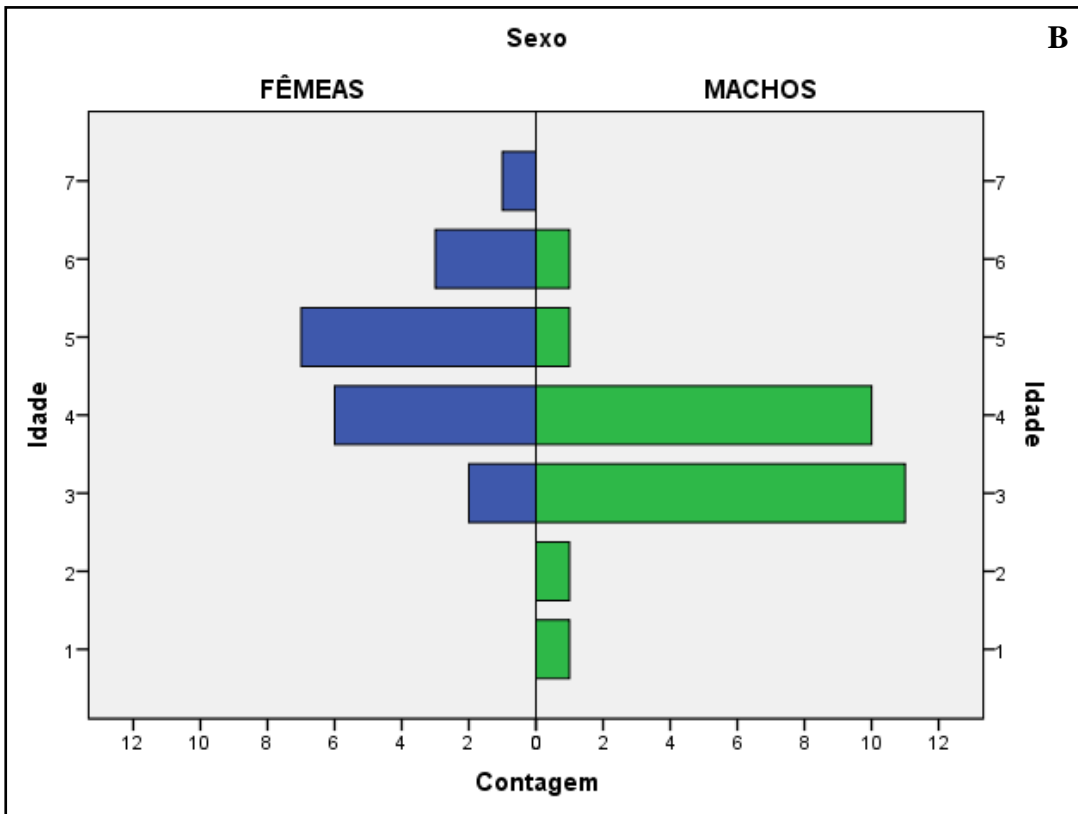
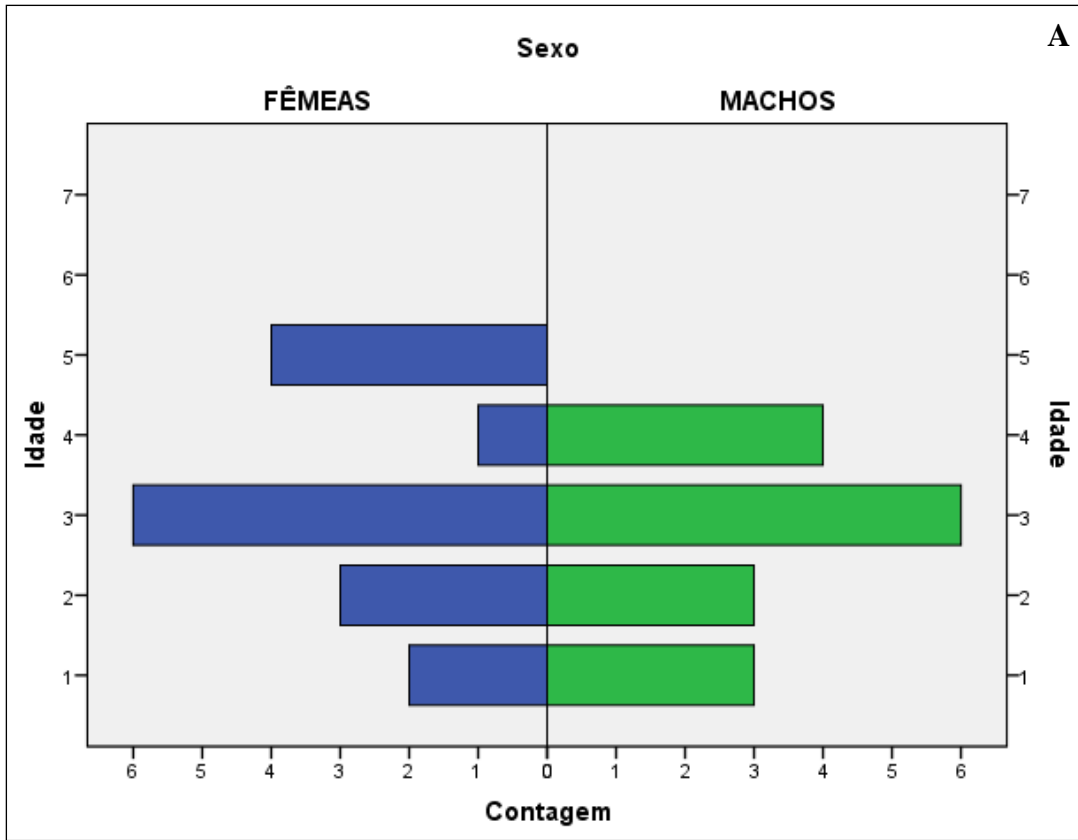


Figura 11. Estrutura de idades para machos e fêmeas das ribeiras de Barcarena (A) e da Laje (B), correspondente ao ano de 2010.

Tabela 4. Valores médios de idade (anos) para as ribeiras de Barcarena e da Laje.

População	n	Idade média (anos)
Barcarena		
Fêmeas	19	3,74±1,6
Machos	16	3,69±1,08
Laje		
Fêmeas	19	5,4±1,02
Machos	25	4,4±0,96

6.6 Relação entre tamanho corporal e idade: crescimento

A curva de Von Bertalanffy foi calculada para cada sexo e para os animais de cada ribeira, obtendo-se os valores de SUL máximo e da constante de crescimento expostos na Tabela 5. Analisando as curvas de crescimento obtidas para ambas as populações foi possível verificar diferenças nos valores dos parâmetros de SUL máximo e constante de crescimento obtidos (Fig. 12).

Nas fêmeas da rib^a Barcarena detetou-se um valor de SUL máximo mais elevado e uma constante de crescimento menor que nos machos. O mesmo se concluiu para a rib^a da Laje. Assim, em ambos os locais é importante frisar as claras diferenças observadas entre o valor de ambos os parâmetros obtidos para os dois sexos.

O menor valor da constante de crescimento verificado para as fêmeas significa que estas demoram mais tempo a atingir o seu tamanho máximo. Comparando os sexos dos exemplares das duas ribeiras, verificou-se que na rib^a Barcarena as fêmeas apresentaram menores valores de SUL máximo e de constante de crescimento. Também os machos revelaram menores valores de SUL máximo na rib^a Barcarena, mas nesta o valor da constante de crescimento é maior do que na rib^a Laje.

Tabela 5. Estimativa de parâmetros de crescimento obtidos através da equação de Von Bertalanffy com respetivos valores de \pm SD, para as duas populações estudadas.

População	Sexo	N	SULmáx (mm)	Constante de crescimento
Barcarena	Fêmeas+juvenis	27	120,28 \pm 48,15	0,15 \pm 0,11
	Machos+ juvenis	25	71,56 \pm 8,08	0,39 \pm 0,15
Laje	Fêmeas+ juvenis	27	128,53 \pm 31,29	0,17 \pm 0,09
	Machos+ juvenis	33	82,62 \pm 6,77	0,31 \pm 0,08

Analisando ao pormenor as curvas de crescimento para cada uma das ribeiras, verificou-se que para a rib^a Barcarena tanto machos como fêmeas têm um crescimento inicial muito semelhante, alterando-se a partir dos 3 anos de idade, altura a partir da qual as fêmeas apresentam um crescimento contínuo e os machos tendem a estabilizar o seu tamanho. Esta estabilização decorre a partir dos 4 anos, para valores de SUL entre 60 e 70 mm (Fig.12A). A população da rib^a da Laje apresenta as curvas bastante semelhantes, mas iniciam a sua divergência logo ao fim do 1º ano de idade, sendo aqui mais acentuada a diferença de tamanhos por idade (Fig.12B). Neste local os machos parecem estabilizar o seu tamanho a partir dos 5 anos, entre valores de SUL de 70 e 80 mm.

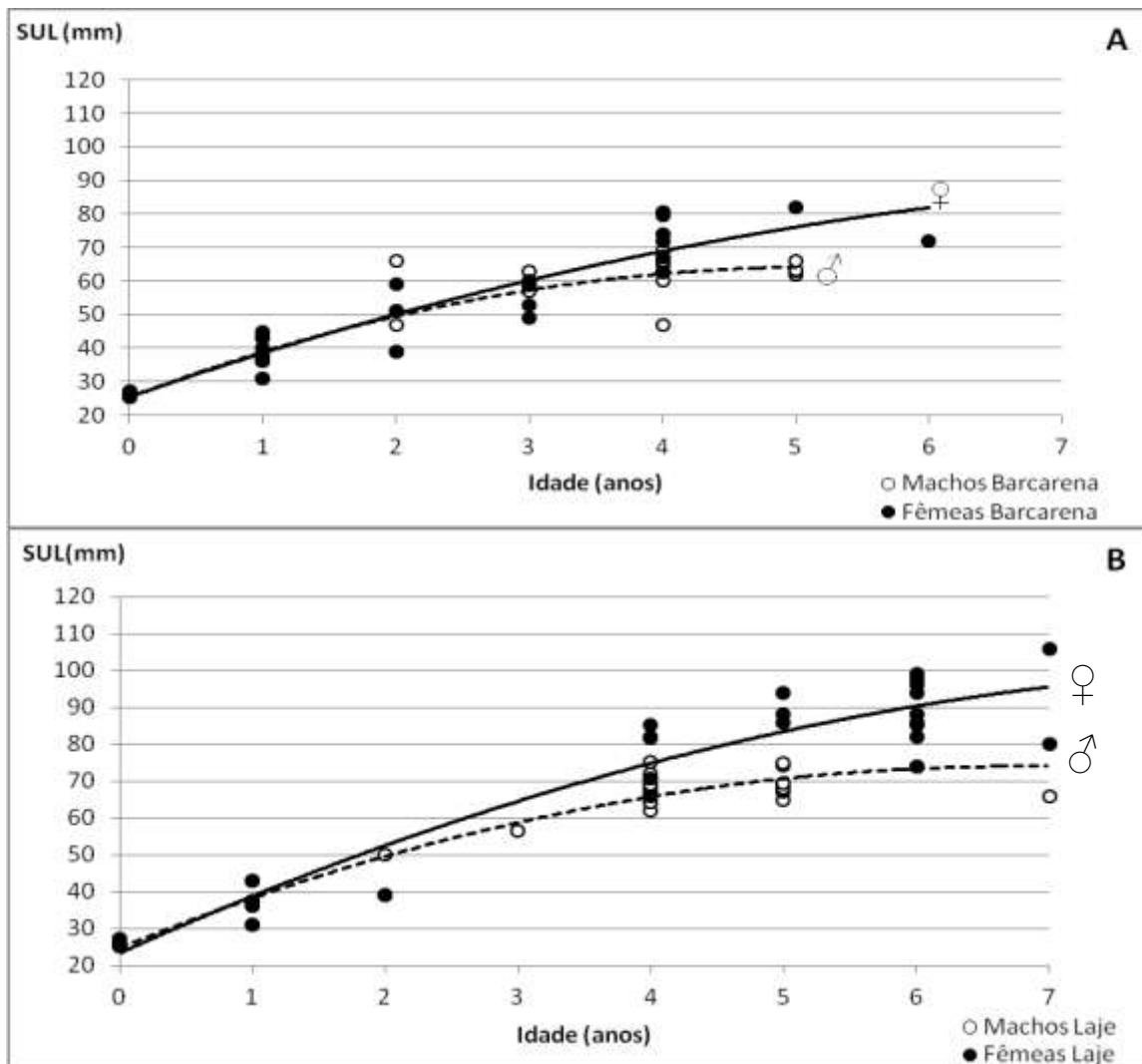


Figura 12. Curvas de crescimento para machos e fêmeas da espécie *X. laevis* nas ribeiras de Barcarena (A) e da Laje (B). Ambas resultam do ajuste da equação de von Bertalanffy aos valores de SUL (mm) para cada idade.

Nas curvas de ambas as populações é claro o crescimento mais acentuado e indefinido das fêmeas, que contrasta com o dos machos que estabiliza mais cedo (Fig. 13).

As diferenças nas curvas de crescimento entre ribeiras apenas são notórias a partir das idades mais avançadas, entre os 4 e os 5 anos. No entanto, não se verificam idades suficientemente avançadas na rib^a Barcarena e possivelmente esta será a razão para as diferenças identificadas na Figura 13.

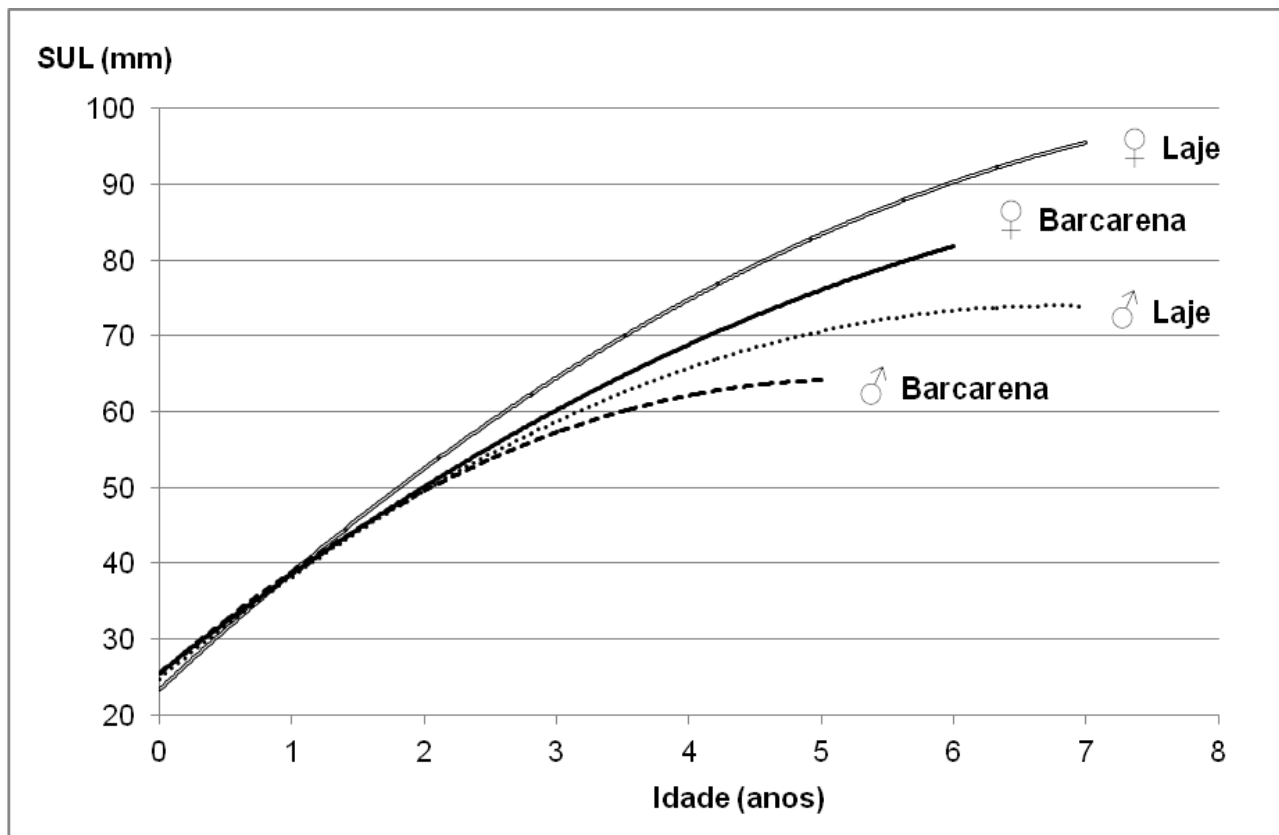


Figura 13. Curvas de crescimento para as ribeiras de Barcarena e da Laje para fêmeas e machos da espécie *X. laevis*. Ambas resultam do ajuste da equação de von Bertalanffy aos de SUL (mm) para cada idade.

7. Discussão

Uma vez que estas correspondem às primeiras e únicas populações de *X.laevis* invasoras conhecidas em Portugal, este estudo corresponde ao primeiro trabalho de esqueletocronologia sobre esta espécie realizado no nosso país. Fornece informação fundamental sobre a estrutura etária e curvas de crescimento da espécie para os locais estudados, permitindo uma comparação com populações invasoras de outros locais. Constitui ainda uma fonte de dados sobre a provável idade de maturação sexual e longevidade da espécie em Portugal.

7.1 Estrutura de tamanhos

No que respeita às diferenças de tamanhos observadas para ambos os sexos entre ribeiras, estes resultados são semelhantes aos resultados de Rebelo et al. (2011) para as mesmas populações indicando que a amostra obtida também refletiu a diferença de tamanho corporal previamente detetada. Estas diferenças verificadas entre machos e fêmeas eram expectáveis tendo em conta o dimorfismo conhecido para a espécie (Kobel et al. 1996), o qual também se documentou nas populações invasoras de *X. laevis* na Califórnia (McCoid and Fritts 1989) e no Sul de Gales (Measey 2001). Na população da Califórnia, tanto machos como fêmeas evidenciam tamanhos superiores aos registados no presente estudo, atingindo as fêmeas 119 mm e os machos 80 mm, o que pode ser devido às condições de temperatura que são de pelo menos 20° C durante todo o ano (McCoid and Fritts 1989). No Sul de Gales tanto machos como fêmeas são de tamanhos menores que os observados neste estudo (53 mm), o que aqui pode ser devido ao curto período com condições ótimas de temperatura que ocorre nesse local (Measey 2001). Em Portugal a espécie tem um período relativamente longo de crescimento com temperaturas ótimas (>20°C) (McCoid and Fritts 1989). Mesmo assim, quando comparado com o local de origem (África do Sul) onde as fêmeas atingem valores de SUL de 110 mm e os machos 83 mm (Tinsley et al. 1996), atesta-se que em Portugal as populações não deverão estar nas suas condições absolutamente ótimas.

7.2 Esqueletocronologia: crescimento ósseo

Tem aumentado a aplicação da técnica de esqueletocronologia às espécies invasoras (Schmeller et al. 2007; Newsome and Noble 1986; Measey 2001). Um estudo semelhante ao nosso já foi realizado para *X. laevis* no Sul de Gales (Reino Unido), com resultados positivos. Neste caso, confirmou-se a grande precisão da técnica esqueletocronológica para a datação de indivíduos de *X. laevis*, tendo sido utilizado o método de captura-recaptura de indivíduos marcados para concluir que a deposição de *LAGs* era feita de forma anual (Measey 2001). A recaptura de animais marcados permitiu igualmente identificar a natureza não anual de algumas irregularidades observadas nos cortes, naquelas situações que podem pôr em causa a correta atribuição de idade aos indivíduos (Marangoni et al. 2009; Measey 2001; McCoid and Fritts 1989). No nosso estudo não foi possível comprovar a deposição anual de *LAGs*, já que não houve o seguimento temporal dos indivíduos usados, pois estes são obtidos no decurso da campanha de controlo e erradicação desta espécie.

7.2.1 *LAGs* falsas e duplas

Relativamente à presença de *LAGs* duplas nalguns dos indivíduos que estudámos, estas são comuns para as espécies de climas temperados devido à ocorrência de períodos de quiescência no verão e inverno, correspondendo a uma dupla interrupção de crescimento no mesmo ano (Guarino and Erismis 2008; Caetano and Castanet 1993; Alcobendas and Castanet 2000). Houve neste estudo uma percentagem de cortes com ocorrência de *LAGs* duplas semelhante para ambas as ribeiras, sem que fosse possível identificar uma secção de ribeira onde esta frequência fosse maior (indicando potencialmente locais com condições mais desfavoráveis). Contudo, a frequência de falsas *LAGs* foi maior na rib^a Barcarena. Esta informação é importante porque a ocorrência de falsas *LAGs* parece estar relacionada com o surgimento de lesões ou com escassa disponibilidade de alimento (Mao et al. 2012; Khonsue et al. 2000; Liao and Lu 2010). Isto sugere que as condições para a espécie na rib^a Barcarena poderiam ser piores que na rib^a Laje.

7.2.2 Reabsorção óssea

A presença de um número relativamente elevado de indivíduos onde ocorreu a reabsorção da 1^a ou da 1^a e 2^a linhas e a sua substituição por osso endosteal não foi inesperada, visto que este

acontecimento é comum em espécies aquáticas e semi-aquáticas (Tsiora and Kyriakopoulou-Sklavounou 2002), como é o caso de *X. laevis* (Tinsley et al. 1996). Tal como aconteceu com outros autores, a medição dos anéis aquando da datação foi crucial para a identificação correta do número de anéis para esta espécie (Tsiora and Kyriakopoulou-Sklavounou 2002). Assim verificou-se uma maior reabsorção tanto da 1ª linha como da 2ª para a ribª Laje. Estes resultados poderão indicar que neste local há boas condições ambientais que acabam por favorecer um crescimento ativo e contínuo (Tsiora and Kyriakopoulou-Sklavounou 2002). Nestes casos também poderá estar a ocorrer a reabsorção de cálcio para a manutenção de funções metabólicas essenciais, causadas pelas deficiências de cálcio no ambiente (Eden et al. 2007; Stiffler 1993).

7.3 Estrutura etária da população

A distribuição normal das estruturas etárias dos anfíbios faria prever que o número de indivíduos diminuísse com a idade (Hemelaar 1988). Contudo neste estudo ambas as populações de rãs revelaram uma distribuição pouco normal e com idades significativamente diferentes.

Na ribª Laje, há indivíduos com idades mais elevadas, tanto em machos como em fêmeas, o que leva a crer que neste local há melhores condições de sobrevivência dos adultos, que possivelmente propiciam um crescimento contínuo. No entanto, neste local a estrutura populacional envelhecida também sugere que está a ocorrer uma falha no recrutamento de juvenis. Este resultado poderia estar ligado à mortalidade elevada de indivíduos mais jovens, aquando das campanhas de remoção realizadas nos anos anteriores (Rebelo et al. 2011) ou à falta de locais com condições ótimas para o sucesso da reprodução. A maior longevidade verificada na ribª Laje está igualmente associada ao adiamento da maturação sexual (Mao et al. 2012), a qual se comprovou com os resultados obtidos e se reflete numa baixa constante de crescimento (Halliday and Verrel 1988). Nesse local a idade de maturação parece suceder mais cedo nos machos do que nas fêmeas, o que seria previsível, visto que estas necessitam de acumular energia para o desenvolvimento das gónadas e óvulos (Mao et al. 2012; Tsiora and Kyriakopoulou-Sklavounou 2002). Conclusões semelhantes foram também retiradas por Smirina (1983) para o sapo-comum *Bufo bufo* na Polónia. Esta diferença de investimento no início da reprodução pode ser a razão para as diferenças observadas na idade média entre machos e fêmeas da ribª Laje. A ausência de relação entre tamanho corporal e fecundidade nos machos leva a que

estes invistam a sua energia na reprodução e não no crescimento, começando a reproduzir-se mais cedo e garantindo assim um maior sucesso reprodutor (Mao et al. 2012).

A população da rib^a Barcarena apresenta uma população com uma distribuição etária mais uniforme, observando-se ali um maior número de indivíduos pertencentes aos grupos etários mais novos do que na rib^a da Laje. A menor longevidade dos indivíduos de Barcarena poderá ser o reflexo da ocorrência de más condições de crescimento ou de uma taxa de mortalidade mais elevada dos indivíduos adultos. Esta hipótese é suportada pelos resultados obtidos noutros estudos, nos quais uma menor longevidade e um menor tamanho dos indivíduos indicam locais com maiores perturbações (Cogalniceanu and Miaud 2003), como a predação (Channing 2001). Por outro lado, o facto de na rib^a Barcarena se terem encontrado indivíduos mais novos pode indicar que esta ribeira reúne boas condições para a reprodução e sobrevivência de juvenis, ao contrário da rib^a Laje. Na rib^a Barcarena a idade de maturação parece ser a mesma para ambos os sexos, mas menor que aquela registada para as fêmeas da rib^a Laje. Tal sugere que aqui os indivíduos iniciam a reprodução mais cedo. Isto pode ser devido a uma maior taxa de mortalidade de adultos, relacionada com possíveis piores condições de sobrevivência (Cogalniceanu and Miaud 2003). É sabido que indivíduos precoces costumam ser de dimensões inferiores, produzem menos ovos e têm descendentes mais pequenos. Além disso indivíduos mais pequenos também sofrem maiores níveis de predação (Morrison et al. 2004), fatores que podem justificar a falta de indivíduos com idades mais avançadas nesta população.

Na rib^a Laje foram claras as diferenças entre a idade média dos machos e das fêmeas, apresentando estas últimas uma maior longevidade, facto observado em anteriores estudos de esqueletocronologia para outras espécies de anuros (Morrison et al. 2004; Liao et al. 2011; Liao and Lu 2010). Na rib^a Barcarena esta diferença não foi tão evidente, talvez devido ao facto da idade de maturação nos dois sexos ser a mesma, mas também aqui as fêmeas apresentaram uma maior longevidade. Esta evidência poderá estar relacionada com a maior exposição dos machos à predação, uma vez que estes são mais conspícuos (Liao et al. 2011).

Ao tentar justificar estas ocorrências, deparamo-nos com a difícil tarefa de determinar quais os fatores exatos que poderão estar a influenciar as diferenças observadas, sendo que os mesmos não são mutuamente exclusivos (Cheong et al. 2007).

Relativamente às condições ambientais, tanto os valores da temperatura como do pH da água são semelhantes entre as duas ribeiras e considerados ótimos para *X. laevis* (Tinsley et al. 1996), sendo pouco provável a sua influência na diferença de sobrevivência ou nas condições para a reprodução entre as populações. Tendo em conta a proximidade dos dois locais, é também pouco provável que estas diferenças estejam relacionadas com outros fatores ambientais como a luminosidade ou outras condições da água, como a presença de possíveis poluentes tóxicos. No entanto, esta última hipótese não será de descartar completamente uma vez que se verificou a presença de nitratos em diferentes quantidades em cada ribeira. Estudos realizados sobre o efeito de concentrações não letais de atrazina (Preez et al. 2005; Preez et al. 2008), e nitratos provenientes de escorrências agrícolas durante o período de metamorfose em *X. laevis* concluíram que determinadas concentrações de nitratos (superiores às observadas na Laje ou Barcarena) em conjunto com a atrazina poderiam levar a alterações do tamanho dos juvenis (Sullivan and Spence 2003). Nas margens da ribeira da Laje há uma maior ocupação do terreno por hortas (Rebelo *com. pess.*), que poderá ser a causa de uma maior concentração de nitratos na água dessa ribeira. Neste sentido não é de excluir totalmente o possível efeito deste componente nas diferenças de tamanho observadas.

Sabe-se ainda que existem algumas diferenças relativas ao habitat em cada ribeira que poderão provocar as diferenças observadas. A ribeira da Laje apresenta uma corrente de água mais calma que a de Barcarena, com ocorrência de pegos mais profundos (Rebelo et al. 2010b). Estas características podem corresponder a condições ambientais mais favoráveis ao crescimento da espécie, que por sua vez se refletirá num maior crescimento e numa média de idades superior. Uma vez que na rib^a da Laje a média de idade dos indivíduos foi mais elevada que na de Barcarena, é possível que no primeiro local ocorra uma melhor e maior quantidade de alimento (fator que afeta bastante o crescimento e a mortalidade dos indivíduos) (Cheong et al. 2007), e/ou menor predação e competição (Arendt 1997; Mangel and Stamps 2001; Schiesari et al. 2006).

Sendo esta uma espécie maioritariamente aquática (Tinsley et al. 1996), a existência de pegos mais profundos e águas mais calmas na ribeira da Laje poderá favorecer a existência de melhores condições para os adultos. Na rib^a Barcarena verifica-se a ocorrência de menores profundidades e uma maior eutrofização da água (Vale 2010) que podem corresponder a condições menos propícias à espécie. Poderá supor-se ainda que a rib^a Barcarena, apesar de

apresentar piores condições para a sobrevivência de adultos poderá ter melhores condições para a reprodução. Isto poderá ocorrer devido à presença de zonas adjacentes à ribeira (tributários), que reúnem condições ótimas para o crescimento dos juvenis (Rebelo, *com. pess.*). Assim, a grande quantidade de peixes existentes na ribeira da Laje e a ausência de tributários poderão originar a falta de juvenis, uma vez que é exercida aí uma elevada pressão de predação (Rebelo, *com. pess.*).

7.4 Crescimento

O tamanho dos indivíduos é uma consequência da taxa e duração do crescimento, pelo que maiores tamanhos podem ser obtidos através de um crescimento mais rápido ou mais prolongado (Metcalfé and Monaghan 2003). As fêmeas dos dois locais atingiram um tamanho máximo maior que o dos machos, provavelmente por viverem mais anos. O dimorfismo sexual relativo ao tamanho dos indivíduos poderá no entanto ser uma consequência de diferentes idades ou taxas de crescimento (Liao and Lu 2010) e/ou de diferenças na idade de maturação. O dimorfismo sexual no tamanho foi objeto de estudo doutros autores em anuros como o *Bufo bufo*, na Polónia (Smirina 1983), e *Rana epeirotica*, na Grécia, tendo concluído que o fenómeno está relacionado com a diferença das idades de maturação entre os sexos (Tsiora and Kyriakopoulou-Sklavounou 2002). Entre as duas populações registaram-se valores da constante de crescimento mais elevadas para os machos, indicando que as fêmeas demoram mais tempo a atingir o seu tamanho máximo o que é congruente com os diferentes investimentos na reprodução acima mencionados. Entre as duas ribeiras, verificaram-se valores mais elevados de tamanho máximo e de constante de crescimento para a rib^a Laje, exceto para os machos nos quais o valor da constante de crescimento foi menor que nos da rib^a Barcarena. Entre ribeiras não se verificaram diferenças entre estes parâmetros.

No presente estudo, não se apuraram diferenças entre os valores das constantes de crescimento, pelo que este parâmetro não aparenta ser a causa da diferença de tamanhos observada entre os dois locais. Por outro lado, o valor mais elevado do tamanho máximo atingido para os dois sexos na rib^a Laje poderia ser explicado pela maior longevidade das rãs. Esta hipótese reforça a possibilidade já mencionada de existirem melhores condições para a sobrevivência dos adultos neste local, ao contrário do que ocorre na rib^a Barcarena.

Apesar de não se verificarem diferenças entre a taxa de crescimento entre as duas populações estudadas, foi importante a sua determinação bem como da longevidade. Nos estudos realizados por Newsome and Noble (1986) e Schmeller et al. (2007) as estimativas da longevidade e da taxa de crescimento de espécies de anfíbios invasoras permitiram a comparação com os mesmos parâmetros de espécies de anfíbios autóctones. Desta forma poderá ser determinado o potencial impacto da invasão sobre as espécies nativas, avaliando a possibilidade de competição interespecífica. Por outro lado, tal como um estudo realizado com a espécie invasora *Rana catesbeiana*, os dados obtidos através da técnica de esqueletocronologia podem ser utilizados para avaliar a adaptação da espécie ao novo ambiente, permitindo prever futuros locais de invasão (Xuan et al. 2010).

8. Conclusão

Este foi um estudo pioneiro sobre a idade das populações e o crescimento dos indivíduos de *Xenopus laevis* em Portugal que permitiu fazer uma primeira abordagem à estrutura e dinâmica populacional dos dois locais onde a espécie se encontra. Foi possível abordar pela primeira vez e compreender a razão para a diferença de tamanhos individuais observada para as ribeiras da Laje e de Barcarena.

Perante os resultados obtidos é possível concluir que as diferenças observadas entre as ribeiras não estão relacionadas com a taxa de crescimento, uma vez que estas são relativamente semelhantes entre os dois locais, mas sim com a estrutura etária das populações. Este último ponto é sugerido pela evidência de más condições para a sobrevivência dos indivíduos adultos, mas boas para a reprodução na rib^a Barcarena e condições opostas para a rib^a Laje. Aparentemente, a rib^a Laje apresenta uma população “normal”, estando a falta de juvenis possivelmente relacionada com a intervenção do plano de erradicação. Por sua vez em Barcarena a idade de maturação antecipada, falta de adultos mais velhos e ocorrência de um número mais elevado de *LAGs* duplas nos ossos permitem concluir que é neste local que as condições serão mais desfavoráveis para a ocorrência da espécie, quando comparado com a Laje. Apesar disto, a população mais jovem aqui encontrada permite identificar a rib^a Barcarena como o local com uma maior necessidade de intervenção por parte do plano de erradicação no futuro.

Será ainda necessário realizar estudos futuros mais pormenorizados das condições bióticas e abióticas de ambos os locais que expliquem melhor as diferenças observadas nestas populações. Nisto inclui-se a contínua análise da presença de nitratos ou de outros produtos na água das ribeiras estudadas que possam de certa forma influenciar o crescimento dos indivíduos. Por outro lado, de futuro será conveniente aumentar a amostra de indivíduos, pois no presente estudo a falta de maiores idades na rib^a Barcarena tornou difícil uma melhor comparação entre as curvas de crescimento de ambas as populações.

No entanto, os dados obtidos através deste primeiro estudo permitem elaborar propostas de medidas específicas para a erradicação desta espécie, direcionadas para cada um dos locais invadidos. Neste sentido, para além das já utilizadas armadilhas e remoção manual aquando das

acções de erradicação na rib^a Barcarena, a ação deverá centrar-se na zona de tributários onde se encontram indivíduos juvenis, adaptando-se as armadilhas para esta faixa etária, ou proceder-se à remoção da água nestes locais. Para a rib^a Laje seria mais importante incidir sobre os adultos, persistindo com a remoção já efetuada, coincidindo com a época de reprodução, com maior concentração no curso normal da ribeira e menos nas zonas adjacentes. Nesta ribeira parece haver uma maior e mais rápida possibilidade de erradicação da espécie, uma vez que a sua população já está envelhecida, em parte possivelmente devido às ações de erradicação já aplicadas. No entanto, a rápida capacidade de recuperação desta espécie não permite uma diminuição da intensidade de intervenção.

O presente estudo, através da primeira abordagem à compreensão da dinâmica populacional existente, permitiu criar uma ferramenta testada e fiável especificamente aplicada a *X. laevis* em questão. Isto garante a possibilidade de replicação do estudo nos anos futuros, acompanhando a evolução e eficácia do plano de erradicação, constituindo um método valioso de avaliação e acompanhamento do sucesso do mesmo.

Por outro lado uma análise semelhante às espécies de anfíbios autótones locais permitirá determinar qual o impacto desta espécie invasora nessas populações. Neste sentido, a estimativa da estrutura etária, longevidade, tamanhos máximos atingidos e taxas de crescimento das espécies autótones da área de estudo permite determinar em que grau estão ou poderão vir a sofrer as mesmas com a presença deste invasor.

Também o conhecimento do processo de adaptação das populações invasoras de *X. laevis* às condições locais permitirá a identificação dos sítios com melhores ou piores condições de crescimento ou sobrevivência para *X. laevis*, prevendo a qualidade de possíveis novos locais de invasão. Esta ação facilitará a aplicação de medidas de erradicação preventivas com vista à conservação das espécies autótones.

9. Anexos

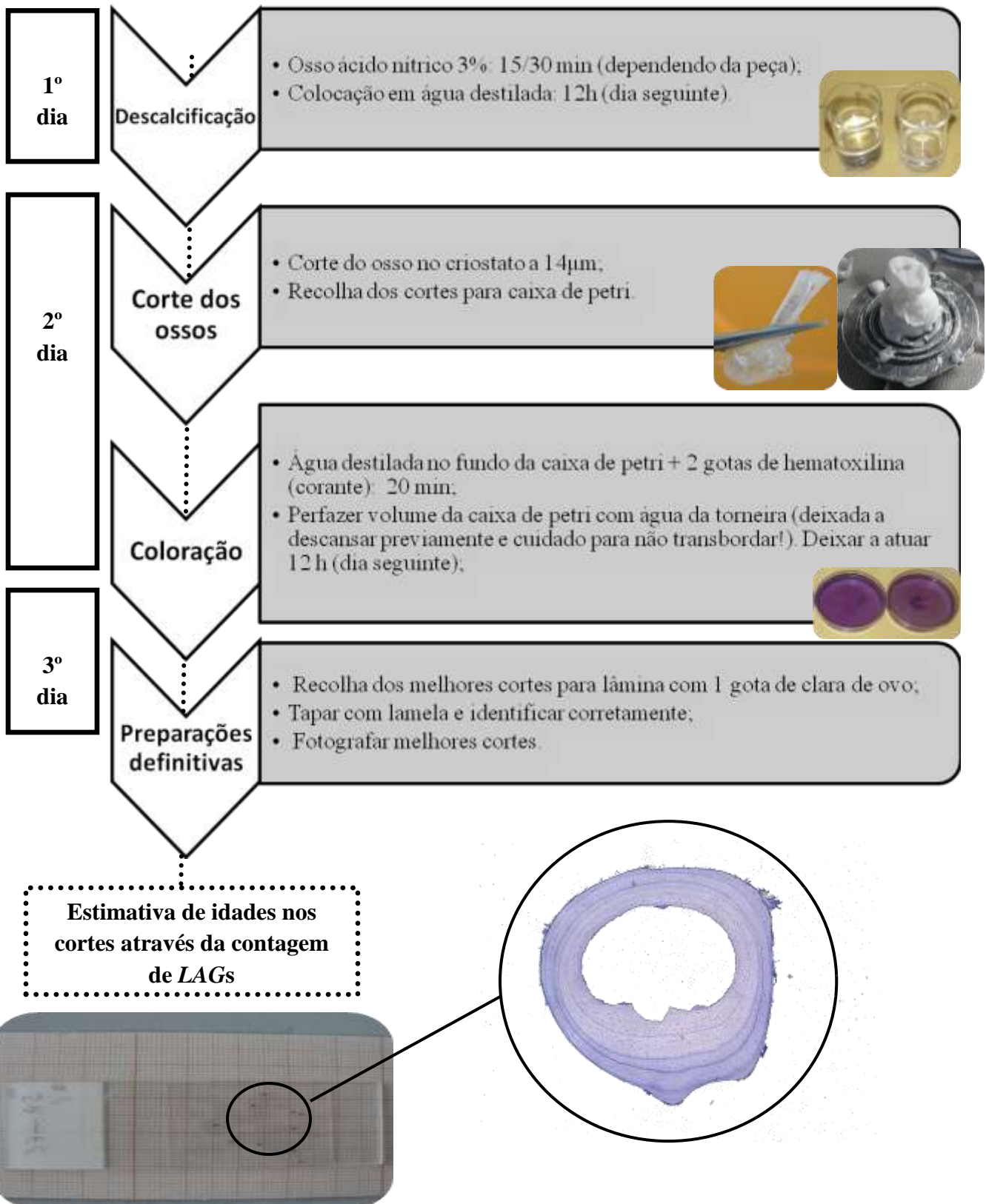
Tabela A. Extensões das ribeiras nas quais foram realizadas as sessões de amostragem

Ribeira	Local	Distância (metros)
Laje	Ponte de Talaíde	50
	Bairro dos Navegadores	200
	Hortas da Laje	100
	Bairro da Laje	500
	Estação Agronómica	300
	Jardim Marquês Pombal	350
	Parque Municipal	150
	Total	1650
Barcarena	Ponte São Marcos	250
	Lugar do Bico	100
	Fábrica da Pólvora	150
	Ribeira Abaixo	250
	Quinta Nossa Sra da Conceição	150
	Pedreira Italiana	100
	Murganhal	100
	Total	1100

Tabela B. Registo das coordenadas retangulares dos locais de amostragem em 2010 e 2011

Local	WGS 1984 Zone 29N	
	Coord_XX	Coord_YY
Rib ^a Laje		
Ponte Talaíde	472243	4287316
Bairro dos Navegadores	472303	4286941
Hortas da Laje	472643	4285649
Bairro da Laje	472709	4284624
Estação Agronómica Nacional	472573	4283378
Jardim Marquês de Pombal	472569	4282673
Parque Municipal	472656	4282415
Rib ^a Barcarena		
Ponte de S. Marcos	474815	4289263
Lugar do Bico	475072	4288632
Fábrica da Pólvora	475177	4288188
Ribeira-abaixo	475486	4287448
Qta. N. Sra. Da Conceição	475840	4286495
Pedreira Italiana	476245	4285073
Murganhal	476253	4284536

Fig. A. Processo de obtenção de secções de ossos de *X.laevis* para estimativa de idades dos indivíduos.



10. Referências¹

- Alcobendas M, Castanet J (2000) Bone growth plasticity among populations of *Salamandra salamandra*: interactions between internal and external factors. *Herpetologica* 36: 14–25
- Arendt JD (1997) Adaptive intrinsic growth rates: an integration across taxa. *The Quarterly Review of Biology* 72: 149–177
- Bernardes MLG (2008) Avaliação da população de uma nova espécie exótica em Portugal - *Xenopus laevis* (Daudin, 1802): biologia populacional e fenologia. Dissertação, Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências
- Bertalanffy Von L (1957) Quantitative laws in metabolism and growth. *The Quarterly Review of Biology* 32: 217–231
- Berven KA (1982) The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica*. I. An experimental analysis of life history traits. *Evolution* 36: 962–983
- Caetano MH, Castanet J (1993) Variability and microevolutionary patterns in *Triturus marmoratus* from Portugal: age, size, longevity and individual growth. *Amphibia-Reptilia* 14: 117–129
- Carruthers V (2008) *The Wildlife of Southern Africa*. Struik Publishers, Cape Town
- Castanet J, Smirina E (1990) Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie et Biologie Animale, 13^a Série* 11: 191–196
- Channing A (2001) *Amphibians of central and southern Africa*. Cornell University Press, New York
- Cheong S, Park D, Sung H, Lee JH, Park S (2007) Skeletochronological age determination and comparative demographic analysis of two populations of the gold-spotted pond frog (*Rana chosenica*). *J. Ecol. Field Biol* 30: 57–62
- Chum H, Felt S, Garner J, Green S (2013) Biology, behavior, and environmental enrichment for the captive African clawed frog (*Xenopus spp*). *Applied Animal Behaviour Science* 143: 150–156
- Cogalniceanu D, Miaud C (2003) Population age structure and growth in four syntopic amphibian species inhabiting a large river floodplain. *Can J Zool* 81: 1096–1106

¹Referências de acordo com as normas da revista *Biological Invasions*, Springer.

- Crespi EJ, Denver, R.J (2005) Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative biochemistry and physiology A* 141: 381–390
- Crivelli A, Seitz A, Jakob C, Miaud C (2002) Growth cycle of the marbled newt (*Triturus marmoratus*) in the Mediterranean region assessed by skeletochronology. *Amphibia-Reptilia*, 23: 407–418
- Deuchar EM (1975) *Xenopus*: the South African clawed frog. John Wiley, London. In: Hilken G, Dimigen J, Iglauer F (1995) Growth of *Xenopus laevis* under different laboratory rearing conditions. *Laboratory animals* 29: 152–162
- Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology* 136: 153–179
- Eaton BR, Paszkowski CA, Kristensen K, Hiltz M (2005) Life-history variation among populations of Canadian toads in Alberta, Canada. *Can.J.Zool.*83: 1421–1430
- Eden CJ, Whiteman HH, Duobinis-Gray L, Wissinger SA (2007) Accuracy assessment of skeletochronology in the Arizona tiger salamander (*Ambystoma tigrinum nebulosum*). *Copeia* 2: 471–477
- Freitag J, Krieger J, Strotmann J, Breer H (1995) Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis*. *Neuron* 15: 1383–1392
- Gibbons MM, McCarthy TK (1983) Age determination of frogs and toads (Amphibia, Anura) from North-western Europe. *Zoologica Scripta* 12: 145–151
- Guarino FM, Maria F, Francesco A, Cammarota M (1995) A skeletochronological analysis of three syntopic amphibian species from southern Italy. *Amphibia-Reptilia* 16: 297–302
- Guarino FM, Erismis UC (2008) Age determination and growth by skeletochronology of *Rana holtzi*, an endemic frog from Turkey. *Italian Journal of Zoology* 75: 237–242
- Gurdon JB (1996) *Xenopus* as a laboratory animal. In: Tinsley RC, Kobel HR (eds) *The biology of Xenopus*. Clarendon Press, Oxford, pp 3-5
- Halliday TR, Verrel P (1988) Body size and age in amphibians and reptiles. *Journal of Herpetology* 22: 253–265
- Hemelaar A (1988) Age, growth and other population characteristics of *Bufo bufo* from different latitudes and altitudes. *Journal of Herpetology* 22: 369–388
- Hilken G, Dimigen J, Iglauer F (1995) Growth of *Xenopus laevis* under different laboratory rearing conditions. *Laboratory animals* 29: 152–162

- Iturra-Cid M, Ortiz JC, Ibarguengoytía NR (2010) Age, size, and growth of the Chilean frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leiuperidae): latitudinal and altitudinal effects. *Copeia* 4: 609–617
- Kazuya M, Witschi A (1963) Functional sex-reversal in genetic females of *Xenopus laevis*, induced by implanted testes. *Genetics* 48: 1411–1421
- Kelley DB (1996) Sexual differentiation in *Xenopus laevis*. In: Tinsley RC, Kobel HR (eds) *The biology of Xenopus*. Clarendon Press, Oxford, pp 143-170
- Khonsue W, Matsui M, Misawa Y (2000) Age determination by skeletochronology of *Rana nigrovittata*, a frog from tropical forest of Thailand. *Zoological Science* 17: 253–257
- Kobel HR, Loumont C, Tinsley RC (1996) The extant species. In: Tinsley RC, Kobel HR (eds) *The biology of Xenopus*. Clarendon Press, Oxford, pp.9–31
- Kondolf M, Podolak K, Gaffney A (2010) *From high rise to coast: Revitalizing riveira da Barcarena*. Institute of Urban and Regional Development. University of California and Instituto Superior Técnico
- Kyriakopoulou-Sklavounou P, Stylianou P, Tsiora A (2008) A skeletochronological study of age, growth and longevity in a population of the frog *Rana ridibunda* from southern Europe. *Zoology* 111: 30–36
- Leclair MH, Leclair JR, Gallant J (2005) Application of skeletochronology to a population of *Pelobates cultripes* (Anura: Pelobatidae) from Portugal. *Journal of Herpetology* 39: 199–2007
- Liao WB, Lu X (2010) Age structure and body size of the Chuanxi tree frog *Hyla annectans chuanxiensis* from two different elevations in Sichuan (China). *Zoologischer Anzeiger* 248: 255–263
- Liao WB, Lu X, Shen YW, Hu JC (2011) Age structure and body size of two populations of the rice frog *Rana limnocharis* from different altitudes. *Italian Journal of Zoology* 78: 215–221
- Lillo F, Sicilia A, Castelli G (2005) An invasive population of *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) in Italy. *Herpetozoa* 18: 63–64
- Lobos G, Jaksic FM (2005) The ongoing invasion of African clawed frogs (*Xenopus laevis*) in Chile: causes of concern. *Biodiversity and Conservation* 14: 429–439
- Maddin HC, Eckhart L, Jaeger K, Russell AP, Ghannadan M (2009) The anatomy and development of the claws of *Xenopus laevis* (Lissamphibia: Anura) reveal alternate pathways of structural evolution in the integument of tetrapods. *Journal of Anatomy* 214: 607–619

- Mangel M, Stamps J (2001) Trade-offs between growth and mortality and the maintenance of individual variation in growth. *Evolutionary Ecology Research* 3: 583–593
- Mao M, Huang Y, Mi Z, Liu Y, Zhou C (2012) Skeletochronological study of age, longevity and growth in a population of *Rana nigromaculata* (Amphibia: Anura) in Sichuan, China. *Asian Herpetological Research* 3: 258–264
- Marangoni FEM, Chaefer EDS, Ajade ROC (2009) Growth-mark formation and chronology of two Neotropical anuran species. *Journal of Herpetology* 43: 546–550
- Matthews KR, Miaud C (2007) A Skeletochronological study of the age structure, growth, and longevity of the mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*, in the Sierra Nevada, California. *Copeia* 4: 986–993
- McCoid MJ, Fritts TH (1980) Observations of feral populations of *Xenopus laevis* (Pipidae) in Southern California. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 79: 82–86
- McCoid MJ, Fritts TH (1989) Growth and fatbody cycles in feral populations of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Pipidae) in California with comments on reproduction. *The Southwestern Naturalist* 34: 499–505
- McCoid MJ, Fritts TH (1995) Female reproductive potential and winter growth of African clawed frogs (Pipidae: *Xenopus laevis*) in California. *California Fish and Game* 81: 39–42
- Measey GJ (1998) Diet of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, UK. *Journal of Zoology* 246: 287–298
- Measey GJ (2001) Growth and ageing of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, U.K. *Journal Zoology of London* 254: 547–555
- Measey GJ, Rödder D, Green SL, Kobayashi R, Lillo F, Lobos G, Rebelo R, Thirion JM (2012) Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biological Invasions* 14: 2255–2270
- Measey GJ, Fouquet A (2006) Plotting the course of an African clawed frog invasion in Western France. *Animal Biology* 56: 95–102
- Measey GJ, Tinsley RC (1998) Feral *Xenopus laevis* in South Wales. *Herpetological Journal* 8: 23–27
- Metcalfe NB, Monaghan P (2003) Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology* 38: 935–940

- Miaud C, Andreone F, Ribe A, Michelis SD, Clima V, Castanet J, Francillon-Vieillot H, Guyétant R (2001) Variations in age, size at maturity and gestation duration among two neighbouring populations of the alpine salamander (*Salamandra lanzai*). *J. Zool. Lon* 254: 251–260
- Miaud C, Juha M (2001) Local adaptation or environmental induction? Causes of population differentiation in alpine amphibians. *Biota* 2: 31–50
- Miguel G, Almeida MC, Matos RS, Matos JS (2000) Controlo da Descarga de Excedentes no Sistema de Saneamento da Costa do Estoril - Diagnóstico e Formulação de Recomendações Estratégicas, LNEC,Lisboa
- Morrison CL, Hero JM, Browning J (2004) Altitudinal variation in the age at maturity, longevity, and reproductive lifespan of anurans in subtropical Queensland. *Herpetologica* 60: 34–44
- Navas CA (2006) Patterns of distribution of anurans in high Andean tropical elevations: insights from integrating biogeography and evolutionary physiology. *Integrative and comparative biology* 46: 82–91
- Newsome AE, Noble IR (1986) Ecological and physiological characters of invading species. In: Schmeller DS, Pagano A, Plénet S, Veith M (2007) Introducing water frogs-is there a risk for indigenous species in France? *Comptes Rendus Biologies* 330: 684–90
- Parker F, Robbins S, Loveridge A (1947) Breeding, rearing and care of the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *American Naturalist* 81: 38–49
- Pascual G, Llorente GA, Montori A, Richter-boix A (2007) Primera localización de *Xenopus laevis* en libertad en Espana. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.* 18: 42–44
- Peters J (1964) *Dictionary of Herpetology*. Hafner Publishing Company, New York and London
- Preez L.H, Solomon KR, Carr JA, Giesy JP, Gross TS, Kendall RJ, Smith EE, Kraak VK, Weldon C (2005) Population structure of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in maize-growing areas with atrazine application versus non-maize-growing areas in South Africa. *African Journal of Herpetology* 54: 61–68
- Preez LH, Kunene N, Everson GJ, Carr JA, Giesy JP, Gross TS, Hosmer AJ, Kendall RJ, Smith EE, Solomon KR, Kraak GJ (2008) Reproduction, larval growth, and reproductive development in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) exposed to atrazine. *Chemosphere* 71: 546–552
- Prinsloo JF, Schoonbee HJ, Nxiweni J (1981) Some observations on biological and other control measures of the African clawed frog *Xenopus laevis* (Daudin) (Pipidae, Amphibia) in fish ponds in Transkei. *Water SA* 7: 88–96

- Rabb G, Rabb MS (1965) Effects of isolation on reproductive behavior in the pipid frog *Xenopus laevis*. *American Zoology* 5: 685
- Rebelo R, Amaral P, Bernardes M, Oliveira J, Pinheiro P, Leitão D (2010a). *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), a new exotic amphibian in Portugal. *Biological Invasions* 12: 3383–3387
- Rebelo R, Carreira B, Sousa M (2011) Plano de controlo de *Xenopus laevis* nas ribeiras do Concelho de Oeiras. Relatório Ano II (2011). Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, pp 33
- Rebelo R, Leclair MH (2003) Site tenacity in the terrestrial salamandrid *Salamandra salamandra*. *Journal of Herpetology* 37: 440–445
- Rebelo R, Sousa M, Vale P (2010b) Plano de erradicação de *Xenopus laevis* das ribeiras do Concelho de Oeiras. Relatório Ano I (2010). Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, pp.33
- Rozenblut B, Ogielska M (2005) Development and growth of long bones in European water frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), with remarks on age determination. *Journal of Morphology* 265: 304–317
- Sagor ES, Ouellet M, Barten E, Green DM (1998) Skeletochronology and geographic variation in age structure in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Journal of Herpetology* 32: 469–474
- Sarasola-Puente V, Gosá A, Oromí N, Madeira MJ, Lizana M (2011) Growth, size and age at maturity of the agile frog (*Rana dalmatina*) in an Iberian Peninsula population. *Zoology* 114: 150–154
- Schiesari L, Peacor SD, Werner EE (2006) The growth-mortality tradeoff: evidence from anuran larvae and consequences for species distributions. *Oecologia* 149: 194–202
- Schmeller DS, Pagano A, Plénet S, Veith M (2007) Introducing water frogs- is there a risk for indigenous species in France? *Comptes Rendus Biologies* 330: 684–690
- Smirina EM (1983) Age-determination and retrospective body size evaluation in the live common toads (*Bufo bufo*). *Zoologicheskyy Zhurnal* 62: 437–444
- Smirina EM (1994) Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology* 40: 133–146
- Smith-Gill SJ, Keith AB (1979) Predicting amphibian metamorphosis. *American Naturalist* 113: 563–585
- Sokol OM (1969) Feeding in the pipid frog *Hymenochirus boettgeri*. *Herpetologica*, 25: 9–24

- Stiffler DF (1993) Amphibian calcium metabolism. *The Journal of Experimental Biology* 184: 47–61
- Sullivan KB, Spence KM (2003) Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 627–635
- Tinsley RC, McCoid MJ (1996) Feral populations of *Xenopus* outside Africa. In: Tinsley RC, Kobel HR (eds) *The biology of Xenopus*. Clarendon Press, Oxford, pp. 81-93
- Tinsley RC, Loumount CR, Kobel HR (1996) Geographical distribution and ecology. In: Tinsley RC, Kobel HR (eds) *The biology of Xenopus*. Clarendon Press, Oxford, pp.35-56
- Tobias ML, Barnard C, Hagan RO, Horng SH, Rand M, Kelley DB (2004) Vocal communication between male *Xenopus laevis*. *Animal Behaviour* 67: 353–365
- Tsiora A, Kyriakopoulou-Sklavounou P (2002) A skeletochronological study of age and growth in relation to adult size in the water frog *Rana epirotica*. *Zoology* 105: 55–60
- Üzüm N (2009) A skeletochronological study of age , growth and longevity in a population of the Caucasian salamander, *Mertensiella caucasica* (Waga 1876) (Caudata : Salamandridae) from Turkey. *North-Western Journal of Zoology* 5: 74–84
- Vale P (2010) Plano de erradicação de *Xenopus laevis* (Daudin 1802) em Portugal: Avaliação da primeira fase e pesquisa da presença do fungo patogénico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, Pessier & Nichols 1999). Dissertação, Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências
- Wake DB, Castanet J (1995) A Skeletochronological study of growth and age in relation to adult size in *Batrachoseps attenuatus*. *Journal of Herpetology* 29: 60–65
- Wassersug R (1996) The biology of *Xenopus laevis* tadpoles. In: Tinsley RC, Kobel HR (eds) *The biology of Xenopus*. Clarendon Press, Oxford, pp.195–207
- Xuan L, Yiming L, McGarrity M (2010) Geographical variation in body size and sexual size dimorphism of introduced American bullfrogs in Southwestern China. *Biological Invasions* 12: 2037–2047