



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
EVOLUÇÃO**

FABIANE SANTANA ANNIBALE

**SOBRE A ECOMORFOLOGIA DE GIRINOS:
AS IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS DA VARIAÇÃO NAS
ESTRUTURAS ORAIS**

**Goiânia
2019**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Fabiane Santana Annibale

Título do trabalho: Sobre a ecomorfologia de girinos: as implicações funcionais da variação nas estruturas orais

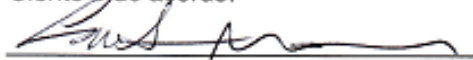
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 26 / 03 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

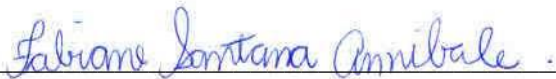
Nome completo do autor: Fabiane Santana Annibale

Título do trabalho: Sobre a ecomorfologia de girinos: as implicações funcionais da variação nas estruturas orais

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 02 / 08 / 2022

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

FABIANE SANTANA ANNIBALE

**SOBRE A ECOMORFOLOGIA DE GIRINOS:
AS IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS DA VARIAÇÃO
NAS ESTRUTURAS ORAIS**

Tese de Doutorado apresentada à
Universidade Federal de Goiás como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ecologia e Evolução para
obtenção do título de Doutora em Ecologia
e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Nomura
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise de C.
Rossa-Feres

**Goiânia
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Annibale, Fabiane Santana
Sobre a ecomorfologia de girinos: as implicações funcionais da
variação nas estruturas orais [manuscrito] / Fabiane Santana Annibale.
2019.
0 124 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Nomura; co-orientador Dr. Denise de
Cerqueira Rossa-Feres.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
Evolução, Goiânia, 2019.
Bibliografia. Anexos.

1. larvas de anuros. 2. ecomorfologia. 3. comportamento
alimentar. 4. partilha de nicho. 5. cienciometria. I. Nomura, Fausto ,
orient. II. Título.

CDU 574



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - UFG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO - PPGEE**

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE Nº 82

Aos vinte e seis dias do mês de março de 2019 (26/03/2019), às treze horas (13h), no CIAR (Centro Integrado de Aprendizagem em Rede), UFG, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Prof. Dr. Fausto Nomura, ICB/UFG; Prof. Dr. Rogério Pereira Bastos, ICB/UFG; Prof. Dr. Natan Medeiros Maciel, ICB/UFG; Prof. Dr. Tiago Leite Pezzuti, UFV (via teleconferência); Profa. Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado, UNESP/Jaboticabal**; para, em sessão pública presidida pelo (a) primeiro(a) examinador(a) citado(a), procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"Sobre a ecomorfologia de girinos: as implicações funcionais da variação nas estruturas orais"**, em nível de doutorado, área de concentração em Ecologia e Evolução, de autoria de **Fabiane Santana Annibale**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo(a) presidente(a), que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida a(o) autor(a) da tese que, em cerca de 35 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a(o) examinada(o), tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da tese. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1127 de dezembro de 2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, a tese foi Aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Doutor(a) em Ecologia e Evolução pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da tese na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h e 42 min.,

encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Suely Ana Ribeiro, secretária executiva da Universidade Federal de Goiás - UFG, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.



Prof. Dr. Fausto Nomura

Presidente da banca

ICB/UFG



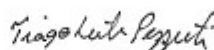
Prof. Dr. Rogério Pereira Bastos

ICB/UFG



Prof. Dr. Natan Medeiros Maciel

ICB/UFG



Prof. Dr. Tiago Leite Pezzuti

UFV



Profa. Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado

UNESP/Jaboticabal

“Ribbit-ribbit-knee-deep-ribbit”

Kermit the Frog

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Fausto Nomura por compartilhar comigo seu conhecimento sobre girinos e ecologia, por ter guiado meu caminho, pela paciência durante todo esse tempo, pela confiança e por lidar com humor em diversas situações. Foi uma oportunidade incrível trabalhar com esse ótimo profissional!

À Prof.^a Dr.^a Denise de Cerqueira Rossa-Feres, a tia Dê, pela co-orientação, por ter me permitido usar seu laboratório e equipamentos pelo tempo que eu precisasse, por me proporcionar experiências que me levaram a adorar os girinos, pela confiança e parceria no trabalho e na vida.

Aos dois membros internacionais da nossa equipe de pesquisa, Prof. Dr. Richard Wassersug e Prof. Dr. Matthew Venesky, que confiaram em mim mesmo tão distantes e que me dão apoio e reconhecimento sempre.

Ao biólogo Carlos Eduardo de Sousa por ser meus braços direito e esquerdo no trabalho ao longo de tanto tempo, inclusive durante os apuros! Obrigada pelos melhores trabalhos de campo e por me ajudar no laboratório, pelas conversas construtivas e terapêuticas durante o almoço, por tantos risos e companheirismo!

À Dr.^a Verônica Thiemi Tsutae de Sousa por ser minha consultora estatística, “girinística” e ecológica. Obrigada pela paciência, pela confiança, pelo esforço e pelas discussões para melhorar o trabalho, e também pelas reflexões sobre tantas coisas referentes ou não ao trabalho. E, claro, obrigada por ser uma grande parceira nessa vida!

Todas essas pessoas são membros de uma equipe de pesquisadores fantástica com quem eu tive o prazer de trabalhar, e cuja afinidade se traduziu em uma animada parceria e em um trabalho sólido que vem rendendo bons frutos.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo, que abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar uma parte fundamental desse estudo. Obrigada pelo incentivo, por discutir ideias e por confiar em mim!

Aos membros de dois laboratórios dos quais eu faço parte, LEFunC (Laboratório de Ecologia e Funcionamento de Comunidades) e LET (Laboratório de Ecologia Teórica). Agradeço também aos membros que saíram desses laboratórios durante meu doutorado. Obrigada pelas tantas formas como vocês me ajudaram, seja com estadia, com discussões para melhorar o trabalho, em disciplinas, em coletas, durante os experimentos. Em especial, obrigada à M.^a Katiuce de Oliveira da Rocha Picheli por me ceder as fotos lindas dos girinos e à Dr.^a Alba Navarro Lozano por produzir os mapas que ilustram o trabalho.

Obrigada ao Prof. Dr. Natan Medeiros Maciel e ao Prof. Dr. Alessandro Ribeiro de Moraes pelas sugestões e comentários no texto da qualificação, que eu pude implementar na tese.

À minha enorme família, sem a qual eu não chegaria a lugar algum. Obrigada a meus pais pelo apoio incondicional, por acreditarem em mim e valorizarem meus estudos e sonhos. Obrigada ao meu irmão, por ser meu exemplo de dedicação e por me incentivar mesmo que através das piadas! Obrigada aos irmãos que eu recebi nessa vida e cuja amizade é o maior combustível para seguir em frente! E obrigada ao meu parceiro amado, Dr. Hederson Vinícius de Souza, vulgo Amor, pelo apoio, pelo companheirismo em tantos momentos (até em coletas), por discutir ideias, pela paciência e principalmente, pelo respeito ao meu trabalho e a mim.

Durante o doutorado eu recebi financiamento pela CAPES e suporte financeiro pelos professores Fausto Nomura, Denise de C. Rossa-Feres e Richard Wassersug.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO 1	9
SOBRE A ECOMORFOLOGIA DE GIRINOS: REVISÃO E ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA	9
RESUMO	10
ECOMORFOLOGIA	11
ECOMORFOLOGIA DE GIRINOS	15
<i>Importância das larvas em estudos sobre ecologia e evolução</i>	15
<i>Morfologia de girinos e o ambiente</i>	17
<i>Histórico da ecomorfologia de girinos</i>	18
<i>Medindo a variação morfológica – estudos descritivos</i>	21
<i>Estudos experimentais</i>	24
<i>Acompanhando o desenvolvimento da ecomorfologia de girinos</i>	28
MATERIAL E MÉTODOS	28
<i>Levantamento de dados</i>	28
<i>Análise de dados</i>	30
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	36
<i>Lacunas no conhecimento e direcionamentos futuros</i>	38
Estudos em longo prazo e mudanças climáticas	38
Funções das estruturas anatômicas	40
Morfologia e o ambiente	41
Análise integrada da morfologia oral	43
Plasticidade	44
Desafios para o Brasil	45
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
MATERIAL SUPLEMENTAR	54
CAPÍTULO 2	55
INFLUENCE OF SUBSTRATE ORIENTATION ON TADPOLES FEEDING EFFICIENCY	55
ABSTRACT	56
INTRODUCTION	57
MATERIALS AND METHODS	60
<i>Species</i>	60
<i>Sampling and experiment design</i>	63
<i>Ethics statement</i>	67
<i>Statistical analyses</i>	68
RESULTS	69
<i>Bottom-dwelling vs midwater tadpoles with similar oral morphology</i>	71
<i>Similar microhabitat (midwater) but different oral morphology</i>	72
<i>Similar microhabitat (bottom) and oral morphology</i>	74
<i>Other behavioral observations</i>	76

DISCUSSION	76
<i>Bottom-dwelling vs midwater tadpoles with similar oral morphology</i>	77
<i>Similar microhabitat (midwater) but different oral morphology</i>	78
<i>Similar microhabitat (bottom) and oral morphology</i>	80
<i>Conclusions and future directions</i>	80
ACKNOWLEDGEMENTS	82
REFERENCES	83
SUPPLEMENTARY INFORMATION	86
CAPÍTULO 3	88
SMOOTH, ROUGH, OR STRIATED: INFLUENCE OF SUBSTRATE TEXTURE ON TADPOLES' GROWTH RATES	88
ABSTRACT	89
INTRODUCTION	90
MATERIALS AND METHODS	93
<i>Species</i>	93
<i>Collection and acclimation of tadpoles</i>	95
<i>Experiment</i>	96
<i>Statistical analyses</i>	98
Prediction 1: variation in the number of labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures	100
Prediction 2: variation in the number of gaps in the labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrate with different textures	101
Prediction 3: variation in marginal papillae configuration influences differently the food consumption of species grazing upon substrates with different textures	102
RESULTS	103
<i>Prediction 1: variation in the number of labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures</i>	103
<i>Prediction 2: variation in the number of gaps in the labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures</i>	106
<i>Prediction 3: variation in marginal papillae configuration influences differently the food consumption of species grazing upon substrates with different textures</i>	109
DISCUSSION	110
<i>Prediction 1: variation in the number of labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures</i>	111
<i>Prediction 2: variation in the number of gaps in the labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures</i>	114
<i>Prediction 3: variation in marginal papillae configuration influences differently the food consumption of species grazing upon substrates with different textures</i>	115
<i>Final considerations</i>	117
REFERENCES	119
SUPPLEMENTARY INFORMATION	122
CONCLUSÕES GERAIS	124

RESUMO

Entender o papel da morfologia na ecologia dos animais nos ajuda a conhecer o significado adaptativo da variação nas estruturas anatômicas dos organismos. Para girinos, entretanto, as implicações da variação na morfologia das espécies sobre a forma como os girinos utilizam e partilham recursos no ambiente ainda são pouco conhecidas. Essa tese foi elaborada com o objetivo de entender melhor a ecomorfologia de girinos e está dividida entre três capítulos. O primeiro capítulo é constituído por uma revisão bibliográfica e uma análise cienciométrica sobre a ecomorfologia de girinos. Através do levantamento de dados foi possível conhecer a trajetória da ecomorfologia de girinos até os dias atuais, quantificar o conhecimento científico produzido nessa área e identificar as principais lacunas que podem guiar estudos futuros. Nós verificamos que os estudos ecomorfológicos sobre girinos vêm aumentando ao longo do tempo, com mudanças nas metodologias de estudo e novas perspectivas para entender a ecologia e a evolução dos girinos. Porém, muitos desses estudos são descritivos ou investigam a plasticidade fenotípica das larvas em resposta a predadores. Desse modo, ainda existem muitos fatores ambientais a serem explorados, assim como a necessidade de estudos que vão além de inferências para que a ecomorfologia de girinos possa contribuir com a compreensão da diversidade das larvas de anuros (i.e., ecologia e evolução), e com a conservação desses animais. Visando preencher algumas dessas lacunas no conhecimento, o segundo e o terceiro capítulo correspondem a pesquisas sobre como varia o desempenho alimentar de espécies que diferem quanto à morfologia oral externa quando os girinos se alimentam em substratos com diferentes propriedades físicas. No segundo capítulo nós testamos o desempenho de girinos se alimentando em substratos dispostos em diferentes orientações. Nós verificamos que espécies com morfologia oral semelhante possuem também desempenho semelhante quando se alimentam em

substratos posicionados em diferentes orientações. O desempenho só é diferente em alguns ângulos específicos (i.e. verticais) entre espécies que ocorrem em profundidades diferentes no ambiente. Já entre girinos que ocorrem no mesmo ambiente, mas variam quanto à morfologia oral externa, enquanto o desempenho de algumas espécies independe do ângulo do substrato onde os girinos se alimentam, outras espécies são mais eficientes explorando orientações específicas do substrato. Nós concluímos que essas diferenças no desempenho das espécies podem determinar como os girinos selecionam e/ou partilham recursos no ambiente. No terceiro capítulo nós investigamos de forma mais detalhada a influência da variação na morfologia oral externa de girinos sobre o desempenho das espécies quando as larvas se alimentam em substratos com diferentes texturas. Nós verificamos que a variação no número de fileiras de dentes labiais e na configuração das papilas marginais produzem diferenças no desempenho das espécies, sugerindo especializações do comportamento alimentar das larvas. Além disso, nós verificamos que girinos com o tipo de morfologia oral externa mais comum entre as larvas de anuros tiveram os melhores desempenhos entre todas as espécies testadas. Isso pode ajudar a explicar o significado adaptativo da variação morfológica entre as larvas de anuros.

Palavras-chave: Larvas de anuros, ecomorfologia, comportamento alimentar

ABSTRACT

The role of morphology on animals' ecology helps us understand the adaptive significance of variation in anatomical structures among species. However, for tadpoles the implications of variation in species morphology on resource use and partitioning among species are poorly understood. This thesis was elaborated in order to better understand tadpoles' ecomorphology, and is divided into three chapters. The first chapter consists on a bibliographical review and a scientometric analysis on tadpoles' ecomorphology. Through the data survey we described the tadpoles' ecomorphological trajectory, quantified the scientific knowledge produced in this study area, and identified the main gaps that may guide future studies. We verified that ecomorphological studies on tadpoles have been increasing over time, with modifications in methodologies and new perspectives to understand the ecology and evolution of tadpoles. However, many of these studies are descriptive or investigate the phenotypic plasticity of larvae in response to predators. Thus, there are still many environmental factors to be explored, as well as the necessity of studying beyond inferences. As such, tadpoles' ecomorphology will be able to help us understand the diversity of anuran larvae (i.e., ecology and evolution) and with conservation of these animals. Aiming to fill some of these gaps in knowledge, the second and third chapters correspond to researches on how variation in external oral morphology influences tadpoles' ability to feed on substrates with different properties. In the second chapter we tested the performance of tadpoles feeding on substrates at different orientations. We found that species with similar oral morphology also have similar performances when feeding on substrates positioned at different orientations. Only species that occur at different depths in the environment varied in performance at a specific orientation (i.e. vertical). Among tadpoles that occur in the same place, but vary in terms of external

oral morphology, whereas some species have high performances feeding on substrates regardless their orientation, other species are more efficient feeding at specific orientations of substrates. We concluded that these differences in performance may determine how tadpoles select and/or share resources in the environment. In the third chapter, we studied with more details the influence of variation in external oral morphology, testing the species performance when feeding on substrates with different textures. Differences in the number of labial tooth rows and in the marginal papillae configuration affected tadpoles' grazing performance on substrates with different textures, indicating specializations of feeding behavior. In addition, we verified that tadpoles with the most common oral morphology among anuran larvae had the best performances in comparison to all the other species. This result may help explain the adaptive significance of morphological variation among anuran larvae.

Key words: Anuran larvae, ecomorphology, feeding behavior

INTRODUÇÃO GERAL

A variação morfológica entre os organismos geralmente reflete a forma como eles utilizam recursos no ambiente. Modificações nas pontas das patas de lagartos, por exemplo, permitem que eles se locomovam em diversas orientações, como verticalmente e até invertidos em 180° sob os substratos (Irschick et al. 1996). Dessa forma, a variação morfológica é usualmente associada à diferenciação de nicho entre os organismos (Begon et al. 2006). Entre girinos, porém, esse tipo de associação ainda desafia os pesquisadores, pois a diferenciação no uso de recursos nem sempre é tão evidente. Por exemplo, o formato do corpo geralmente é associado à profundidade da coluna d'água onde as espécies ocorrem. Consequentemente, girinos que possuem corpo globoso e nadadeiras baixas são comumente classificados como bentônicos, que corresponde ao grupo de animais que exploram o fundo do ambiente aquático (Altig and Johnston 1989; McDiarmid and Altig 1999). Porém, girinos da espécie *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) possuem essas características morfológicas, mas exploram não apenas o fundo como também a superfície do corpo d'água (nadando com a parte ventral do corpo voltada para cima, Rossa-feres et al., 2004).

Da mesma forma, o aparato oral de girinos possui estruturas que diferem quanto à configuração, tamanho e posição (em relação ao corpo) entre as espécies (McDiarmid and Altig 1999). Normalmente, diferenças na morfologia oral estão relacionadas com o tipo de alimento que os animais exploram (e.g. aves, Grant and Grant, 2003; mamíferos, Evans and Pineda-Munoz, 2018). Porém, entre girinos muitas vezes o tipo de alimento ingerido independe da morfologia das espécies. Consequentemente, é possível encontrar girinos com morfologias orais diferentes, mas que consomem os mesmos recursos num mesmo ambiente (Rossa-Feres et al 2004). Por causa disso, a competição entre girinos é considerada de importância secundária para alguns pesquisadores, já que o tipo de

alimento não seria um recurso limitante para as espécies competirem (Heyer 1976, Skelly and Kiesecker 2001, Schiesari et al. 2009).

Estudos experimentais, no entanto, vão de encontro a essa percepção e evidenciam a competição entre girinos (e.g. Lajmanovich, 2000) e a preferência por recursos no ambiente (e.g. Ramamonjisoa et al., 2017). Além disso, observações naturalísticas reforçam evidências de pressões ambientais sobre a morfologia de girinos encontradas em laboratório (e.g. Pfennig and Murphy, 2002; Pfennig et al., 2007).

Estudos como esses seguem uma abordagem ecomorfológica, a qual tem como principal objetivo entender quais e como os aspectos ecológicos podem estar relacionados à variação morfológica entre as espécies (Bock 1990, Peres-Neto 1999). No caso da morfologia oral de girinos, esses estudos incentivam a busca de novos fatores que possam ser mais importantes do que a dieta das larvas para explicar a diferenciação de nicho entre as espécies.

Esta tese foi elaborada com a mesma motivação: entender as implicações da variação na morfologia oral dos girinos. O primeiro capítulo traz uma revisão bibliográfica sobre a ecomorfologia de girinos e quantifica o avanço científico nessa área de conhecimento. Ele se divide em: i) um histórico sobre a ecomorfologia geral; ii) um histórico sobre a ecomorfologia de girinos com a apresentação de alguns métodos utilizados; e iii) um estudo cienciométrico para quantificar o avanço no conhecimento sobre a ecomorfologia de girinos. Os seguintes capítulos correspondem a duas pesquisas originais realizadas com girinos. Eles investigam como varia o desempenho alimentar (no caso, as taxas de crescimento) de espécies que diferem quanto à morfologia oral externa quando os girinos se alimentam em substratos com diferentes propriedades físicas. Cada capítulo aborda uma propriedade física diferente dos substratos: as orientações (ou ângulos) em que o alimento é disponibilizado aos girinos (Capítulo 2) e

as texturas das superfícies de onde eles removem o material orgânico (Capítulo 3). Essa divisão em dois capítulos foi feita pela particularidade de cada propriedade física dos substratos. As orientações implicam a capacidade dos girinos de ajustar o disco oral em diversas posições para remover o alimento e os esforços decorrentes em cada ângulo (i.e. natação ou flutuação) (Annibale et al. 2019). Já as texturas das superfícies (numa mesma orientação do substrato) requerem que os girinos lidem com diferentes forças de atrito entre o substrato e as estruturas orais para remover o alimento. Além disso, os girinos precisam ter habilidade para acessar o alimento dentro de fendas em substratos com superfícies irregulares (Gradwell 1975, Altig & Johnston 1989, McDiarmid & Altig 1999; Wassersug & Yamashita 2001). Dessa forma, cada capítulo explora novas dimensões do nicho das espécies, a amplitude de recursos que a morfologia oral dos girinos permite que eles explorem, e ainda levanta (e questiona) hipóteses acerca da função das estruturas orais.

Todos os capítulos da tese foram preparados para submissão a um periódico científico. O primeiro capítulo foi preparado para ser submetido à revista *Acta Herpetologica*, que aceita revisões bibliográficas. O segundo capítulo está publicado na revista de acesso aberto *Biology Open* (fator de impacto: 2.318). O terceiro capítulo será submetido ao periódico *PlosOne*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIG, R. & JOHNSTON, G.F. 1989. Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies, and habitats. *Herpetol. Monogr.* 3(1989):81–109.
- ANNIBALE, F.S., DE SOUSA, V.T.T., DE SOUSA, C.E., VENESKY, M.D., ROSSA-FERES, D.C., NOMURA, F. & WASSERSUG, R.J. 2019. Influence of substrate orientation on tadpoles' feeding efficiency. *Biol. Open* 8(1):bio037598.
- BEGON, M., TOWNSEND, C.R. & HARPER, J.L. 2006. *Ecology: from Individuals to Ecosystems*. 4th ed. Blackwell Publishing, Malden, USA.
- BOCK, W.J. 1990. From biologische anatomie to ecomorphology. *Netherlands J. Zool.* 40(1–2):254–277.
- EVANS, A.R. & PINEDA-MUNOZ, S. 2018. Inferring mammal dietary ecology from dental morphology. In *Methods in Paleoecology* Springer International Publishing, p.37–51.
- GRADWELL, N. 1975. The bearing of filter feeding on the water pumping mechanism of *Xenopus* tadpoles (Anura: Pipidae). *Acta Zool.* 56:119–128.
- GRANT, B.R. & GRANT, P.R. 2003. What Darwin's finches can teach us about the evolutionary origin and regulation of biodiversity. *Bioscience* 53(10):965–975.
- HEYER, W.R. 1976. Studies in larval amphibian habitat partitioning. *Smithson. Contrib. to Zool.* 2421–27.
- IRSCHICK, D.J., AUSTIN, C.C., PETREN, K., FISHER, R.N., LOSOS, J.B. & ELLERS, O. 1996. A comparative analysis of clinging ability among pad-bearing lizards. *Biol. J. Linn. Soc.* 59(1):21–35.
- LAJMANOVICH, R.C. 2000. Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia* 25(2):71–79.
- MCDIARMID, R.W. & ALTIG, R. 1999. *Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- PERES-NETO, P.R. 1999. Alguns métodos e estudos em ecomorfologia de peixes de riachos. *Oecologia Bras.* 06(01):209–236.
- PFENNIG, D.W. & MURPHY, P.J. 2002. How fluctuating competition and phenotypic plasticity mediate species divergence. *Evolution* (N. Y). 56(6):1217–1228.
- PFENNIG, D.W., RICE, A.M. & MARTIN, R.A. 2007. Field and experimental evidence for competition's role in phenotypic divergence. *Evolution* (N. Y). 61(2):257–271.
- RAMAMONJISOA, N., RAKOTONOELY, H. & NATUHARA, Y. 2017. Food preference in relation to resource toughness and protein level in a pond dwelling tadpole. *J. Herpetol.* 51(1):47–51.
- ROSSA-FERES, D.C., JIM, J. & FONSECA, M.G. 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Rev. Bras. Zool.* 21(4):745–754.
- SCHIESARI, L., WERNER, E.E. & KLING, G.W. 2009. Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: Implications for food web and experimental ecology. *Freshw. Biol.* 54(3):572–586.
- SKELLY, D.K. & KIESECKER, J.M. 2001. Venue and outcome in ecological experiments: manipulations of larval anurans. *Oikos* 94(1):198–208.
- WASSERSUG, R.J. & YAMASHITA, M. 2001. Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 131:183–195.

CAPÍTULO 1

Sobre a ecomorfologia de girinos: revisão e análise cienciométrica

Fabiane Santana Annibale e Fausto Nomura

Esse capítulo será preparado para submissão ao periódico *Acta Herpetologica*

RESUMO

Girinos apresentam uma grande diversidade morfológica entre os ambientes onde ocorrem e as possíveis relações adaptativas entre esses aspectos podem ser investigados em estudos ecomorfológicos. Nós realizamos uma revisão bibliográfica sobre a ecomorfologia de girinos para conhecer a história e as inovações desses estudos. Também quantificamos o avanço científico nessa área através de uma cienciometria, utilizando a base de dados *Web of Science* sem restrição de período, buscando apenas artigos e em todos os idiomas. Ao todo foram encontrados 272 trabalhos publicados entre 1992 e 2019. Nós observamos que as publicações aumentaram ao longo do tempo e que quase todas estão em inglês. A maioria dos estudos foi publicada por pesquisadores estadunidenses e está em revistas que, apesar de não permitirem acesso gratuito aos artigos, são bem conceituadas e de veiculação internacional. Nós concluímos que o interesse dos pesquisadores pela ecomorfologia de girinos tem aumentado e que as definições de termos e aprimoramentos dos métodos foram essenciais ao avanço dos estudos. Nós levantamos algumas lacunas no conhecimento e desafios aos países em desenvolvimento que podem guiar estudos futuros nessa área da ciência.

Palavras-chave: Larvas de anuros, morfologia ecológica, morfologia adaptativa, avaliação quantitativa do conhecimento, revisão bibliográfica.

ECOMORFOLOGIA

A morfologia dos organismos é estimada como sendo um dos mais antigos assuntos estudados em ciências biológicas (Peres-Neto 1999). As diferenças que existem entre os organismos são, inclusive, descritas há séculos para os mais diversos grupos taxonômicos (Bock 1990). Porém, estudos sobre a origem da variação nas estruturas morfológicas só tiveram início a partir das observações de Darwin, em 1859. Darwin observou que algumas espécies podem ser semelhantes em morfologia e ecologia sem que tenham o mesmo ancestral comum. Dessa forma, ele propôs que a evolução das estruturas anatômicas dos organismos deve se basear na análise de como essas estruturas interagem com o ambiente e todos os fatores intrínsecos a ele, bióticos e abióticos (Darwin 1859). Mesmo assim, os estudos que consideram a evolução das estruturas morfológicas juntamente com aspectos ecológicos dos organismos num contexto evolutivo, só avançaram por volta da década de 1940, com a síntese da teoria evolutiva moderna e os fundamentos da morfologia funcional experimental (Bock 1990).

A ecomorfologia, ou ecologia morfológica, é uma área dentro do estudo da morfologia evolutiva (Bock 1990) que analisa a possível relação entre as estruturas morfológicas e os aspectos ecológicos dos organismos na tentativa de entender a história evolutiva e adaptabilidade dessas estruturas (Bock 1990, Peres-Neto 1999, Betz 2006). Um dos eixos da ecomorfologia estuda como o ambiente pode causar mudanças na morfologia dos organismos. Isso porque a ecomorfologia tem um conceito próximo ao de plasticidade fenotípica, no sentido que os caracteres morfológicos estão susceptíveis a mudanças causadas por diversos tipos de pressões seletivas (Vera Candioti 2007). Trata-se de uma forma de explicar os padrões morfológicos atuais dos organismos como resultado de pressões seletivas do ambiente agindo sobre o papel

biológico de um fenótipo ao longo do tempo (Szalay 2000). Aqui é importante diferenciar os termos “função” (*function*) de “papel” (*role*) da morfologia. A função da morfologia é um pré-requisito da ecomorfologia (Bock 1990). Ela se refere às propriedades físicas [e.g. quebra do alimento pelos dentes de mamíferos, (Evans & Pineda-Munoz 2018)] e químicas [e.g. rastreamento de odor pela língua de lagartos, (Cooper 1997)] provenientes das estruturas morfológicas. Enquanto o papel da morfologia se refere a como as estruturas são utilizadas pelos organismos e qual o sentido biológico desse fenótipo num contexto adaptativo (Bock 1990, Betz 2006).

Nesse sentido, aves do gênero *Geospiza*, os tentilhões de Darwin, foram importantes modelos em estudos utilizando a abordagem ecomorfológica. Os estudos ecomorfológicos com essas aves tiveram início com as observações em campo feitas por David Lack (1940, 1947 apud Bock, 1990) sobre a ecologia e o comportamento das espécies. Ele ainda analisou as características morfológicas de espécimes em museu, para entender a evolução adaptativa desse grupo de animais. Mais tarde, Robert Bowman (1961, apud Bock, 1990) contribuiu ainda mais com informações sobre a ecomorfologia dos *Geospiza* relacionando quais alimentos as aves ingeriam na natureza às características da anatomia das mandíbulas das espécies. Porém, nenhum desses estudos levou em consideração a mudança do ambiente ao longo do tempo, um fator fundamental no caso de a variação morfológica ser realmente adaptativa. Os trabalhos de Peter e Rosemary Grant, e colaboradores, no entanto, complementaram os estudos de Lack e Bowman. Os pesquisadores estudaram a morfologia do bico das aves, os recursos explorados por elas e as mudanças naturais no ambiente e, conseqüentemente a dinâmica das populações das espécies, por mais de 30 anos (Grant and Grant 2002, 2003). Com esses estudos, a evolução da morfologia do bico dos tentilhões de Darwin

foi registrada ao longo de gerações dessas aves, documentando a resposta evolutiva à seleção natural.

Essa perspectiva temporal é de fundamental importância para identificar padrões e definir as adaptações dos organismos. Sem ela, a correlação entre os fenótipos e os processos seletivos envolvidos na produção de variação morfológica não é completa, já que a forma que os organismos possuem atualmente é decorrente também da história evolutiva das espécies (Wainwright 1991, Miles & Dunham 1993, Peres-Neto 1999). Os atributos que caracterizam as espécies são, na verdade, um mosaico de caracteres conservados ao longo da história evolutiva e também de adaptações a pressões seletivas do ambiente (Miles & Dunham 1993). Nesse sentido, o desenvolvimento de ferramentas que incluem a história evolutiva das espécies, as análises filogenéticas, e a aplicação delas em estudos ecomorfológicos foram fundamentais para avançar o conhecimento sobre os padrões atuais dos organismos (Wainwright 1991, Miles & Dunham 1993, Peres-Neto 1999). Através dessas técnicas é possível identificar se uma mudança morfológica realmente teve importância no processo de diferenciação entre as espécies e, conseqüentemente, se ela se configura como uma novidade evolutiva para a linhagem (Peres-Neto 1999).

O outro eixo da ecomorfologia estuda o efeito da morfologia funcional sobre a ecologia dos organismos (Bock 1990, Wainwright 1991, Peres-Neto 1999). Isso porque, a forma dos organismos também influencia a maneira como eles interagem com o ambiente (Wainwright 1991). Dessa maneira, esses estudos investigam como a variação na morfologia molda os padrões e define a amplitude do uso de recursos que os organismos são capazes de explorar (e.g. alimento, Wainwright 1991; espaço, Betz 2002), ou seja, o nicho fundamental das espécies (Wainwright 1991, Peres-Neto 1999, Betz 2006). Geralmente esses estudos são feitos através de experimentos, nos quais a

influência da morfologia sobre determinado aspecto ecológico pode ser medida através do desempenho dos organismos na realização das atividades. O desempenho dos organismos estabelece relações causais e mecanicistas entre forma e ecologia, sendo fundamental para entender a adaptabilidade das estruturas morfológicas (Losos 1990). Isso porque, mudanças evolutivas na forma dos organismos podem causar modificações no desempenho de uma linhagem e finalmente podem levar os organismos a explorarem outras dimensões do nicho (Higham 2007).

Além de experimentos, observações naturalísticas são igualmente essenciais para entender a influência da morfologia sobre os aspectos ecológicos dos organismos. Através de observações em campo é possível conhecer o quanto de um determinado recurso é realmente utilizado pelos organismos em condições naturais, ou seja, o nicho realizado das espécies (Wainwright 1991, Peres-Neto 1999). Quando a amplitude de recursos que uma espécie consegue explorar é previamente conhecida, a não detecção do desempenho de uma determinada estrutura morfológica no ambiente pode ser um indicativo do processo de competição, por exemplo. Isso porque o organismo deixa de explorar um recurso mesmo tendo capacidade para isso (Betz 2006).

Estudos que integram experimentos e observações naturalísticas são ainda mais informativos e elucidam melhor as relações ecomorfológicas das espécies, sendo complementares. Por exemplo, através de estudos em laboratório Oliver Betz (2002) verificou que a variação nos membros locomotores de insetos do gênero *Stenus* produzem diferenças interespecíficas no desempenho de escalar a vegetação. Em campo, o autor verificou ainda que a capacidade de escalar a vegetação se reflete na seleção por tipos de ambiente (e.g. habitats com vegetação herbácea, com detritos ou áreas abertas). Com isso, foi possível ao autor fornecer uma explicação adaptativa para a variação na morfologia dessas espécies, ligando as diferenças nas estruturas

anatômicas ao desempenho em uma determinada atividade e à forma como as espécies usam o ambiente.

Dessa forma, estudos ecomorfológicos nos auxiliam a entender a biodiversidade. Entre girinos, por exemplo, a ecomorfologia é a principal forma de entender a diversidade morfológica entre as espécies. Isso porque registros fósseis desses animais são escassos, o que dificulta a comparação da morfologia com as espécies atuais (McDiarmid & Altig 1999, Chipman & Tchernov 2002, Roelants et al. 2011). Logo, estudos que conseguem encontrar padrões entre a morfologia e os aspectos ecológicos de girinos (e.g. morfologia oral e tamanho de itens alimentares da dieta, Vera Candioti 2007) são essenciais para elucidar a evolução das diferentes estruturas morfológicas entre as espécies. Além disso, estudos moleculares mais recentes têm fornecido árvores filogenéticas muito semelhantes, que possibilitam, consequentemente, analisar os padrões da variação morfológica entre as espécies atuais. Finalmente, em girinos, a plasticidade fenotípica é bem conhecida em resposta a alguns fatores ambientais (e.g. predadores, Van Buskirk & McCollum 2000), o que torna mais plausível entender a variação morfológica como uma resposta às pressões seletivas do ambiente.

ECOMORFOLOGIA DE GIRINOS

Importância das larvas em estudos sobre ecologia e evolução

Girinos são larvas aquáticas e de vida livre de um dos grupos mais diversificados entre os vertebrados, os anfíbios anuros. Existem mais de sete mil espécies de anuros conhecidas no mundo (Frost 2018, AmphibiaWeb 2019), sendo que a maioria se concentra nas regiões tropicais (IUCN 2019). No Brasil, por exemplo, existem mais de 1000 espécies de anuros conhecidas (AmphibiaWeb 2019) sendo que quase 900 delas possuem desenvolvimento indireto. No entanto, apenas 7% das larvas

das espécies brasileiras estão descritas de forma mais completa (i.e. morfologia externa: do corpo e oral; interna: oral e condrocrânio) na literatura, enquanto 38% não possuem qualquer descrição. Entre as outras espécies, 45% possuem apenas a descrição da morfologia externa. Outros 11% possuem, além da descrição da morfologia externa, ou a descrição da morfologia oral interna ou a descrição do condrocrânio — dados analisados a partir da base de dados disponível em *Brazilian Tadpoles Version 3.0* (ver Provete et al. 2012). Essas descrições, porém, normalmente não compreendem todo o período larval, sendo feitas para apenas alguns estágios do desenvolvimento dos girinos (geralmente entre os estágios 25 e 40). Esses estágios correspondem ao período no qual os girinos crescem e desenvolvem os membros posteriores, sem modificações das outras partes do corpo, atingindo um clímax de desenvolvimento (McDiarmid & Altig 1999, Grosjean 2005). Informações ecológicas e comportamentais dos girinos estão restritas a um número ainda menor de espécies. Esse contraste vai de encontro à importância desses animais em nos ajudar a entender melhor teorias ecológicas e evolutivas sobre os vertebrados. Isso porque, girinos possuem distribuição limitada, principalmente em ambientes lênticos, e estão sujeitos às pressões do ambiente onde ocorrem (Andrade et al. 2007). Além disso, girinos de diversas espécies são abundantes no habitat e ainda se adequam a condições experimentais em laboratório sem grandes dificuldades, tornando-os ótimos sistemas-modelo (Wilbur 1997, Rossa-Feres et al. 2011).

Girinos são também interessantes de serem estudados por questões que vão além da fase larval. Isso porque os processos que agem sobre as larvas e os adultos são, ao mesmo tempo, independentes e interligados. O que acontece com os organismos durante a fase larval independe dos adultos (Sherratt et al. 2017) e possui consequências não apenas para os indivíduos, como também sobre as populações e comunidades aquáticas (e.g. níveis tróficos). Da mesma forma, as pressões sobre os adultos são diferentes, já

que o ambiente e os contextos sociais também mudam. Porém, a presença dos girinos num determinado ambiente depende da escolha dos adultos. Assim como o sucesso nos estágios pós-metamórficos depende da capacidade dos girinos em sobreviver e se desenvolver no ambiente aquático (Newman 1998, Cabrera-Guzmán et al. 2013). Essa ligação entre duas fases tão independentes torna os girinos ainda mais interessantes de serem estudados, pois para entender a evolução de anfíbios anuros não se pode negligenciar o período larval (Lataste 1879). Além disso, girinos podem ajudar na identificação de espécies que quando adultas, são de difícil distinção entre gêneros e espécies (Channing 1999).

Morfologia de girinos e o ambiente

Existe uma variedade de habitats onde os girinos podem ser encontrados, como ambientes lânticos e lóticos, bromélias, rochas (por onde escorre apenas uma lâmina de água) e até dentro de folhas mortas caídas de árvores que acumulam água (McDiarmid & Altig 1999, Andreone et al. 2010). Consequentemente, assim como os adultos, girinos apresentam uma grande diversidade morfológica entre os ambientes onde ocorrem, principalmente das estruturas externas do corpo e das que compõe o aparato oral (McDiarmid & Altig 1999). Por exemplo, girinos de diferentes espécies diferem, entre outras características, quanto à posição dos olhos (e.g. laterais ou dorsais), formato do corpo (e.g. deprimido ou comprimido; oval ou circular), configuração da cauda (e.g. nadadeiras altas ou baixas; presença ou ausência de flagelo) e estruturas externas do aparato oral (e.g. numerosas fileiras de denticulos à ausência dessas estruturas). Essa variação morfológica reflete em parte as características conservadas dos ancestrais [e.g. configuração da musculatura associada ao esqueleto hiobranquial, (Vera Candioti 2007)], mas também é geralmente atribuída às pressões seletivas agindo sobre os caracteres que são mais susceptíveis a mudanças ambientais. As pressões do ambiente

incluem as características químicas e físicas da água (e.g. pH, Devi et al. 2016), a presença de predadores e competidores (e.g. Arribas et al. 2018), o hidroperíodo e a disponibilidade de alimento associada a ele [principalmente para espécies em ambientes temporários e imprevisíveis, (Wilbur 1987)] e a temperatura (e.g. de Sousa et al. 2015, Ruthsatz et al. 2018), por exemplo. Esses fatores, além de terem efeito direto e indireto sobre o comportamento, a fisiologia e a ecologia dos girinos, também agem sobre a morfologia das larvas (Devi et al. 2016).

Essa diversidade morfológica aliada à diversidade de ambientes onde os girinos ocorrem e às condições as quais estão sujeitos nesses ambientes, são o foco dos estudos ecomorfológicos com girinos, que buscam entender quais são os processos mais importantes que moldam a morfologia das espécies da forma como a conhecemos atualmente.

Histórico da ecomorfologia de girinos

Os primeiros estudos que incluíram as larvas de anuros foram feitos no século XVIII, com a descrição de todo o desenvolvimento, desde o ovo até o adulto, de espécies europeias por August von Rosenhof (1758). Porém, os caracteres larvários ganharam importância taxonômica apenas um século mais tarde, com o trabalho de Fernand Lataste (1879). Além da descrição dos adultos, o autor incluiu a caracterização das larvas (e.g. características do espiráculo, das narinas, formato do corpo) na classificação das espécies.

Quase um século mais tarde, Pollister e Moore (1937) notaram a necessidade de uma padronização dos estágios de desenvolvimento das larvas para que os caracteres morfológicos pudessem ser comparados entre espécies. Até então, a classificação dos estágios de girinos era baseada em uma tabela desenvolvida para uma espécie de salamandra (Pollister & Moore 1937). Essa padronização é importante, pois durante o

período larval ocorrem diversas mudanças morfológicas (e.g. surgimento e posterior substituição das estruturas orais, desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores) que precisam ser consideradas nas comparações interespecíficas (McDiarmid & Altig 1999). Desde o trabalho desses autores, outras tabelas foram sugeridas para descrever o desenvolvimento dos girinos (e.g. Shumway 1940, Taylor & Kollros 1946, Limbaugh & Volpe 1957). Entretanto, a tabela proposta posteriormente por Gosner (1960) é até hoje a mais utilizada. A tabela sugerida por ele excluiu detalhes que variavam em tabelas anteriores e particularidades das espécies para as quais as tabelas haviam sido criadas. Isso resultou em uma tabela mais simples, permitindo que seu objetivo mais importante fosse cumprido: a comparação de caracteres larvais entre espécies.

Desde os primeiros trabalhos que incluíram os girinos em classificações taxonômicas, diversas espécies foram descritas. Entretanto, os estudos comparativos entre as larvas de diferentes espécies de anuros ganharam força apenas no século XX, com os trabalhos de Gladwyn Noble (1926; 1927). Além das diferenças na morfologia externa do corpo, o autor utilizou as estruturas orais externas de girinos para diferenciar as espécies. Ele também foi pioneiro em estudos ecomorfológicos, discutindo em seu trabalho a relação entre a diversidade morfológica com os diferentes ambientes aquáticos onde as larvas ocorriam. Posteriormente, Grace Orton (1953) classificou formalmente alguns tipos ecomorfológicos de girinos com base na morfologia e em aspectos ecológicos das larvas, como habitat e alimentação. Neles estão incluídos girinos: carnívoros, arbóreos, nectônicos, neustônicos, de ambientes lóticos e de desenvolvimento direto. Essas definições são usadas até hoje para classificar os tipos ecomorfológicos de girinos (Altig & Johnston 1989, McDiarmid & Altig 1999).

Orton (1953) ainda discutiu a possível inclusão das características morfológicas dos girinos para entender as relações filogenéticas entre as espécies, pois alguns desses caracteres seriam bem conservados ao longo do processo evolutivo a despeito de modificações adaptativas, produzidas em resposta a pressões ambientais. Ela sugeriu a classificação dos girinos em quatro tipos filogenéticos de larvas com base no número e na posição do espiráculo, na anatomia das câmaras branquiais e, assim como Noble (1926; 1927), nas estruturas orais externas. Posteriormente, Priscilla Starrett (1973) e Otto Sokol (1975) se basearam nos estudos de Orton (1953) para propor uma sequência evolutiva das espécies, considerando os mesmos caracteres morfológicos dos girinos para classificá-los em mais basais ou derivados. Atualmente as reconstruções filogenéticas contam com um número bem maior de caracteres para propor a relação evolutiva entre as espécies. Essas novas filogenias foram possibilitadas, a partir da década de 70, pelo desenvolvimento de tecnologias e softwares de computador, bem como de técnicas bioquímicas mais simples que permitiram o uso de sequências de proteínas, cromossomos e DNA para a diferenciação entre *taxa* (e.g. Pyron and Wiens, 2011; Roelants et al., 2011) (Channing 1999).

Todos esses trabalhos, mesmo os mais antigos e já defasados atualmente, foram essenciais para enfatizar a importância dos estudos comparativos da morfologia na compreensão de padrões evolutivos de girinos. Além disso, eles deram força às pesquisas que levavam em consideração os aspectos ecológicos das espécies para explicar as variações na morfologia. Por exemplo, D. Eduard Van Dijk (1972) trabalhou com girinos africanos e relacionou o tipo de ambiente onde os girinos ocorrem (e.g. lântico ou lótico), a escolha de micro-habitats (e.g. fossoriais, bentônicos ou arbóreos) e o comportamento alimentar (e.g. raspadores ou filtradores) às variações morfológicas entre as espécies. Estudos assim contribuíram para que uma classificação mais

generalizada fosse proposta por Ronald Altig e Gail Johnston (1989), considerando o conhecimento de cerca de mil larvas até então descritas na literatura. Os autores propuseram uma classificação das espécies em 24 guildas ecomorfológicas que levava em conta outros parâmetros da biologia e ecologia das espécies, como o padrão de desenvolvimento das larvas (endotrófico ou exotrófico), além de sugerir a possível relação entre a função das estruturas anatômicas a nichos tróficos, ao ambiente onde as espécies ocorrem e o tipo de micro-habitat que exploram. Anos depois, Roy McDiarmid e Altig (1999) fizeram a caracterização de famílias e gêneros de girinos de ainda mais espécies baseando-se na classificação de Altig e Johnston (1989). Os autores também propuseram terminologias padronizadas para diminuir as dificuldades de identificar espécies e entender a diversidade morfológica entre elas (McDiarmid & Altig 1999).

Medindo a variação morfológica – estudos descritivos

McDiarmid e Altig (1999) ainda sugeriram comparar quantitativamente a variação morfológica entre as espécies através de medidas padronizadas da morfologia externa de girinos, além da utilização de definições mais precisas para descrever a forma dos girinos (e.g. focinho oval; corpo redondo). Essas propostas foram amplamente aceitas e aplicadas em estudos de diferentes áreas de conhecimento; por exemplo, os diversos trabalhos ligados ao Projeto SISBIOTA – Girinos do Brasil, que teve como objetivo fundamentar estudos em sistemática de anuros brasileiros e produzir avanços no conhecimento da diversidade e ecologia de girinos de diversos biomas do país (e.g. ecologia, Marques & Nomura 2015, Queiroz et al. 2015, Costa & Nomura 2016, Jordani et al. 2017, Gonçalves et al. 2017, Ouchi de Melo et al. 2017; ecomorfologia, Pezzuti et al. 2016; taxonomia, Santos et al., 2018).

Esse estudo quantitativo da forma dos organismos é conhecido como morfometria e tem como objetivo inferir as possíveis causas da variação morfológica

(Bookstein 1990). Existem duas formas que são atualmente empregadas: a morfometria tradicional e a morfometria geométrica. A forma de medir as estruturas morfológicas dos organismos, como foi sugerida por McDiarmid e Altig (1999), e também utilizada em outros grupos de animais (e.g. peixes, Teixeira & Bennemann 2007), é conhecida como morfometria tradicional. Ela consiste em medidas lineares de comprimento, altura, largura, além de ângulos e proporções das estruturas anatômicas dos organismos (Rohlf & Marcus 1993). Essas medidas são feitas a partir de pontos que representam a distância máxima entre as extremidades de uma estrutura anatômica; por exemplo, o tamanho do corpo do girino corresponde à distância entre a ponta do focinho à junção da parede do corpo com o eixo dos miótomos da cauda (McDiarmid & Altig 1999). Já a morfometria geométrica consiste na marcação de pontos de referência (ou coordenadas cartesianas) que podem ter duas ou três dimensões. Os pontos devem ser comparáveis entre os indivíduos ou espécies; juntos, esses pontos conservam a informação geométrica dos organismos e descrevem sua forma, excluindo efeitos de tamanho, posição ou rotação (Bookstein 1990, Zelditch et al. 2004).

Ambos os métodos possibilitam a detecção de relações entre a morfologia e os aspectos ecológicos dos organismos em análises que correlacionam essas variáveis (e.g. altura das nadadeiras e a profundidade explorada da coluna d'água, Pezzuti 2011, Queiroz et al. 2015). Porém, no caso da morfometria tradicional algumas medidas podem ter um alto grau de sobreposição em termos de direção e dimensão e, dessa forma, tornam-se redundantes, criando, consequentemente, um viés nos resultados da análise dos dados (e.g. inflação dos dados que explicam sinal filogenético, Marques & Nomura 2015). Além disso, ela é também mais abstrata e pouco informativa sobre a estrutura geométrica, de forma que dificulta a visualização da forma dos organismos (Zelditch et al. 2004). A morfometria geométrica, por outro lado, é mais robusta

estatisticamente e ainda permite identificar a localização, a forma e a magnitude das mudanças entre os organismos (Rohlf & Marcus 1993). Por isso, em diversos estudos mais atuais a morfometria tradicional é acompanhada ou substituída pela morfometria geométrica para quantificar a variação das estruturas anatômicas entre os organismos (e.g. Vera Candioti 2007, Venesky et al. 2013, Marques & Nomura 2015).

Além disso, a morfometria tradicional limita-se à medição das estruturas do corpo dos organismos, enquanto as diferenças no aparato oral não são incluídas. Com o auxílio da morfometria geométrica, as estruturas que compõem o aparato oral, tanto externas como internas, puderam ser incluídas nas análises quantitativas da variação morfológica entre os organismos e, consequentemente, em estudos ecomorfológicos. Por exemplo, Vera Candioti (2007) fez uso desse método para caracterizar a anatomia interna de girinos de diversas espécies e posteriormente investigar a possível relação entre morfologia e hábito alimentar (conteúdo intestinal) dos animais. Apesar de algumas estruturas serem relativamente mantidas dentro de gêneros, a autora observou que outras refletem o fenômeno de convergência e, no caso de algumas espécies, a variação morfológica é fortemente relacionada ao hábito alimentar. Dessa forma, ela sugeriu que a morfologia interna adiciona informações e refina as classificações ecomorfológicas propostas por Altig e Johnston (1989) e por McDiarmid e Altig (1999).

A quantificação da variação na morfologia é também uma ferramenta importante em estudos sobre a história evolutiva dos caracteres morfológicos. Através de técnicas que incluem a filogenia das espécies (e.g. modelagem filogenética), é possível estimar simultaneamente a influência da ancestralidade sobre os atributos e a taxa de diferenciação em direção a um ótimo adaptativo (Harvey & Pagel 1991, Butler & King 2004, Hansen et al. 2008). Assim, é possível entender como são produzidos os padrões no uso de recursos e na distribuição das espécies. Por exemplo, Van Buskirk (2009)

estudou girinos de espécies distribuídas ao longo de um gradiente ambiental e verificou que as características morfológicas das espécies são tanto influenciadas pela ancestralidade como também evoluíram como adaptações às mudanças ambientais. Nos trabalhos de Eterovick e Fernandes (2001) e de Marques e Nomura (2015) os autores encontraram padrões semelhantes estudando o uso de micro-habitats por girinos.

Mais recentemente, as técnicas de quantificação da diversidade morfológica vêm sendo também empregadas em um tipo de abordagem que integra larvas e adultos no estudo da história evolutiva de atributos morfológicos. Isso porque é reconhecido que a ontogenia tem um papel importante na produção de variação fenotípica (Alberch et al. 1979, Katz & Hale 2016). Com isso, esse tipo de estudo permite quantificar a influência de uma fase do ciclo de vida sobre a outra, ou seja, se os produtos dos processos pelos quais os organismos passam em uma das fases (larval ou reprodutiva) são mantidos nos outros estágios ou se as características evoluem independentemente em cada fase. Por exemplo, Sherratt e colaboradores (2017) encontraram padrões evolutivos distintos na história evolutiva da forma do corpo entre girinos e adultos de espécies de anuros australianos. Enquanto as larvas apresentam características que indicam convergência adaptativa e homoplasia substancial, os adultos apresentam forte influência da ancestralidade e divergência entre os principais clados. Sendo assim, os atributos de organismos com ciclo de vida complexos, como os anuros, podem evoluir independentemente em cada fase (larval e adulta). Além disso, a variação morfológica em uma das fases não necessariamente é indicativa de diferenciação na outra (Sherratt et al. 2017).

Estudos experimentais

Além de estudos descritivos, experimentos controlados em laboratório e no ambiente natural (i.e. mesocosmos) são igualmente importantes para investigar a

biologia dos girinos. No final da década 60 o uso da abordagem experimental contribuiu de forma inovadora e crucial para avançar o conhecimento sobre as larvas. De início, esses estudos tiveram ênfase em entender os aspectos funcionais da morfologia de girinos, que são um requisito para estudos ecomorfológicos. Julian Kenny (1969) e Richard Wassersug (1972), por exemplo, conduziram experimentos para entender a função da morfologia oral interna de girinos. Além da descrição de como essas estruturas atuam no processo de filtração de partículas suspensas na água, os autores compararam os padrões morfológicos entre espécies. Wassersug (1972) sugeriu que a variação nessas estruturas poderiam ser respostas adaptativas aos recursos explorados nos micro-habitats onde elas são encontradas — e.g. girinos sem estruturas queratinizadas no disco oral geralmente ocorrem no meio da coluna d'água, onde são mais eficientes em filtrar partículas de pequenas dimensões (Wassersug 1972). Essa relação entre a morfologia oral interna e parâmetros da dieta dos girinos também foi encontrada posteriormente para algumas espécies no estudo de Vera Candiotti (2007).

Wassersug e Masamichi Yamashita (2001) complementaram os estudos relacionados à morfologia oral investigando a função das estruturas orais externas na alimentação de girinos. Os autores confirmaram as sugestões feitas por Johnston (1982; 1990, apud Wassersug & Yamashita 2001) de que os dentes labiais são utilizados para ancorar o disco oral ao substrato enquanto as mandíbulas raspam a superfície para remover alimento. Eles ainda observaram que algumas propriedades físicas dos substratos, como a textura da superfície, influenciam o mecanismo de alimentação — e.g. as fileiras de denticulos deixam de raspar paralelamente o substrato, e cada lado se move mais independentemente. Posteriormente, Matthew Venesky e colaboradores (2011) observaram que a forma como os girinos removem alimento dos substratos pode diferir mesmo entre espécies com morfologia oral externa semelhante, ou ainda pode ser

semelhante entre espécies encontradas nos mesmos micro-habitats (Venesky et al. 2013). Mais tarde, Verônica de Sousa e colaboradores (2014) verificaram que fatores ambientais, como a temperatura, também podem influenciar o mecanismo de alimentação dos girinos.

Em outra linha de pesquisa, Henry Wilbur (1972; 1987) estudou a importância da predação e da competição na estrutura de comunidades de girinos que habitam ambientes lênticos. O autor mostrou que apesar de necessário, estudos teóricos, como o modelo de Lotka-Volterra sobre competição (Volterra 1928, Lotka 1932), podem ser inadequados para interpretar padrões em comunidades naturais. Isso porque a complexidade na estrutura de comunidades de girinos varia de acordo com mudanças na rede trófica, na previsibilidade do ambiente e da plasticidade das espécies, produzindo diferentes resultados que não necessariamente se enquadram em modelos teóricos. Anos mais tarde, outros autores também estudaram os efeitos de predadores sobre girinos, porém com ênfase nas mudanças na morfologia dos anuros. Eles também demonstraram a importância de estudos empíricos para corroborar ou refutar inferências ecomorfológicas. Por exemplo, antigas hipóteses sugeriam que quanto mais fina a cauda dos girinos, maior poderia ser sua velocidade de escape de predadores. Entretanto, Josh Van Buskirk e colaboradores (2000; 2003) demonstraram o oposto, e sugeriram que esse tipo de morfologia poderia estar associado ao escape de predadores por outros motivos (e.g. capacidade de fazer manobras, Wassersug 1989), mas não à velocidade de natação.

Embora estudos experimentais não representem fielmente a realidade dos organismos no ambiente natural, eles são fundamentais para a compreensão de processos e mecanismos que, de outra forma, permaneceriam baseados em inferências, justamente pela impossibilidade de controlar os fatores que podem influenciar os organismos. Por exemplo, o uso diferencial do espaço dentro do ambiente aquático é

considerado como uma estratégia vital para o crescimento e a sobrevivência dos organismos (McDiarmid & Altig 1999). Geralmente, a distribuição espacial dos girinos dentro do habitat é inferida com base na caracterização e mensuração da morfologia externa do corpo das larvas. Entretanto, diversos fatores podem alterar o comportamento dos girinos, levando-os a explorar outras áreas do ambiente aquático. Glos e colaboradores (2017), por exemplo, observaram mudanças no uso de micro-habitats (e.g. profundidade da coluna d'água, distância em relação à margem) e no nicho trófico dos girinos (e.g. tipo de alimento consumido) ao longo do desenvolvimento ontogenético. Isso significa que o uso de recursos, como micro-habitats, pode ser mais complexo do que as inferências indicam.

Da mesma forma, nem sempre é possível encontrar padrões entre a morfologia oral dos girinos e a ecologia alimentar das espécies por métodos associativos (e.g. Vera Candioti 2007). Isso porque, girinos de várias espécies conseguem alternar o hábito alimentar dependendo da qualidade e da quantidade de recursos disponíveis no ambiente onde eles ocorrem (Petranka & Kennedy 1999, Richter-Boix et al. 2007). Além disso, condições mais extremas, como a competição por recursos entre espécies (Altig 2006a) podem levar os girinos a alternar o comportamento alimentar. Nesse contexto, de Sousa e colaboradores (2014) estudaram a cinemática da alimentação de girinos de uma espécie que possui hábitos alternativos de alimentação: carnívoro, filtrador e raspador de substratos. Os autores verificaram que tanto a cinemática quanto a forma das estruturas orais podem ser modificadas dependendo do hábito alimentar dos girinos (filtrador versus raspador). Consequentemente, uma espécie caracteristicamente carnívora (e.g. mandíbulas proeminentes, Rossa-Feres & Nomura 2006) pode ajustar o mecanismo de alimentação a diferentes tipos de alimentos e substratos, ampliando a

gama de recursos que ela pode explorar. Isso reforça a importância dos estudos experimentais sobre a ecomorfologia das espécies.

Acompanhando o desenvolvimento da ecomorfologia de girinos

Todas as padronizações de termos e refinamentos nos métodos de análise da diversidade morfológica aplicados em trabalhos descritivos e experimentais vêm contribuindo e modificando a ecomorfologia de girinos ao longo do tempo. Por esse motivo, torna-se interessante entender como o conhecimento nessa área avançou para também identificar lacunas e áreas que precisam de mais esforços. Nesse sentido, existem técnicas de avaliação quantitativas do progresso no conhecimento: bibliometria, informetria, webometria e cienciometria (Vanti 2002). Neste estudo nós utilizamos a ferramenta da cienciometria para avaliar o avanço científico sobre a ecomorfologia de girinos. Através da cienciometria é possível quantificar o desenvolvimento científico, conhecer a amplitude e a natureza dos estudos, medir o fluxo da informação, e identificar possíveis paradigmas (Vanti 2002, Lima-Ribeiro et al. 2007) e lacunas do conhecimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Levantamento de dados

O levantamento dos dados foi feito através da base de dados *Web of Science Core Collection*, mantida atualmente pela empresa *Clarivate Analytics*, (<http://apps.webofknowledge.com>). Nós também fizemos buscas utilizando a base de dados SCOPUS, mantida pela editora *Elsevier* (www.scopus.com). Ambas as bases possuem um rigoroso critério de avaliação para indexação das pesquisas e abrangem um

grande número de publicações. Entretanto, em vários casos nós encontramos divergências quanto ao número de citações de um mesmo trabalho entre as bases de dados. Por isso, nós resolvemos utilizar apenas uma delas, no caso a *Web of Science*.

Nós tentamos abranger o máximo de trabalhos relacionados com a ecomorfologia de girinos. Para isso, buscamos trabalhos que necessariamente possuísem o termo “girino” juntamente a “ecomorfologia” ou “morfologia adaptativa”. Fizemos ainda outras buscas que, além do termo “girinos”, possuísem também o termo “morfologia” junto a: “ecologia”, “micro-habitat”, “preferência” ou “plasticidade fenotípica”. Variações na terminologia dessas palavras também foram consideradas (Material Suplementar). As palavras foram pesquisadas em todos os idiomas disponíveis. Não foi utilizada restrição temporal para as pesquisas, pois a ecomorfologia de girinos é uma área relativamente nova na ciência. Além disso, a busca foi feita somente entre artigos científicos, que é a forma de divulgação de pesquisas originais.

Entre opções de resultados da busca, nós selecionamos as informações sobre: o ano da publicação, o número de citações do artigo, as revistas onde os trabalhos foram publicados, o idioma do estudo, o país de filiação do primeiro autor e o tipo de acesso ao trabalho (i.e. aberto ou restrito). Os resultados dessas buscas foram unidos e filtrados para evitar que trabalhos eventualmente encontrados na busca, mas não relacionados à ecomorfologia de girinos fossem analisados erroneamente. Primeiro, retiramos os trabalhos duplicados, (i.e. encontrados em mais de um tipo de busca). Posteriormente, eliminamos as publicações feitas com outros animais (e.g. artrópodes: “*tadpole shrimp*”) e com outros objetivos (fisiologia, comportamento e estrutura de comunidades). Nós também eliminamos estudos com conteúdo puramente descritivo das espécies, sem análises comparativas da morfologia ou que relacionassem a morfologia dos girinos a aspectos ecológicos.

Análise de dados

Nós utilizamos modelos lineares gerais para testar se ao longo do tempo há variação (1) no número de trabalhos publicados e (2) no número de citações. Testamos também (3) a relação entre o número de trabalhos publicados e o número de citações e se (4) o número de citações varia entre os tipos de acesso ao trabalho. O tipo de acesso ao trabalho foi considerado restrito quando a acessibilidade ao conteúdo do trabalho só é permitida mediante ao pagamento de taxas ou assinatura do periódico. O tipo de acesso foi considerado como aberto quando o trabalho foi publicado em periódicos que disponibilizam o acesso gratuito e *online* ao trabalho (*Gold Open Access*). Também foram incluídos nessa categoria trabalhos arquivados pelo próprio autor em repositórios que permitem o acesso aberto (*Green Open Access*). Nós ainda analisamos (5) a tendência esperada do número de citações ao longo do tempo (analisando os resíduos da regressão entre número de citações e o tempo).

Utilizando os dados de filiação dos autores, nós analisamos (6) autores de quais países possuem mais trabalhos publicados e (7) quais possuem mais citações. Também analisamos (8) quais revistas possuem o maior número de trabalhos publicados e (9) de citações. Finalmente, analisamos (10) quais os idiomas em que os trabalhos foram publicados. Nós utilizamos o software R (versão 1.0.143) para realizar todas as análises (R Core Team 2017).

RESULTADOS

Nós obtivemos 272 artigos científicos publicados no período entre 1992 e 2019. Até 1999 as publicações eram esporádicas, variando de um a três trabalhos publicados por ano. A partir do ano 2000, entretanto, esse número no mínimo dobrou (e.g. 6

estudos em 2003), chegando a 20 artigos por ano em 2011 e 2016 (Fig. 1). Dessa forma, nós observamos um aumento no número de artigos ao longo do tempo ($R^2 = 0,42$; $P < 0,001$).

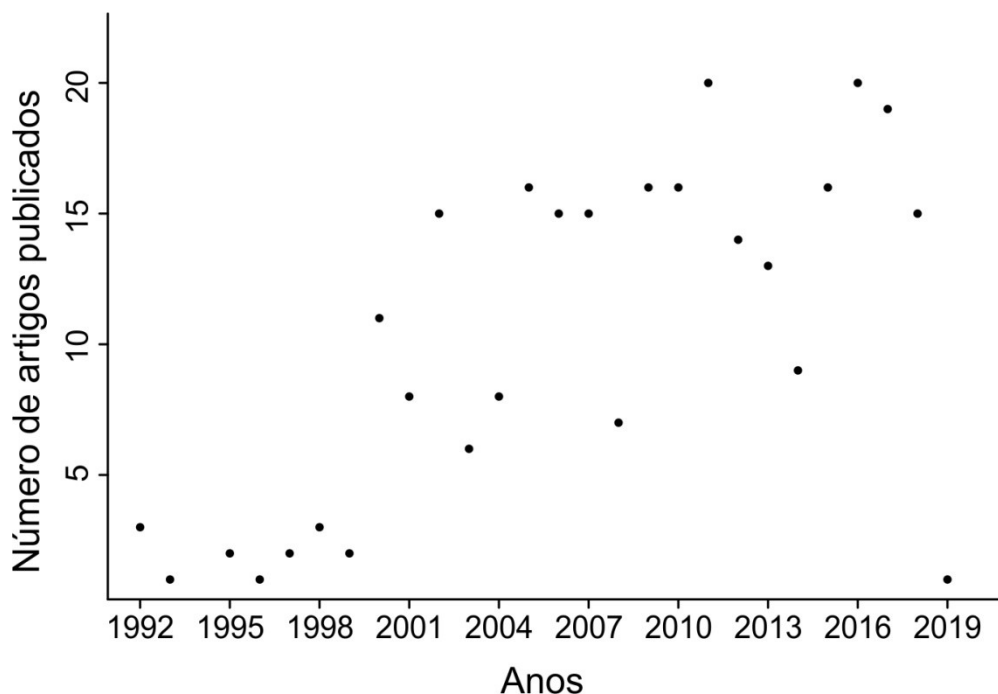


Figura 1. Número de artigos científicos publicados ao longo do tempo sobre o tópico ecomorfologia de girinos. Houve um aumento significativo no número de publicações a partir do ano 2000 ($R^2 = 0,42$; $P < 0,001$).

Artigos publicados em revistas com acesso restrito foram mais numerosos (73% das publicações) e também mais citados que os estudos publicados em revistas de acesso aberto (teste $t = -3,22$; $df = 214,7$; $P = 0,001$, Fig. 2). No geral, os artigos mais citados (acima de 100 citações) correspondem à minoria dos trabalhos encontrados (10%). A maioria (54%) possui entre 07 e 95 citações, enquanto outros 36% dos artigos possui até 06 citações ($R^2 = 0,13$; $P < 0,001$; Fig. 3). Desses últimos, 37 trabalhos nunca foram citados, porém a maioria deles (25 artigos) foi publicada mais recentemente (a partir de 2017), representando um menor tempo de disponibilidade ao público em comparação aos outros trabalhos. De fato, os trabalhos com maior número de citações foram publicados há mais tempo, entre 1995 e 2009 ($R^2 = 0,35$; $P < 0,001$; Fig. 4).

Entretanto, nós observamos uma tendência de aumento (resíduos crescentes e positivos) do número de publicações em direção aos anos mais recentes (Fig. 5).

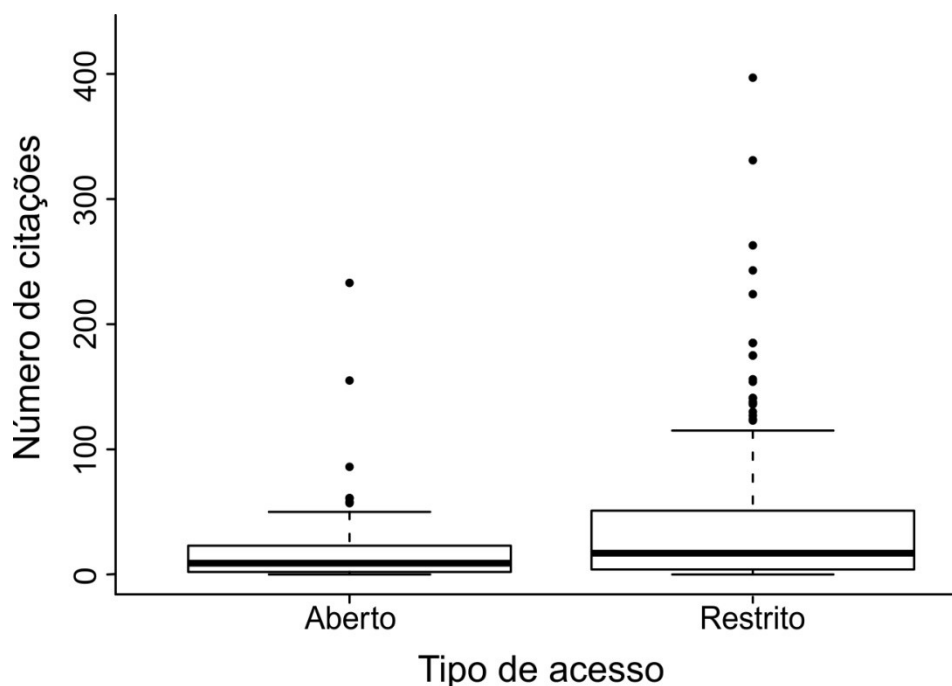


Figura 2. Número de citações dos trabalhos entre os tipos de acesso das revistas. Trabalhos publicados em revistas de acesso restrito foram mais citados (teste $t = -3.22$; $df = 214.7$; $P = 0.001$).

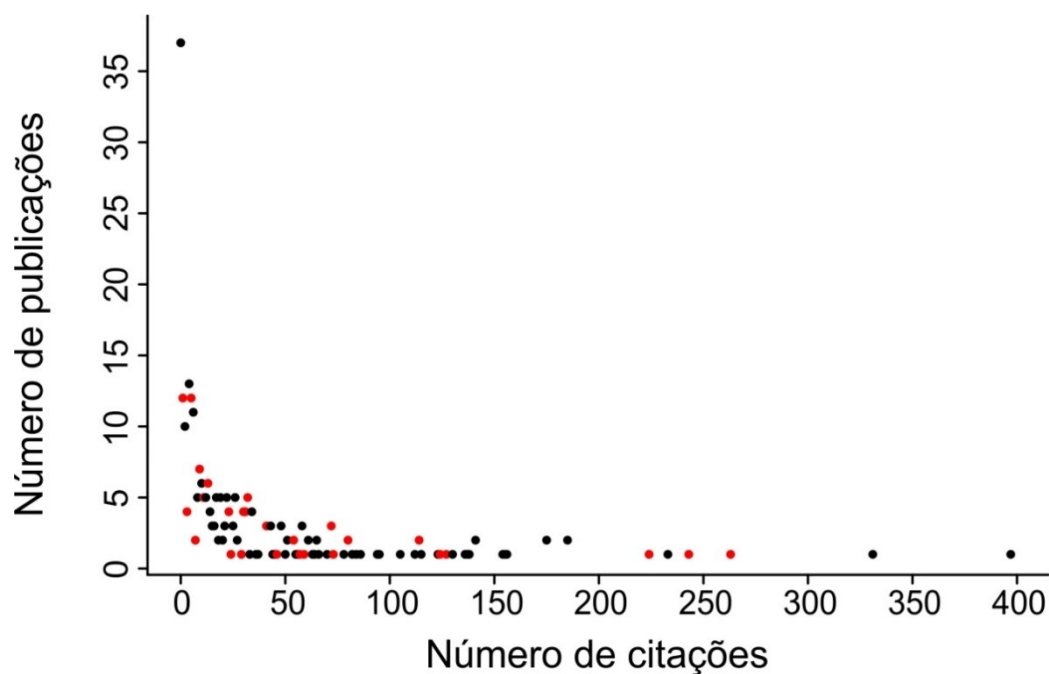


Figura 3. Número de vezes que cada trabalho foi citado em relação ao número de trabalhos publicados. A maioria das publicações possui menos de 70 citações e a minoria (10%) possui mais de 100 citações ($R^2 = 0,13$; $P < 0,001$; Fig. 3). O tipo de acesso do periódico onde o trabalho foi publicado está diferenciado por cores: vermelho para acesso aberto, preto para acesso restrito.

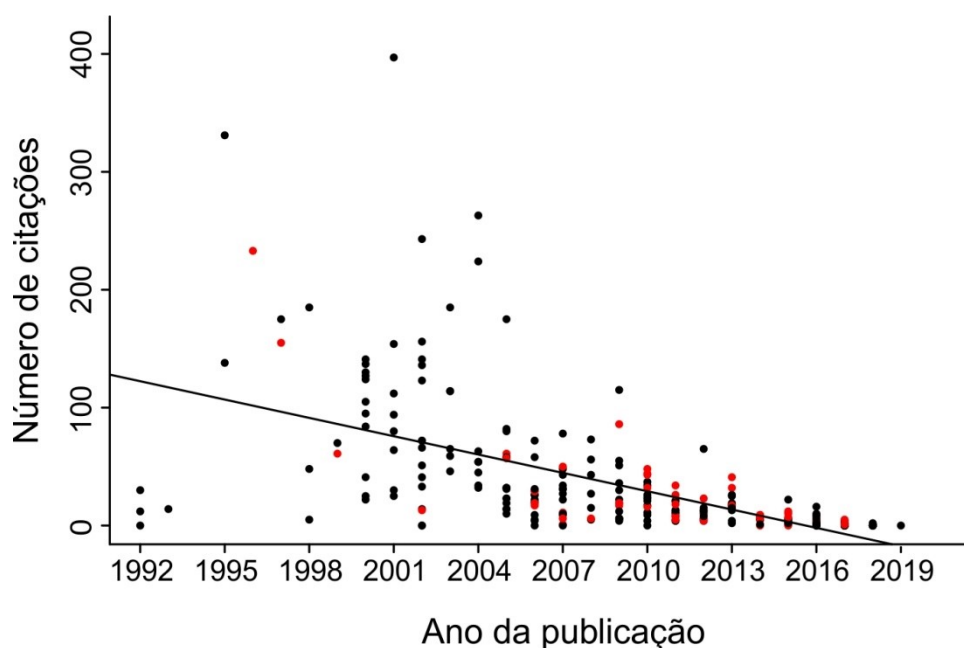


Figura 4. Número de citações que cada trabalho recebeu ao longo do tempo. Os trabalhos mais citados foram publicados há mais tempo, entre 1995 e 2009 ($R^2 = 0,35$; $P < 0,001$; Fig. 4). O tipo de acesso do periódico onde o trabalho foi publicado está diferenciado por cores: vermelho para acesso aberto, preto para acesso restrito.

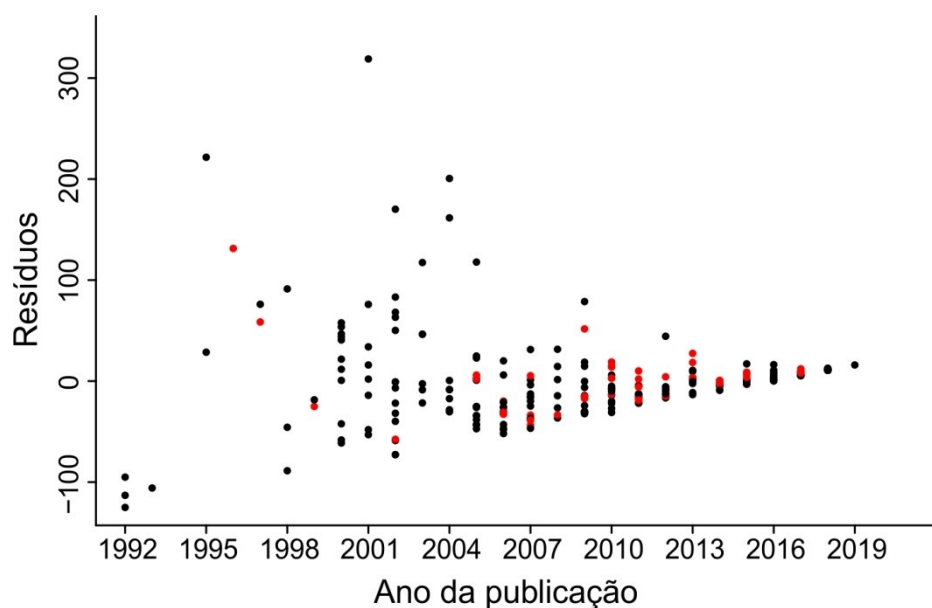


Figura 5. Tendência esperada do número de citações dos trabalhos ao longo tempo. Os trabalhos publicados mais recentemente tendem a ser mais citados que o esperado pela regressão entre os resíduos da regressão entre número de citações e o tempo da publicação. O tipo de acesso do periódico onde o trabalho foi publicado está diferenciado por cores: vermelho para acesso aberto, preto para acesso restrito.

A maior parte dos trabalhos foi publicada por autores estadunidenses (Fig. 6).

Autores brasileiros, argentinos, europeus, japoneses e australianos publicaram entre 14 e

17 artigos, enquanto autores de outros países publicaram menos de 10 trabalhos. Não foram encontrados trabalhos de autores de países africanos. Trabalhos publicados por estadunidenses também são os mais citados (Fig. 7). O Brasil, apesar ter ficado em segundo lugar em número de publicações de trabalhos (Fig. 6), ficou em 11º entre os mais citados (Fig. 7).

Os estudos foram publicados em 111 revistas científicas. Destas, 12 possuem mais de 05 trabalhos publicados sobre a ecomorfologia de girinos (Fig. 8), enquanto 62 possuem apenas 01 publicação sobre esse assunto. As revistas com maior número de citações foram as mesmas com maior número de publicações (Fig. 9), enquanto 12 delas ainda não foram citadas. Com exceção de dois trabalhos, um publicado em espanhol e o outro em russo, todos os outros ($n = 270$) foram publicados em inglês.

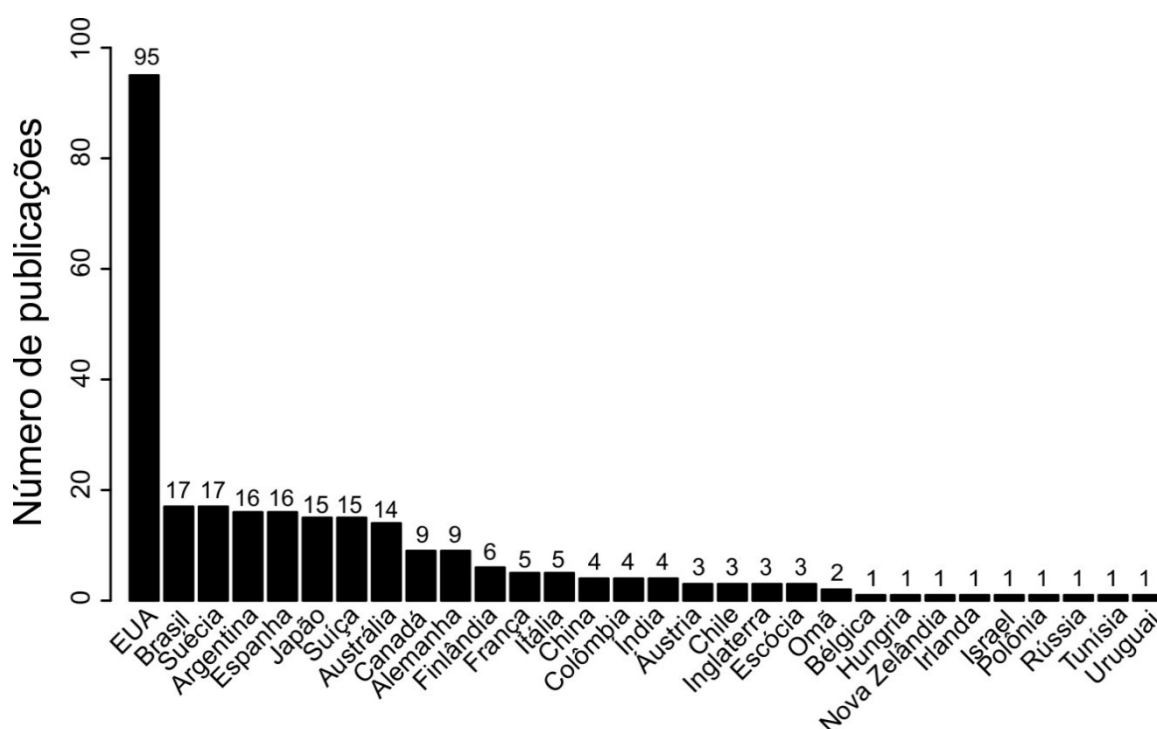


Figura 6. Quantidade de trabalhos publicados por nacionalidade do (a) primeiro (a) autor. Autores brasileiros estão entre os pesquisadores que mais publicam artigos sobre a ecomorfologia de girinos.

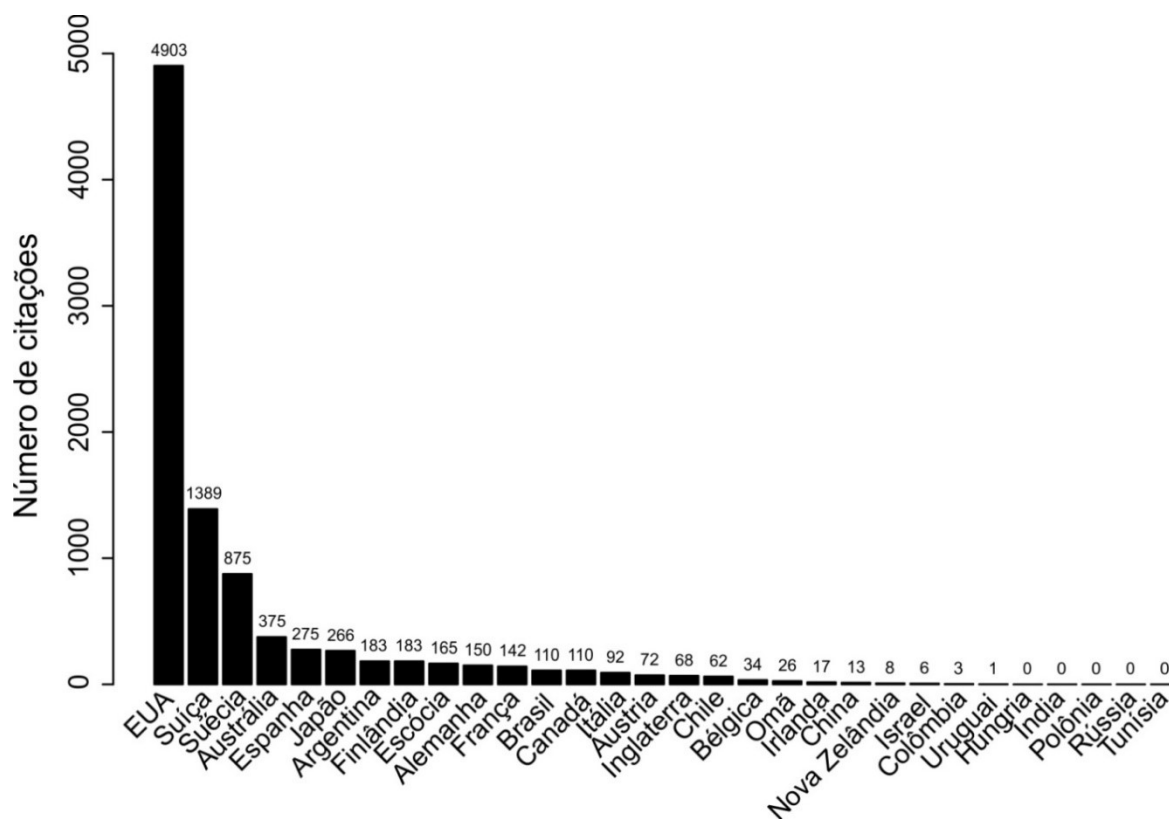


Figura 7. Número de citações em trabalhos por nacionalidade do (a) primeiro (a) autor. Os autores com trabalhos mais citados são também os que mais publicam artigos sobre a ecomorfologia de girinos. O Brasil, no entanto, é o 11º em número de citações.

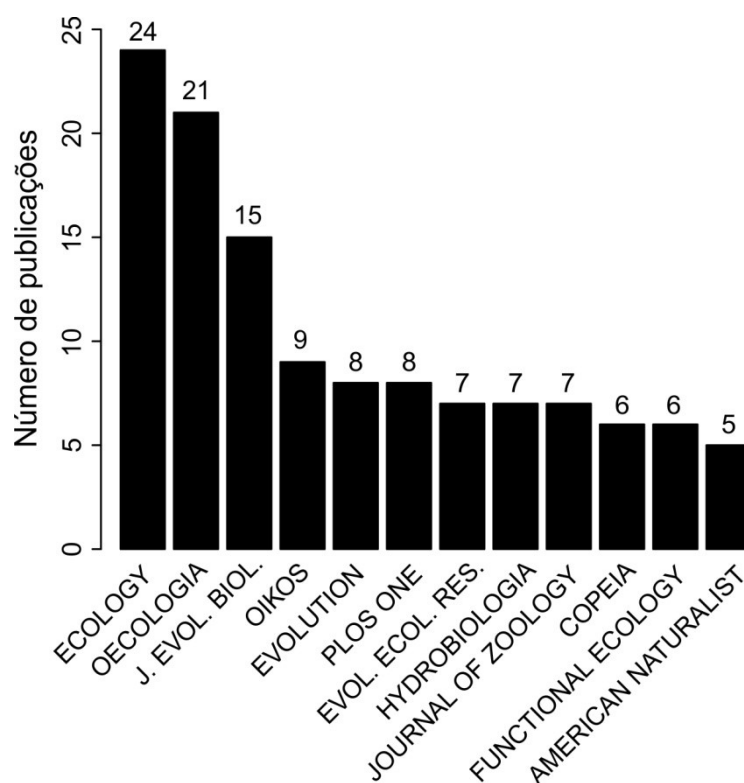


Figura 8. Número de trabalhos publicados nos periódicos. Das 111 revistas científicas encontradas na busca, estão representadas as 12 com maior número de trabalhos publicados. As outras revistas (n=62) possuem menos de 05 citações. Abreviações: J. Evol. Biol.: *Journal of Evolutionary Biology*; Evol. Ecol. Res.: *Evolutionary Ecology Research*.

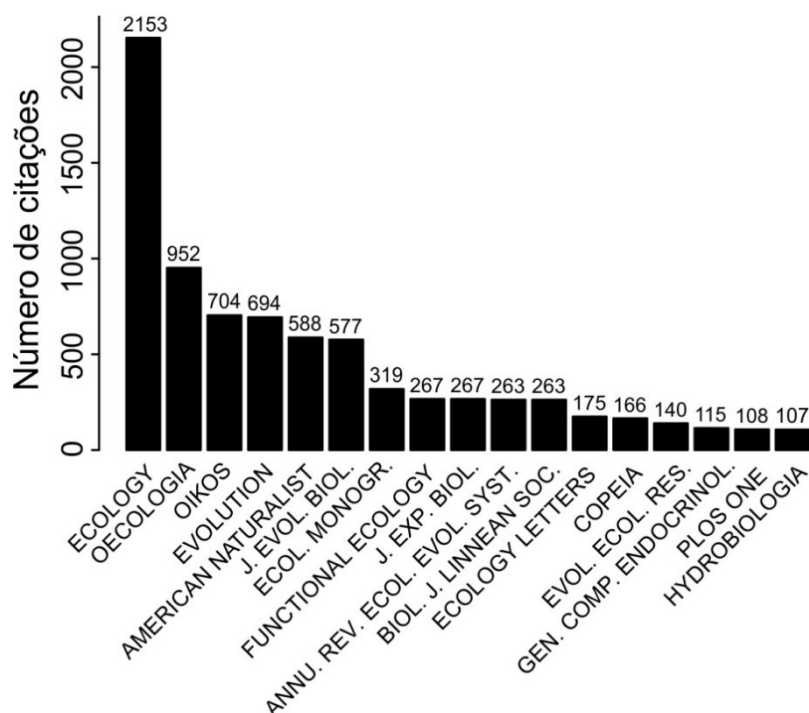


Figura 9. Número de citações de cada periódico. Abreviações: J. Evol. Biol.: *Journal of Evolutionary Biology*; Ecol. Monogr.: *Ecological Monographs*; J. Exp. Biol.: *Journal of Experimental Biology*; Annu. Rev. Ecol. Evol.: *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*; Biol. J. Linnean Soc.: *Biological Journal of Linnean Society*; Evol. Ecol. Res.: *Evolutionary Ecology Research*; Gen. Comp. Endocrinol.: *General and Comparative Endocrinology*.

DISCUSSÃO

O crescente interesse de pesquisadores pela ecomorfologia de girinos se confirma com o aumento de trabalhos nos últimos vinte anos. Esse aumento de publicações é uma forma de medir os avanços feitos nessa área, de maneira que mais conhecimento vem sendo produzido, da mesma forma como novas ideias e perguntas vêm sendo testadas.

Em relação ao acesso às publicações, o uso de um único idioma em quase todos os trabalhos analisados (99% dos estudos) pode ser considerado como um facilitador da comunicação entre a sociedade acadêmica (Di Bitetti & Ferreras 2016). Porém, ainda que todos esses trabalhos “falem a mesma língua”, apenas uma minoria está disponível gratuitamente à sociedade, o que pode dificultar o acesso ao conhecimento. A escolha da publicação em revistas com acesso restrito é normalmente feita pelo maior número

de citações (fator de impacto) que essas revistas normalmente possuem (Fig. 2). Isso porque, quanto mais um trabalho é citado, maior é seu impacto na comunidade científica (Verbeek et al. 2002). De fato, as revistas com trabalhos mais citados são bem conceituadas e de veiculação internacional (e.g., *Ecology*, *Oecologia*, Fig. 9). Todavia, nós verificamos que o número citações de trabalhos com acesso aberto também tende a aumentar ao longo do tempo (Fig. 4). Além disso, revistas que permitem acesso livre a todos os artigos (e.g., *PlosOne*) e as que possuem os dois tipos de acesso aos trabalhos (e.g., *Oikos*) também estão entre os periódicos com mais citações (Fig. 9). Sendo assim, é importante que as publicações em revistas de acesso aberto sejam cada vez mais incentivadas, a fim de garantir que a informação seja acessada por mais pessoas, de maneira mais simples e menos seletiva.

Pesquisadores brasileiros vêm publicando trabalhos de grande importância científica na área da ecomorfologia de girinos, que contribuem com a ciência de maneira geral e também com conhecimento sobre a biodiversidade do Brasil. Porém, o impacto desses trabalhos não é tão alto quanto o de pesquisadores de países desenvolvidos. Comparativamente, países com um número de publicações próximo ao do Brasil, possuem um número substancialmente maior de citações (e.g., Suécia e Suíça, Figs. 6 e 7). Essa diferença na quantidade e na influência dos trabalhos publicados é provavelmente resultante das diferenças no incentivo à pesquisa nos países. Em países em desenvolvimento, como a Argentina e o Brasil, a comunidade científica precisa empregar grandes esforços para realizar pesquisas de qualidade, já que a ciência carece de incentivos e reconhecimento (Mugnaini et al. 2004). Se compararmos a ausência de trabalhos publicados por autores de países africanos ao alto número de publicações de trabalhos produzidos por autores estadunidenses e europeus (e.g., Suíça e Suécia), essa diferença no suporte à pesquisa é ainda mais evidenciada.

Em países desenvolvidos, instituições públicas, empresas privadas e organizações não-governamentais dão suporte à pesquisa científica através de financiamentos e infraestrutura. Consequentemente, essas pesquisas são inovadoras e produzem um impacto alto na comunidade científica (Mugnaini et al. 2004).

Os trabalhos mais citados, entre todos os analisados, são os que mostram de forma empírica a variação na forma dos organismos em resposta a pressões seletivas, como a influência de predadores (e.g. Relyea 2001, com 397 citações). Isso mostra a preocupação dos pesquisadores em produzir evidências da evolução dos fenótipos em resposta à seleção natural (Van Buskirk et al. 2003). Estudos comparativos foram menos citados, porém não são menos importantes que estudos experimentais. Apesar de apenas inferirem a causalidade da variação entre as espécies, os métodos comparativos são de fundamental importância para o reconhecimento de padrões que podem ser atribuídos a homologias e analogias entre as espécies (Betz 2006). Além disso, eles são a base para indicar relações ecomorfológicas que podem ser testadas empiricamente.

Lacunas no conhecimento e direcionamentos futuros

Estudos em longo prazo e mudanças climáticas

Entre as publicações resultantes da busca, não há registros de estudos que acompanham as mudanças morfológicas de uma mesma população de girinos ao longo do tempo. Assim como para aves (Grant & Grant 2002) esses estudos também existem para anuros adultos. Registros de uma população de anuros adultos que datam de mais de 20 anos de diferença mostram mudanças no tamanho corporal e no canto dos machos associadas à variação da temperatura local do ambiente (Narins & Meenderink 2014). Da mesma forma, é possível que entre girinos também seja possível reconhecer

diferenças morfológicas em um longo período de tempo, resultantes, por exemplo, de mudanças na temperatura da água. Durante o desenvolvimento larval, mudanças na morfologia dos girinos podem resultar de diferenças na temperatura da água por si só (e.g. tamanho, Watkins & Vraspir 2006) ou ainda em interação com outros fatores (e.g. predadores, Touchon and Warkentin, 2011). Em longo prazo, é possível que essas variações morfológicas sejam adaptativas (Bock 1990). Além disso, considerando os cenários de mudanças climáticas futuros (e.g. WorldClim: www.worldclim.org), esses estudos em longo prazo se fazem ainda mais necessários. A inclusão das larvas em estudos sobre as ameaças de extinção das espécies, como as mudanças climáticas, pode tornar ainda mais urgente a tomada de medidas para a conservação das espécies de anuros.

Em países menos desenvolvidos economicamente, estudos em longo prazo no ambiente natural dificilmente são implementados. Isso acontece devido à demanda de recursos por um longo tempo e também pelos produtos da pesquisa não serem entendidos como prioridade entre agências de fomento e autoridades políticas (Marques 2016). Uma alternativa para esse problema é o uso de bases de dados e o acesso a coleções científicas de girinos. Coleções científicas possuem registros da biodiversidade coletada ao longo do tempo e são essenciais para complementar dados de campo em estudos taxonômicos, ecológicos, evolutivos e biogeográficos (Graham et al. 2004, Robbirt et al. 2011; da Silva et al. 2017). O acesso a esses materiais poderá ser de grande valor para avaliar as variações na morfologia de populações de girinos ao longo do tempo.

Funções das estruturas anatômicas

O conhecimento sobre o funcionamento das estruturas anatômicas é imprescindível para entender as implicações da variação na morfologia das espécies em diferentes aspectos ecológicos (Bock 1990). Variações nessas estruturas são espécie-específicas (McDiarmid & Altig 1999) e, conseqüentemente, é possível que proporcionem formas diferentes de uso do ambiente entre as espécies (Rupp & Hulsey 2014). Por exemplo, em relação à locomoção, sabe-se que a cauda e o flagelo desempenham a função de regular a natação dos girinos (Wassersug & Hoff 1985, Wassersug 1989). A cauda dos girinos também pode ter a função de atrair o predador para longe da região do corpo, onde o ataque seria fatal (Van Buskirk et al. 2003). Já o flagelo parece melhorar a capacidade dos girinos de fazer manobras, porém ainda não há testes que comprovem essa função. Esse tipo de conhecimento poderá elucidar diferenças na escolha de micro-habitats entre as espécies (área aberta do corpo d'água *versus* vegetação aquática) e no comportamento de girinos em relação a predadores.

Além disso, as estruturas orais externas dos girinos são amplamente utilizadas para a identificação das espécies, porém a função delas ainda é apenas parcialmente conhecida. Hoje nós entendemos melhor o funcionamento das estruturas queratinizadas no disco oral dos girinos: elas removem material orgânico dos substratos através da raspagem da superfície (Wassersug & Yamashita 2001). Entretanto, a função das papilas e dos *gaps*, tanto nas fileiras de dentes labiais quanto nas fileiras de papilas, ainda é desconhecida, havendo apenas hipóteses que precisam ser testadas (e.g. Gradwell 1975, Van Dijk 1981, Wassersug & Yamashita 2001). Já a função das emarginações nas fileiras de papilas nem sequer foi explorada. Isso significa que mesmo que novos estudos encontrem implicações da variação na morfologia oral sobre a

ecologia dos girinos (e.g. Annibale et al. 2019), ainda não é possível explicar os mecanismos que geram a variação no desempenho de atividades das espécies.

Morfologia e o ambiente

Usualmente, as características morfológicas dos girinos são usadas para inferir o local onde as larvas ocorrem, tanto entre ambientes [e.g. lótico ou lêntico (Altig & Johnston 1989)], como dentro de um mesmo ambiente [e.g. fundo, meio ou superfície da água (Marques & Nomura 2015)]. Porém, essa relação pode não ser tão preditiva e restritiva para todas as espécies. Girinos de *Pseudis platensis* e *P. paradoxa* são exemplos de que essa associação é mais complexa do que previamente considerada. As larvas dessas espécies possuem o morfotipo nectônico, com nadadeiras altas e corpo comprimido, entre outras características (Rossa-Feres & Nomura 2006, Schulze et al. 2015). Como esperado pelo tipo morfológico, de fato esses girinos podem ser encontrados a meia-água. Entretanto, eles também são comumente observados junto à superfície (perpendicularmente posicionados), e ainda sobre o fundo do corpo d'água (até mesmo deitados lateralmente). Essas mudanças no uso da coluna d'água ainda não foram investigadas para essa espécie, mas parecem estar ligadas à ontogenia (Marissa Fabrezi, comunicação pessoal; F.S. Annibale, observação pessoal).

Além disso, o uso espacial do ambiente é normalmente inferido através de amostragens no corpo d'água e observações naturalísticas. Ambos os métodos são realizados durante o dia; dificilmente girinos são estudados durante a noite (e.g. Schulze et al. 2015). Porém, existem tanto larvas diurnas como noturnas (e.g. Eterovick 2003), de forma que é possível que o uso do ambiente mude conforme o período que os girinos são mais ativos. Por exemplo, durante o dia, girinos de *Physalaemus nattereri* se alimentam tanto em áreas rasas marginais como em áreas mais profundas e afastadas da

margem. Já durante a noite, a maioria dos girinos forrageia nas áreas mais fundas do ambiente (Marques et. al., dados não publicados). Considerar o período do dia para entender as relações ecomorfológicas das espécies pode ajudar, portanto, a diminuir o viés dos métodos amostrais e observacionais. Além disso, será possível conhecer uma amplitude maior de recursos, como a profundidade da coluna d'água, que as larvas conseguem explorar, mesmo com um tipo de morfologia que indica algum tipo de restrição no uso do ambiente.

Ainda, os fatores que levam as espécies a selecionarem micro-habitats nem sempre são investigados. Entre girinos que vivem junto ao fundo do corpo d'água, por exemplo, explorar recursos em diferentes profundidades não é apenas uma questão de preferência, mas também de capacidade (Rosa et al., dados não publicados). Mesmo em um ambiente raso, espécies tipicamente de fundo diferem quanto à eficiência de encontrar e consumir o alimento ao longo da coluna d'água, gerando diferenças nas taxas de crescimento dos girinos (Rosa et al., dados não publicados). Investigar a variação na capacidade de explorar a coluna d'água de outras espécies poderá fornecer mais evidências que deem suporte ao valor adaptativo da variação na morfologia das espécies.

O tipo de alimento que os girinos exploram no ambiente também pode influenciar a morfologia das larvas de anuros. Para girinos de *Spea bombifrons* e *S. multiplicata*, por exemplo, o tipo de dieta dos girinos (carnívora ou onívora) resulta em diferenças substanciais no tamanho e no formato do corpo das larvas (Pfennig et al. 2007). O mesmo também pode ser esperado entre girinos de outras espécies, já que a disponibilidade de alimento e a dieta das larvas podem variar entre habitats (Altig et al. 2007) e até mesmo dentro de um mesmo ambiente (i.e. microhabitats, Kloh et al. 2019).

Entre outros caracteres, é possível que a dieta afete também a coloração dos girinos, assim como em adultos (Umbers et al. 2016).

Variáveis ambientais são normalmente medidas em estudos de ecologia de comunidades de girinos por representarem fatores que podem ser limitantes à sobrevivência e ao desenvolvimento das larvas (McDiarmid & Altig 1999). Vários desses fatores, no entanto, alteram também a morfologia das espécies (McDiarmid & Altig 1999). O pH, por exemplo, pode influenciar a morfologia oral externa das larvas (Devi et al. 2016). Logo, entender as relações ecomorfológicas de girinos implica investigar também fatores cuja relação com a morfologia não é tão evidente. Além disso, é preciso considerar a interação entre esses fatores em futuros estudos, já que os efeitos sobre a morfologia de girinos podem ser sinérgicos (e.g. Thiemann & Wassersug 2000).

Análise integrada da morfologia oral

Normalmente a relação entre a alimentação dos girinos e a morfologia oral é estudada separadamente entre as estruturas externas (Orton, 1953; Wassersug & Yamashita 2001, Venesky et al. 2013) e as internas (Kenny 1969; Wassersug, 1972; Vera Candioti 2006, 2007). Um dos problemas desse tipo de abordagem, é que a detecção (ou não) da relação ecomorfológica fica restrita a apenas uma parte da morfologia oral envolvida na alimentação das larvas. Consequentemente, questões sobre a partilha de nicho entre as espécies e a estrutura de comunidades dificilmente são respondidas (Altig & Johnston 1989). Estudos integrados das estruturas orais internas e externas podem ser mais informativos sobre a relação entre a morfologia e o hábito alimentar das espécies. Esses estudos podem incluir a análise dos itens alimentares que compõem a dieta dos girinos (e.g. Picheli 2016), o tamanho das partículas e/ou o

volume do alimento ingerido pelas larvas. Além disso, eles podem contribuir com o reconhecimento de especializações no comportamento alimentar das espécies (e.g. girinos carnívoros de *Ceratophrys cranwelli*, Vera Candioti 2005).

Sugestivamente seria possível testar a relação entre os tipos de substrato que os girinos raspam para obter alimento e a morfologia oral externa das espécies (e.g. Annibale et al. 2019; Annibale et al., dados não publicados) e, posteriormente relacionar os parâmetros do alimento ingerido desses substratos (e.g. tamanho das partículas/volume) e a morfologia oral interna das larvas (e.g. Vera Candioti 2007; Kloh et al. 2019). Isso porque as estruturas orais externas possuem a função de remover a matéria orgânica dos substratos (Wassersug & Yamashita, 2001), enquanto as estruturas internas filtram o alimento (Kenny 1969; Wassersug 1972). Assim, seria possível entender se os girinos escolhem substratos onde eles são mais eficientes em remover alimento e que ainda contenham itens alimentares de fácil ingestão e digestão.

Plasticidade

Dependendo das condições bióticas e abióticas do ambiente girinos podem expressar diferentes fenótipos e comportamentos (Petranka and Kennedy 1999; Agrawal 2001; Richter-Boix et al. 2007). A plasticidade fenotípica é melhor documentada, principalmente para a relação entre girinos e predadores (e.g. Relyea 2002; Van Buskirk 2017). Por outro lado, a plasticidade comportamental, bem como o próprio comportamento dos girinos, são pouco conhecidos. Sabe-se, por exemplo, que a plasticidade no comportamento dos girinos permite que eles utilizem inclusive o ambiente fora da água para escolher micro-habitats e fugir de predadores (de Sousa et al. 2011), alternem o hábito alimentar dependendo do tipo de alimento disponível (de Sousa et al. 2015) e selecionem substratos para obter alimento (Ramamonjisoa et al.

2017). Por esse motivo, padrões entre a morfologia e aspectos ecológicos das espécies podem não ser tão evidentes. Entretanto, conhecer a plasticidade das larvas de anuros nos permite entender a variação nas relações ecomorfológicas das espécies, por exemplo em um gradiente ambiental (Van Buskirk 2009) e ainda como ela é selecionada (Van Buskirk and Relyea 1998). Nas regiões tropicais, por exemplo, estudos que investiguem a plasticidade das larvas podem nos ajudar a entender a diversidade morfológica de tantas espécies e como elas estão distribuídas nos tão diversos tipos de ambiente.

Desafios para o Brasil

No Brasil, a alta diversidade de espécies é por si só uma grande oportunidade para pesquisas originais e inovadoras. As contribuições da pesquisa brasileira à ecomorfologia de girinos têm sido de grande valor, porém, com um maior investimento na ciência do país, será possível realizar pesquisas ainda mais avançadas e desafiadoras, e em território nacional. Isto significaria ir além de estudos que inferem a ecologia das larvas pelas características morfológicas das espécies e as incluem em guildas ecomorfológicas pré-estabelecidas. Significa testar questões mais amplas em ecomorfologia, que ajudem a explicar a alta diversidade de forma que existem entre as larvas de anuros do Brasil. Isso inclui testar novos fatores que possam influenciar aspectos ecológicos das larvas, como a partilha de nicho (e.g. substratos onde os girinos exploram alimento no lugar apenas da dieta), a plasticidade fenotípica (e.g. pressão do hidroperíodo sobre a morfologia) e a seleção natural (e.g. respostas adaptativas às mudanças climáticas). Além disso, o incentivo (científico e financeiro) às observações naturalísticas definitivamente pode contribuir com a ecomorfologia de girinos. Além de fornecer evidências com o mínimo de interferência, as observações em campo são primordiais para que novas questões sejam levantadas acerca das relações

ecomorfológicas das espécies. Dessa maneira, o Brasil pode se tornar um referência em estudos ecológico-evolutivos sobre as larvas de anuros, preenchendo importantes lacunas no conhecimento e contribuindo com dados para a conservação das espécies.

CONCLUSÃO

Os estudos sobre a ecomorfologia de girinos vêm aumentando com o tempo e trazendo contribuições valiosas para a compreensão da evolução da variação morfológica entre girinos. Porém, como uma área de estudo relativamente nova na ciência, ainda há muitas questões que precisam ser testadas para preencher grandes lacunas no conhecimento. Mesmo assim, é uma área que tende a crescer, com pesquisas inovadoras que poderão nos ajudar a entender melhor a biodiversidade, contribuir com dados para a conservação de espécies e ainda servir de base para estudos com outros grupos de animais com ciclo de vida complexo como os anuros.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* (80-.). 294(321):321–326.
- ALBERCH, P., GOULD, S.J., OSTER, G.F. & WAKE, D.B. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology* 5(3):296–317.
- ALTIG, R. 2006. Discussions of the origin and evolution of the oral apparatus of anuran tadpoles. *Acta Herpetol.* 1(2):95–105.
- ALTIG, R. & JOHNSTON, G.F. 1989. Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies, and habitats. *Herpetol. Monogr.* 3(1989):81–109.
- ALTIG, R., WHILES, M.R. & TAYLOR, C.L. 2007. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshw. Biol.* 52(2):386–395.
- AMPHIBIAWEB. 2019. AmphibiaWeb. Disponível em: <https://amphibiaweb.org> University of California, Berkeley, CA, USA. Acesso em: 24/01/2019.
- ANDRADE, G. V., ETEROVICK, P.C., ROSSA-FERES, D.C. & SCHIESARI, L. 2007. Estudos sobre girinos no Brasil: histórico, conhecimento atual e perspectivas. In *Herpetologia no Brasil II*. Sociedade Brasileira de Herpetologia (L. B. Nascimento & M. E. Oliveira, eds) Belo Horizonte, Brasil, p.127–145.
- ANDREONE, F., ROSA, G.M., NOËL, J., CROTTINI, A., VENCES, M. & RAXWORTHY, C.J. 2010. Living within fallen palm leaves: the discovery of an unknown *Blommersia* (Mantellidae: Anura) reveals a new reproductive strategy in the amphibians of Madagascar. *Naturwissenschaften* 97:525–543.
- ANNIBALE, F.S., DE SOUSA, V.T.T., DE SOUSA, C.E., VENESKY, M.D., ROSSA-FERES, D.C., NOMURA, F. & WASSERSUG, R.J. 2019. Influence of substrate orientation on tadpoles' feeding efficiency. *Biol. Open* 8(1):bio037598.
- ARRIBAS, R., TOUCHON, J.C. & GOMEZ-MESTRE, I. 2018. Predation and competition differentially affect the interactions and trophic niches of a Neotropical amphibian guild. *Front. Ecol. Evol.* 6(28):1–14.
- BELLWOOD, D.R., STREIT, R.P., BRANDL, S.J. & TEBBETT, S.B. 2019. The meaning of the term 'function' in ecology: A coral reef perspective. *Funct. Ecol.* 1–14.
- BETZ, O. 2002. Performance and adaptive value of tarsal morphology in rove beetles of the genus *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). *J. Exp. Biol.* 205(8):1097–1113.
- BETZ, O. 2006. Ecomorphology: Integration of form, function, and ecology in the analysis of morphological structures. *Mitteilungen der Dtsch. Gesellschaft für Allg. und Angew. Entomol.* 154:09–416.
- BOCK, W.J. 1990. From biologische anatomie to ecomorphology. *Netherlands J. Zool.* 40(1–2):254–277.
- BOOKSTEIN, F.L. 1990. Introduction to methods for landmark data. In *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop* The University of Michigan Museum of Zoology, EUA, p.215–225.
- BUTLER, M.A. & KING, A.A. 2004. Phylogenetic comparative analysis: a modeling approach for adaptive evolution. *Am. Nat.* 164(6):683–695.
- CABRERA-GUZMÁN, E., CROSSLAND, M.R., BROWN, G.P. & SHINE, R. 2013. Larger body size at metamorphosis enhances survival, growth and performance of young cane toads (*Rhinella marina*). *PLoS One* 8(7):e70121.
- CHANNING, A. 1999. Historical overview of amphibian systematics in southern Africa. *Trans. R. Soc. South Africa* 54(1):121–135.

- CHIPMAN, A.D. & TCHERNOV, E. 2002. Ancient ontogenies: larval development of the lower Cretaceous anuran *Shomronella jordanica* (Amphibia: Pipoidae). *Evol. Dev.* 4(2):86–95.
- COOPER, W.E. 1997. Correlated evolution of prey chemical discrimination with foraging, lingual morphology and vomeronasal chemoreceptor abundance in lizards. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 41:257–265.
- COSTA, R.N. & NOMURA, F. 2016. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia* 765(1):85–96.
- DA SILVA, F.R., PROVETE, D.B., GERASSI, L.K. & BOVO, R.P. 2017. What do data from fieldwork and scientific collections tell us about species richness and composition of amphibians and reptiles? *South Am. J. Herpetol.* 12(2):99–106.
- DARWIN, C. 1859. *On the Origin of Species*. John Murray, London, UK.
- DE SOUSA, V.T.T., NOMURA, F., ROSSA-FERES, D.C., ANDRADE, G. V., PEZZUTI, T.L., WASSERSUG, R.J. & VENESKY, M.D. 2015. Differential effects of temperature on the feeding kinematics of the tadpoles of two sympatric anuran species. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 323(7):456–465.
- DE SOUSA, V.T.T., NOMURA, F., VENESKY, M.D., ROSSA-FERES, D.C., PEZZUTI, T.L., ANDRADE, G. V. & WASSERSUG, R.J. 2014. Flexible feeding kinematics of a tropical carnivorous anuran tadpole. *J. Zool.* 293(3):204–210.
- DE SOUSA, V.T.T., TERESA, F.B. & ROSSA-FERES, D.C. 2011. Predation risk and jumping behavior in *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* tadpoles. *Behav. Ecol.* 22(5):940–946.
- DEVI, L.M., THABAH, C.M., HOOROO, R.N.K. & DEY, S. 2016. Morphological and microstructural changes of the oral apparatus in two anuran tadpoles, in regard to pH. *Micron* 82:41–51.
- DI BITETTI, M.S. & FERRERAS, J.A. 2016. Publish (in English) or perish: the effect on citation rate of using languages other than English in scientific publications. *Ambio* 46(1):121–127.
- ETEROVICK, P.C. 2003. Distribution of anuran species among montane streams in south-eastern Brazil. *J. Trop. Ecol.* 19:219–228.
- ETEROVICK, P.C. & FERNANDES, G.W. 2001. Tadpole distribution within montane meadow streams at the Serra do Cipó, southeastern Brazil: ecological or phylogenetic constraints? *J. Trop. Ecol.* 17:683–693.
- EVANS, A.R. & PINEDA-MUNOZ, S. 2018. Inferring mammal dietary ecology from dental morphology. In *Methods in Paleoecology* Springer International Publishing, p.37–51.
- FROST, D.R. 2018. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Am. Museum Nat. Hist. USA. Disponível em <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. Acesso em 24/01/2019.
- GLOS, J., WOLTER, J., STRUCK, U. & RÖDEL, M.-O. 2017. Ecological shifts during larval development in two West African savanna frogs. *J. Trop. Ecol.* 33(01):50–59.
- GONÇALVES, M.W., GAMBALE, P.G., GODOY, F.R., ALVES, A.A., REZENDE, P.H. de A., CRUZ, A.D. da, MACIEL, N.M., NOMURA, F., BASTOS, R., DE MARCO-JR, P. & SILVA, D. de M. 2017. The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay. *Zoologia* 34:1–8.
- GOSNER, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16(3):183–190.

- GRADWELL, N. 1975. The bearing of filter feeding on the water pumping mechanism of *Xenopus* tadpoles (Anura: Pipidae). *Acta Zool.* 56:119–128.
- GRAHAM, C.H., FERRIER, S., HUETTMAN, F., MORITZ, C. & PETERSON, A.T. 2004. New developments in museum-based informatics and applications in biodiversity analysis. *Trends Ecol. Evol.* 19(9):497–503.
- GRANT, B.R. & GRANT, P.R. 2003. What Darwin's finches can teach us about the evolutionary origin and regulation of biodiversity. *Bioscience* 53(10):965–975.
- GRANT, P.R. & GRANT, B.R. 2002. Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin's finches. *Science* (80-.). 296(5568):707–711.
- GROSJEAN, S. 2005. The choice of external morphological characters and developmental stages for tadpole-based anuran taxonomy: a case study in *Rana (Sylvirana) nigrovittata* (Blyth, 1855) (Amphibia, Anura, Ranidae). *Contrib. to Zool.* 74(1/2):61–76.
- HANLON, S.M., LYNCH, K.J., KERBY, J.L. & PARRIS, M.J. 2015. Environmental substrates alter survival and foraging efficiencies in tadpoles. *Herpetol. Conserv. Biol.* 10(1):180–188.
- HANSEN, T.F., PIENAAR, J. & ORZACK, S.H. 2008. A comparative method for studying adaptation to a randomly evolving environment. *Evolution* (N. Y). 62(8):1965–1977.
- HARVEY, P.H. & PAGEL, M.D. 1991. The comparative method for studying adaptation. In *The Comparative Method in Evolutionary Biology* Oxford University Press, p.1–34.
- HIGHAM, T.E. 2007. The integration of locomotion and prey capture in vertebrates: Morphology, behavior, and performance. *Integr. Comp. Biol.* 47(1):82–95.
- IUCN. 2019. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 24/01/2019.
- JAYAWARDENA, U.A., TKACH, V. V., NAVARATNE, A.N., AMERASINGHE, P.H. & RAJAKARUNA, R.S. 2013. Malformations and mortality in the Asian common toad induced by exposure to *Pleurolophocercous cercariae* (Trematoda: Cryptogonimidae). *Parasitol. Int.* 62(3):246–252.
- JORDANI, M.X., OUCHI DE MELO, L.S., QUEIROZ, C. de S., ROSSA-FERES, D.C. & GAREY, M. V. 2017. Tadpole community structure in lentic and lotic habitats: richness and diversity in the Atlantic Rainforest lowland. *Herpetol. J.* 27:299–306.
- KATZ, H.R. & HALE, M.E. 2016. A large-scale pattern of ontogenetic shape change in ray-finned fishes. *PLoS One* 11(3):1–7.
- KENNY, J.S. 1969. Feeding mechanisms in anuran larvae. *J. Zool.* 157:225–246.
- KLOH, J.S., FIGUEREDO, C.C. & ETEROVICK, P.C. 2019. How close is microhabitat and diet association in aquatic ecomorphotypes? A test with tadpoles of syntopic species. *Hydrobiologia* 828(1):271–285.
- LACK, D. 1940. Evolution of the Galapagos finches. *Nature* 146:324–327.
- LATASTE, F. 1879. Étude sur le Discoglosse. *Actes la Société linnéenne Bordeaux* 33:275–341.
- LIMA-RIBEIRO, M. de S., NABOUT, J.C., PINTO, M.P., MOURA, I.O. de, MELO, T.L. de, COSTA, S.S. & RANGEL, T.F.L.V. de B. 2007. Análise cienciométrica em ecologia de populações: importância e tendências dos últimos 60 anos. *Acta Sci. Biol. Sci.* 29(1):39–47.
- LIMBAUGH, B.A. & VOLPE, P. 1957. Early development of the Gulf Coast toad, *Bufo valliceps* Wiegmann. *Am. Museum Novit.* 184:21–32.
- LOSOS, J.B. 1990. Ecomorphology, performance capacity and scaling of West Indian *Anolis* lizards: an evolutionary analysis. *Ecol. Monogr.* 60(3):369–388.

- LOTKA, A.J. 1932. The growth of mixed populations: Two species competing for a common food supply. In *The Golden Age of Theoretical Ecology: 1923-1940*. 1978 (F. M. Scudo & J. R. Ziegler, eds) Springer-Verlag, p.274–286.
- MARINO, J.A., HOLLAND, M.P. & MIDDLEMIS MAHER, J. 2014. Predators and trematode parasites jointly affect larval anuran functional traits and corticosterone levels. *Oikos* 123(4):451–460.
- MARQUES, F. 2016. Os impactos do investimento. *Pesqui. FAPESP* 16–23.
- MARQUES, N.S. & NOMURA, F. 2015. Where to live? How morphology and evolutionary history predict microhabitat choice by tropical tadpoles. *Biotropica* 47(2):227–235.
- MCDIARMID, R.W. & ALTIG, R. 1999. *Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- MILES, D.B. & DUNHAM, A.E. 1993. Historical perspectives in ecology and evolutionary biology: the use of phylogenetic comparative analyses. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24(1993):587–619.
- MUGNAINI, R., JANNUZZI, P. & QUONIAM, L. 2004. Indicadores bibliométricos da produção científica brasileira: uma análise a partir da base Pascal. *Ciência da Informação* 33(2):123–131.
- NARINS, P.M. & MEENDERINK, S.W.F. 2014. Climate change and frog calls: long-term correlations along a tropical altitudinal gradient. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 281(20140401):1–6.
- NEWMAN, R.A. 1998. Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia* 115(1):9–16.
- NOBLE, G.K. 1926. The hatching process in *Alytes*, *Eleutherodactylus* and other amphibians. *Am. Museum Novit.* 2291–7.
- NOBLE, G.K. 1927. The value of life history data in the study of the evolution of the amphibia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 30(1):31–128.
- ORTON, G.L. 1953. The systematics of vertebrate larvae. *Syst. Zool.* 2(2):63–75.
- OUCHI DE MELO, L.S., GONÇALVES-SOUSA, T., GAREY, M. V. & ROSSA-FERES, D.C. 2017. Tadpole species richness within lentic and lotic microhabitats: an interactive influence of environmental and spatial factors. *Herpetol. J.* 27339–345.
- PERES-NETO, P.R. 1999. Alguns métodos e estudos em ecomorfologia de peixes de riachos. *Oecologia Bras.* 06(01):209–236.
- PETRANKA, J.W. & KENNEDY, C.A. 1999. Pond tadpoles with generalized morphology: is it time to reconsider their functional roles in aquatic communities? *Oecologia* 120(4):621–631.
- PEZZUTI, T.L. 2011. *Girinos do Quadrilátero Ferrífero, Sudeste do Brasil: Ecomorfologia e chave de identificação interativa*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- PEZZUTI, T.L., FERNANDES, I.R., LEITE, F.S.F., DE SOUSA, C.E., GARCIA, P.C.A. & ROSSA-FERES, D.C. 2016. The tadpoles of the Neotropical *Scinax catharinae* group (Anura, Hylidae): Ecomorphology and descriptions of two new forms. *Zool. Anz.* 26122–32.
- PFENNIG, D.W., RICE, A.M. & MARTIN, R.A. 2007. Field and experimental evidence for competition's role in phenotypic divergence. *Evolution* (N. Y). 61(2):257–271.
- PICHELI, K. de O. da R. 2016. Atributos morfológicos como preditores da dieta em girinos. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

- POLLISTER, A.W. & MOORE, J.A. 1937. Tables for the normal development of *Rana sylvatica*. Anat. Rec. 68(4):489–496.
- PRADO, V.H.M., FONSECA, M.G., DE ALMEIDA, F.V.R., NECCHI, O. & ROSSA-FERES, D.C. 2009. Niche occupancy and the relative role of micro-habitat and diet in resource partitioning among pond dwelling tadpoles. South Am. J. Herpetol. 4(3):275–285.
- PROVETE, D.B., GAREY, M.V., SILVA, F.R. da & JORDANI, M.X. 2012. Knowledge gaps and bibliographical review about description of free-swimming anuran larvae from Brazil. North-Western J. Zool. 8(2):283–286.
- PROVETE, D.B., GONÇALVES-SOUZA, T., GAREY, M. V., MARTINS, I.A. & ROSSA-FERES, D.C. 2014. Broad-scale spatial patterns of canopy cover and pond morphology affect the structure of a Neotropical amphibian metacommunity. Hydrobiologia 734(1):69–79.
- PYRON, R.A. & WIENS, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. Mol. Phylogenet. Evol. 61(2):543–83.
- QUEIROZ, C. de S., DA SILVA, F.R. & ROSSA-FERES, D.C. 2015. The relationship between pond habitat depth and functional tadpole diversity in an agricultural landscape. R. Soc. Open Sci. 2150165.
- R CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAMAMONJISOA, N., RAKOTONOELY, H. & NATUHARA, Y. 2017. Food preference in relation to resource toughness and protein level in a pond dwelling tadpole. J. Herpetol. 51(1):47–51.
- RELYEA, R.A. 2001. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. Ecology 82(2):523–540.
- RELYEA, R.A. 2002. Competitor-induced plasticity in tadpoles: Consequences, cues, and connections to predator-induced plasticity. Ecol. Monogr. 72(4):523–540.
- RICHTER-BOIX, A., LLORENTE, G.A., MONTORI, A. & GARCIA, J. 2007. Tadpole diet selection varies with the ecological context in predictable ways. Basic Appl. Ecol. 8464–474.
- ROBBIRT, K.M., DAVY, A.J., HUTCHINGS, M.J. & ROBERTS, D.L. 2011. Validation of biological collections as a source of phenological data for use in climate change studies: A case study with the orchid *Ophrys sphegodes*. J. Ecol. 99(1):235–241.
- ROELANTS, K., HAAS, A. & BOSSUYT, F. 2011. Anuran radiations and the evolution of tadpole morphospace. Proc. Natl. Acad. Sci. 108(21):8731–8736.
- ROHLF, F.J. & MARCUS, L.F. 1993. A revolution in morphometrics. Trends Ecol. Evol. 8(4):129–132.
- ROSSA-FERES, D.C., JIM, J. & FONSECA, M.G. 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). Rev. Bras. Zool. 21(4):745–754.
- ROSSA-FERES, D.C. & NOMURA, F. 2006. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. Biota Neotrop. 6(1):.
- ROSSA-FERES, D.C., SAWAYA, R.J., FAIVOVICH, J., GIOVANELLI, J.G.R., BRASILEIRO, C.A., SCHIESARI, L.C., ALEXANDRINO, J. & HADDAD, C.F.B. 2011. Anfíbios do Estado de São Paulo, Brasil: conhecimento atual e perspectivas. Biota Neotrop. 11(1a):1–19.

- RUPP, M.F. & HULSEY, C.D. 2014. Influence of substrate orientation on feeding kinematics and performance of algae-grazing Lake Malawi cichlid fishes. *J. Exp. Biol.* 217:3057–3066.
- RUTHSATZ, K., PECK, M.A., DAUSMANN, K.H., SABATINO, N.M. & GLOS, J. 2018. Patterns of temperature induced developmental plasticity in anuran larvae. *J. Therm. Biol.* 74(November 2017):123–132.
- SANTOS, D.L., DE MORAIS, A.R., SIGNORELLI, L., BASTOS, R.P., FEIO, R. & NOMURA, F. 2018. Description of the tadpole of *Phyllomedusa azurea* from the Brazilian Cerrado, with a description of the internal oral morphology of *Phyllomedusa oreades*. *Herpetologica* 74(1):50–57.
- SCHULZE, A., JANSEN, M. & KOÖHLER, G. 2015. Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: Molecular identification, morphological characterisation, and ecological assignment.
- SHERATT, E., VIDAL-GARCÍA, M., ANSTIS, M. & KEOGH, J.S. 2017. Adult frogs and tadpoles have different macroevolutionary patterns across the Australian continent. *Nat. Ecol. Evol.* 1(9):1385–1391.
- SHUMWAY, W. 1940. Stages in the normal development of *Rana pipiens*. *Anat. Rec.* 78(2):139–147.
- SOKOL, O.M. 1975. The phylogeny of anuran larvae: a new look. *Copeia* 11–23.
- STARRETT, P.H. 1973. Evolutionary patterns in larval morphology. In *Evolutionary Biology of the Anurans* (J. L. Vial, ed.) University of Missouri Press, Columbia, USA, p.251–271.
- SZALAY, F.S. 2000. Function and adaptation in paleontology and phylogenetics: why do we omit Darwin? *Palaeontol. Electron.* 3(2):25p.
- TAYLOR, A.C. & KOLLROS, J.J. 1946. Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* 94(1):7–23.
- TEIXEIRA, I. & BENNEMANN, S.T. 2007. Ecomorfologia refletindo a dieta dos peixes em um reservatório no sul do Brasil. *Biota Neotrop.* 7(2):67–76.
- THIEMANN, G.W. & WASSERSUG, R.J. 2000. Patterns and consequences of behavioural responses to predators and parasites in *Rana* tadpoles. *Biol. J. Linn. Soc.* 71:513–528.
- TOUCHON, J.C. & WARKENTIN, K.M. 2011. Thermally contingent plasticity: Temperature alters expression of predator-induced colour and morphology in a Neotropical treefrog tadpole. *J. Anim. Ecol.* 80(1):79–88.
- UMBERS, K.D.L., SILLA, A.J., BAILEY, J.A., SHAW, A.K. & BYRNE, P.G. 2016. Dietary carotenoids change the colour of Southern corroboree frogs. *Biol. J. Linn. Soc.* 119(2):436–444.
- VAN BUSKIRK, J. 2009. Getting in shape: Adaptation and phylogenetic inertia in morphology of Australian anuran larvae. *J. Evol. Biol.* 22(6):1326–1337.
- VAN BUSKIRK, J. 2017. Spatially heterogeneous selection in nature favors phenotypic plasticity in anuran larvae. *Evolution* (N. Y). 71(6):1670–1685.
- VAN BUSKIRK, J., ANDERWALD, P., LÜPOLD, S., REINHARDT, L. & SCHULER, H. 2003. The lure effect, tadpole tail shape, and the target of dragonfly strikes. *J. Herpetol.* 37(2):420–424.
- VAN BUSKIRK, J. & MCCOLLUM, S.A. 2000. Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles: Morphology and behaviour influence mortality risk from predation. *J. Evol. Biol.* 13(2):336–347.
- VAN BUSKIRK, J. & RELYEA, R.A. 1998. Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles. *Biol. J. Linn. Soc.* 65:301–328.
- VAN DIJK, D.E. 1972. The behavior of southern african anuran tadpoles with particular

- reference to their ecology and related external morphological features. *Zool. Africana* 749–55.
- VAN DIJK, D.E. 1981. Material data other than preserved specimens. *Monit. Zool. Ital.* 15(May 2015):393–400.
- VANTI, N.A.P. 2002. Da bibliometria à webometria: uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. *Ciência da Informação* 31(2):152–162.
- VENESKY, M.D., ROSSA-FERES, D.C., NOMURA, F., ANDRADE, G.V. de, PEZZUTI, T.L., DE SOUSA, V.T.T., ANDERSON, C. V. & WASSERSUG, R.J. 2013. Comparative feeding kinematics of tropical hylid tadpoles. *J. Exp. Biol.* 216:1928–1937.
- VENESKY, M.D., WASSERSUG, R.J. & PARRIS, M.J. 2011. Comparative feeding kinematics of temperate pond-dwelling tadpoles (Anura, Amphibia). *Zoomorphology* 130:31–38.
- VERA CANDIOTI, M.F. 2005. Morphology and feeding in tadpoles of *Ceratophrys cranwelli* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zool.* 86(1):1–11.
- VERA CANDIOTI, M.F. 2006. Ecomorphological guilds in anuran larvae: An application of geometric morphometric methods. *Herpetol. J.* 16(2):149–162.
- VERA CANDIOTI, M.F. 2007. Anatomy of anuran tadpoles from lentic water bodies: systematic relevance and correlation with feeding habits. *Zootaxa* 1–175.
- VERBEEK, A., DEBACKERE, K., LUWEL, M. & ZIMMERMANN, E. 2002. Measuring progress and evolution in science and technology – I: The multiple uses of bibliometric indicators. *Int. J. Manag. Rev.* 4(2):179–211.
- VOLTERRA, V. 1928. Variations and fluctuations of the number of individuals in animal species living together. In *Animal Ecology*. 1931 (N. Chapman, ed.) McGraw-Hill, EUA, p.409–448.
- VON ROSENHOF, A.J.R. 1758. *Historia Naturalis Ranarum Nostratium In Qua Omnes Earum Proprietates, Praesertim Quae Ad Generationem Ipsarum Pertinent, Fusius Enarrantur*. Johann Joseph Fleischmann, Nurembergue, DE.
- WAINWRIGHT, P.C. 1991. Ecomorphology: experimental functional anatomy for ecological problems. *Am. Zool.* 31(December 1989):680–693.
- WASSERSUG, R.J. 1972. The mechanism of ultraplanktonic entrapment in anuran larvae. *J. Morphol.* 137:279–287.
- WASSERSUG, R.J. 1989. Locomotion in amphibian larvae (Or “Why aren’t tadpoles built like fishes?”). *Am. Zool.* 29(1):65–84.
- WASSERSUG, R.J. & HOFF, K. von S. 1985. The kinematics of swimming in anuran larvae. *J. Exp. Biol.* 119:1–30.
- WASSERSUG, R.J. & YAMASHITA, M. 2001. Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 131:183–195.
- WATKINS, T.B. & VRASPIR, J. 2006. Both incubation temperature and posthatching temperature affect swimming performance and morphology of wood frog tadpoles (*Rana sylvatica*). *Physiol. Biochem. Zool.* 79(1):140–149.
- WILBUR, H.M. 1972. Competition, predation, and the structure of the *Ambystoma-Rana sylvatica* Community. *Ecology* 53(1):3–21.
- WILBUR, H.M. 1987. Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond communities. *Ecology* 68(5):1437–1452.
- WILBUR, H.M. 1997. Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. *Ecology* 78(8):2279–2302.
- ZELDITCH, M.L., SWIDERSKI, D.L., SHEETS, H.D. & FINK, WILLIAM, L. 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists: a Primer*. Elsevier, RU.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Exemplo de busca dos termos “ecomorphology”, “tadpoles” e “anuran larvae” no mecanismo de busca avançada,

$ts = ecomorph * AND ts = (anur * NEAR/2 larv * OR tadpole *) NOT ts = (shrimp * OR crustac *)$

onde TS: tópico (campo de busca mais abrangente); *: variações na terminação da palavra buscada (e.g. plural); AND: adiciona os termos da busca; OR: alternativas para os termos da busca; NEAR/2: busca pelos dois termos em qualquer ordem, desde que estejam a 2 palavras de distância (e.g. *larvae of anurans*); parêntesis são necessários quando há mais de um termo a ser buscado.

CAPÍTULO 2

Influence of substrate orientation on tadpoles feeding efficiency

Fabiane Santana Annibale, Verônica Thiemi Tsutae de Sousa, Carlos Eduardo de Sousa,
Matthew D. Venesky, Denise de Cerqueira Rossa-Feres,
Fausto Nomura and Richard J. Wassersug.

Manuscrito publicado no periódico *Biology Open*

Ano da publicação: 2019

doi: 10.1242/bio.037598

Disponível em: <http://bio.biologists.org/content/biolopen/8/1/bio037598.full.pdf>

ABSTRACT

In nature, tadpoles encounter food on substrates oriented at different angles (e.g. vertically along stems, horizontally on the bottom). We manipulated the orientation of food-covered surfaces to test how different orientations of surfaces affect tadpoles' feeding efficiency. We studied taxa that differed in the oral morphology of their larvae and position in the water column. We hypothesized that species would differ in their ability to graze upon surfaces at different orientations and that differences in the tadpoles' feeding ability would result in different growth rates for the species.

The orientation of food-covered surfaces did not affect the growth rate of species with bottom-dwelling tadpoles (whose growth rate varied only between species). Among species with midwater tadpoles, some appear to have a generalist strategy and experienced a high relative growth rate on numerous substrate orientations whereas others achieved high growth rates only on flat substrates (i.e. at 0° and 180°).

We conclude that oral morphology constrains tadpoles' ability to feed at different substrate orientations, and this could lead to niche partitioning in structurally complex aquatic environments. Because physical parameters of the environment can affect tadpoles' growth rate, characterizing these features might help us better understanding how competition structures tadpole assemblages.

Key words: ecomorphology, substrate angle, anuran larvae, feeding behavior, niche partitioning, oral morphology.

INTRODUCTION

The external oral apparatus of most anuran larvae is comprised of a soft, marginally papillated, oral disc that surrounds keratinized jaw sheaths and rows of keratinized labial teeth (McDiarmid & Altig 1999). The function of the marginal papillae is not well established, but some studies suggest that they can facilitate certain tadpoles' ability to adhere to substrates in lotic environments (e.g. Altig and Johnston, 1989). However, the keratinized structures of tadpoles are well described because of their use in anuran systematics (e.g. Orton, 1953; Starrett, 1973; Vera Candioti, 2007). The keratinized jaw sheaths and labial tooth rows lie anterior and posterior to the oral opening. Those keratinized structures are used by tadpoles to scrape or bite organic material off the substrate as food (Wassersug & Yamashita 2001). The keratinized and soft structures vary substantially in complexity among species as both labial tooth rows and marginal papillae can vary in size, arrangement, and configuration (McDiarmid and Altig, 1999; Altig, 2007).

Morphological variation in oral structures of vertebrates usually reflect the resources that are consumed (e.g. bird beaks reflect the type of food they eat (Darwin, 1859; MacArthur, 1958)). Consequently, morphological variation in oral structures typically correlates with dietary niche (Begon et al. 2006). However, this is not the case for many tadpoles. Tadpoles of different species, each with diverse oral structures, can coexist in a single pond during the same season, yet individuals of each species have similar gut contents (Rossa-Feres et al., 2004; Prado et al., 2009). This finding suggests that tadpoles are dietary generalists, and it raises questions related to resource partitioning in diverse community assemblages of tadpoles. Are tadpoles of many species able to use the same resources in the same place and at the same time without one species outcompeting the other?

Our working hypothesis is that anuran larvae divide up the environment not necessarily in terms of the food that they feed on, but in their efficiency for grazing upon various surfaces, each of which have different intrinsic physical properties. These substrate properties could include orientation, firmness, and texture. Here we explore the first of these properties and ask, "how does the orientation of substrates affect tadpoles feeding efficiency?" When anuran larvae differ in their efficiency to feed on a particular surface, those efficiency differences might affect growth and development. If so, less efficient species may explore other microhabitats to avoid competition with more efficient species (Alford 1986).

Morphological characteristics related to locomotion and feeding are key to a species ability to exploit the physical dimensions of a microhabitat (Higham 2007). For example, the morphology of lizard digits is associated with climbing ability and thereby determines where they are able to feed (e.g. on the side of rocks or the underside of branches while upside down (Irschick et al., 1996; Higham and Jayne, 2004)). This relationship between locomotor morphology and substrate utilization can apply to aquatic vertebrates as well. Aquatic salamanders are able to adjust the elevation of their heads to capture prey in the water in different orientations (Shaffer & Lauder 1985). Similarly, cichlid fish have the ability to swim in different positions and to adjust the orientation of their bodies and oral apparatus to acquire food from substrates oriented at different angles (Rupp and Hulsey, 2014). Among tadpoles, differences in feeding efficiency exist even for species that have similar feeding behavior. When feeding upon suspended particles, species differ in rates of particle capture and also in efficiency at gathering particles of different sizes (Seale and Wassersug 1979; Seale et al., 1982). Thus, it is possible that variation in the keratinized oral structures of tadpoles either limits or facilitates their ability to remove food from substrates at different orientations.

If so, differences in feeding efficiencies on various substrates may thus both force and enable tadpoles to partition the environment even when the food matter growing on the surfaces may be abundant and the same.

We manipulated the angle at which food was offered to tadpoles and tested how this angle (i.e. orientation) affected the feeding efficiency of tadpoles from several species that differ in their oral morphology. We hypothesized that species (1) differ in their ability to graze in surfaces at different orientations and (2) partition their habitat use based on the orientation of the surfaces on which they graze most efficiently. We predicted that bottom-dwelling species would be more efficient removing food from horizontal surfaces, as these tadpoles are usually negatively buoyant and typically forage on the bottom of ponds (Altig & Johnston 1989, McDiarmid & Altig 1999). Conversely, we expected that tadpoles that are more commonly found in the water column would be better able to acquire food from vertical and sloping surfaces, as they usually graze upon stems and leaves above the bottom surface. We also predicted that tadpoles that share the same microhabitat, but have different oral morphologies, would differ in their feeding efficiency in relation to substrate orientation. Species, for example, with smaller oral discs and fewer keratinized structures may have more flexible oral discs (Altig 2006b). These more flexible disks may permit them to feed more efficiently upon more contoured surfaces, such as the vertical stems of aquatic plants. Conversely, species with a higher number of keratinized structures usually have a larger oral apparatus, which is in general ventrally oriented, so they may be more efficient feeding on horizontally oriented substrates. Finally, because species that occur at the same depth of the water column and have similar oral morphologies usually share the same resources, we predicted that these species would feed on the same orientations with a similar efficiency.

MATERIALS AND METHODS

Species

We tested our hypotheses using tadpoles of five anuran species: *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826, *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799), *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925), *Dendropsophus minutus* (Peters, 1872) and *Trachycephalus typhonius* (Linnaeus, 1758). These species are usually classified in two guilds—benthic (*P. cuvieri* and *L. fuscus*) and nektonic (*S. fuscovarius*, *D. minutus* and *T. typhonius*) (Rossa-Feres and Nomura, 2006; Marques and Nomura, 2015). This classification is based primarily on the position where tadpoles are found in the water body (benthic = bottom; nektonic = midwater) and on their external morphology. Benthic tadpoles typically have dorsoventrally compressed bodies, shallow fins, and dorsal eyes. Nektonic tadpoles have more laterally compressed bodies, deep fins, the presence of a flagellum at the tip of the tail, and lateral eyes (McDiarmid & Altig 1999).

We selected these species based on the morphology of their external oral structures (Fig. 1). We used their labial tooth row formula (LTRF) to characterize variation in keratinized structures among species because the number and the arrangement of the rows in the oral disc is species specific (McDiarmid & Altig 1999). All these species use their keratinized oral structures to free organic materials from substrates when they feed. Thus, variation in LTRF configuration likely influences tadpole's grazing ability. Tadpoles of *D. minutus* have one ventral and two lateral marginal papillae rows and a LTRF = 0/1 (Fig. 1). The oral disc of this species is small (in comparison to the following species) and terminal positioned (i.e. at the tip of the snout). Tadpoles of *T. typhonius* present two marginal papillae rows, LTRF = 4(1,2,4)/6(1,6) and the oral disc anteroventrally positioned (Fig. 1). Tadpoles of *S. fuscovarius* have one marginal papillae row, LTRF = 2(2)/3(1), and an anteroventrally

positioned oral disc (Fig. 1). The oral morphology of bottom-dwelling tadpoles (*L. fuscus* and *P. cuvieri*) is similar to *S. fuscovarius* in LTRF and the number of marginal papillae (Fig. 1). Similar to *S. fuscovarius*, tadpoles of *L. fuscus* have their oral disc anteroventrally positioned. However the oral disc of *P. cuvieri* tadpoles is more ventrally positioned and its third posterior tooth row is one third smaller than the other posterior tooth rows (Rossa-Feres & Nomura 2006).

The microhabitats where tadpoles of these species most frequently occur also differ (Fig. 2A). The larvae of all these species live in lentic environments, but *L. fuscus* and *P. cuvieri* are bottom-dwelling and occur in shallow microhabitats such as puddles or the margins of ponds (Eterovick & Sazima 2000, Schulze et al. 2015, Queiroz et al. 2015). Tadpoles of *L. fuscus* are usually observed grazing on organic materials that fell into the water or scraping stems and leaves of aquatic plants (Schulze et al. 2015). Tadpoles of *P. cuvieri* can also be found close to macrophytic aquatic vegetation (Eterovick & Sazima 2000). Tadpoles of *S. fuscovarius*, *D. minutus* and *T. typhoni* usually occur in the midwater of deeper water bodies, commonly close to vegetation (Vasconcelos and Rossa-Feres, 2005; Vasconcelos et al., 2011; Schulze et al., 2015). Tadpoles of *T. typhoni* can also be found in shallow water (Schulze et al. 2015). Importantly, the tadpoles of these five species can be temporarily and spatially sympatric (Vasconcelos and Rossa-Feres, 2005; Rossa-Feres and Nomura, 2006; dos Santos et al., 2007; Vasconcelos et al., 2011).

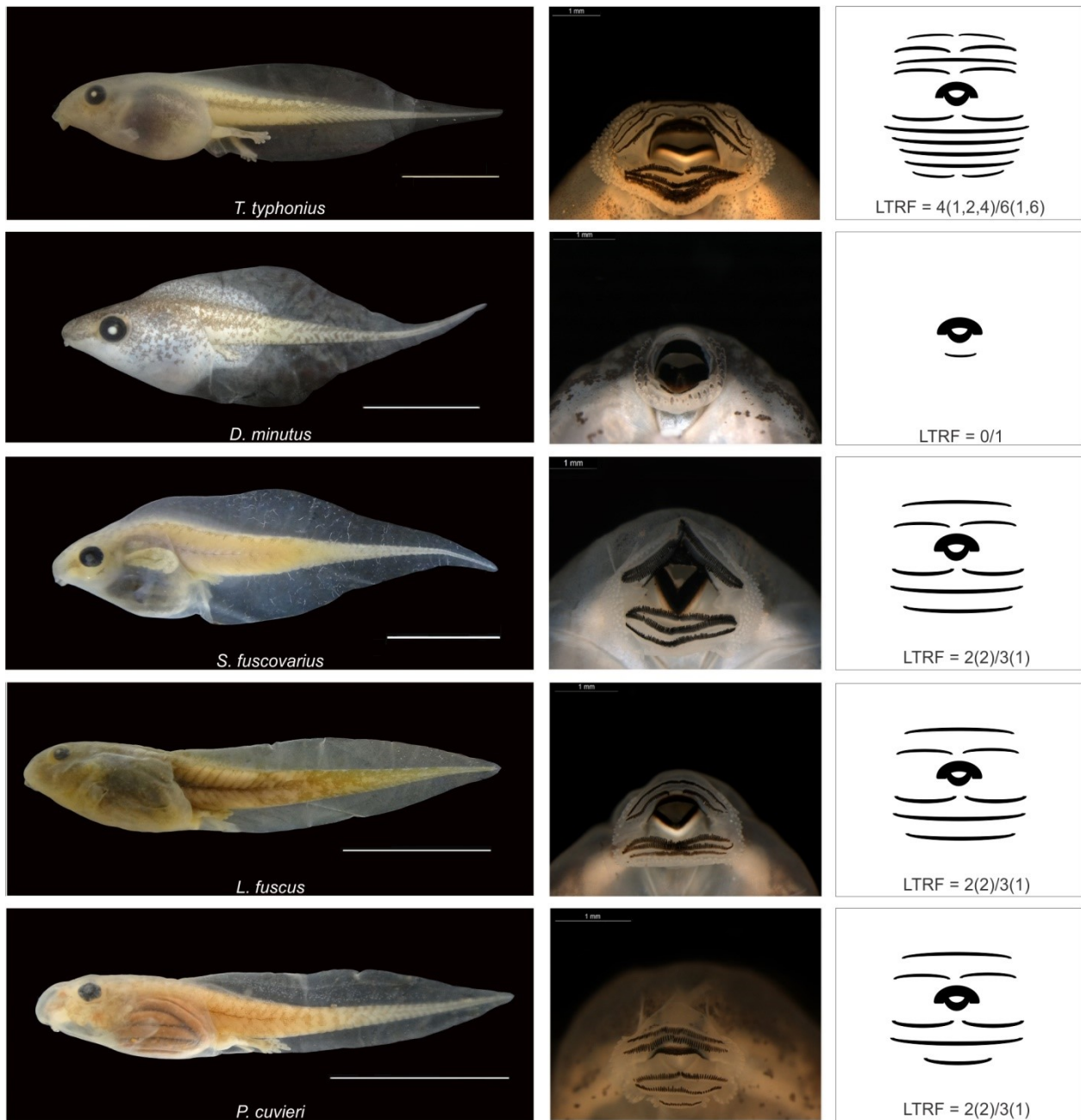


Fig. 1. The species tested in the study (left), the oral apparatus of tadpoles (center) and a schematic illustrating (right) of the tadpoles' keratinized structures base the labial tooth row formula (LTRF). Besides differences in LTRF (indicated in the figure), midwater tadpoles also differ in marginal papillae row configuration: *T. typhonius* with two marginal papillae rows; *D. minutus* with one ventral and two lateral marginal papillae rows; and *S. fuscovarius* with one marginal papillae row. Also, the oral disc of *D. minutus* tadpoles is terminal positioned. The oral morphology of bottom-dwelling tadpoles (*L. fuscus* and *P. cuvieri*) is similar to *S. fuscovarius*. However tadpoles of *P. cuvieri* have a more ventrally positioned oral disc and their third posterior tooth row is one third smaller than the other posterior tooth rows (in Rossa-Feres and Nomura, 2006). Photographs are on the same scale and were provided by K.O.R. Picheli.

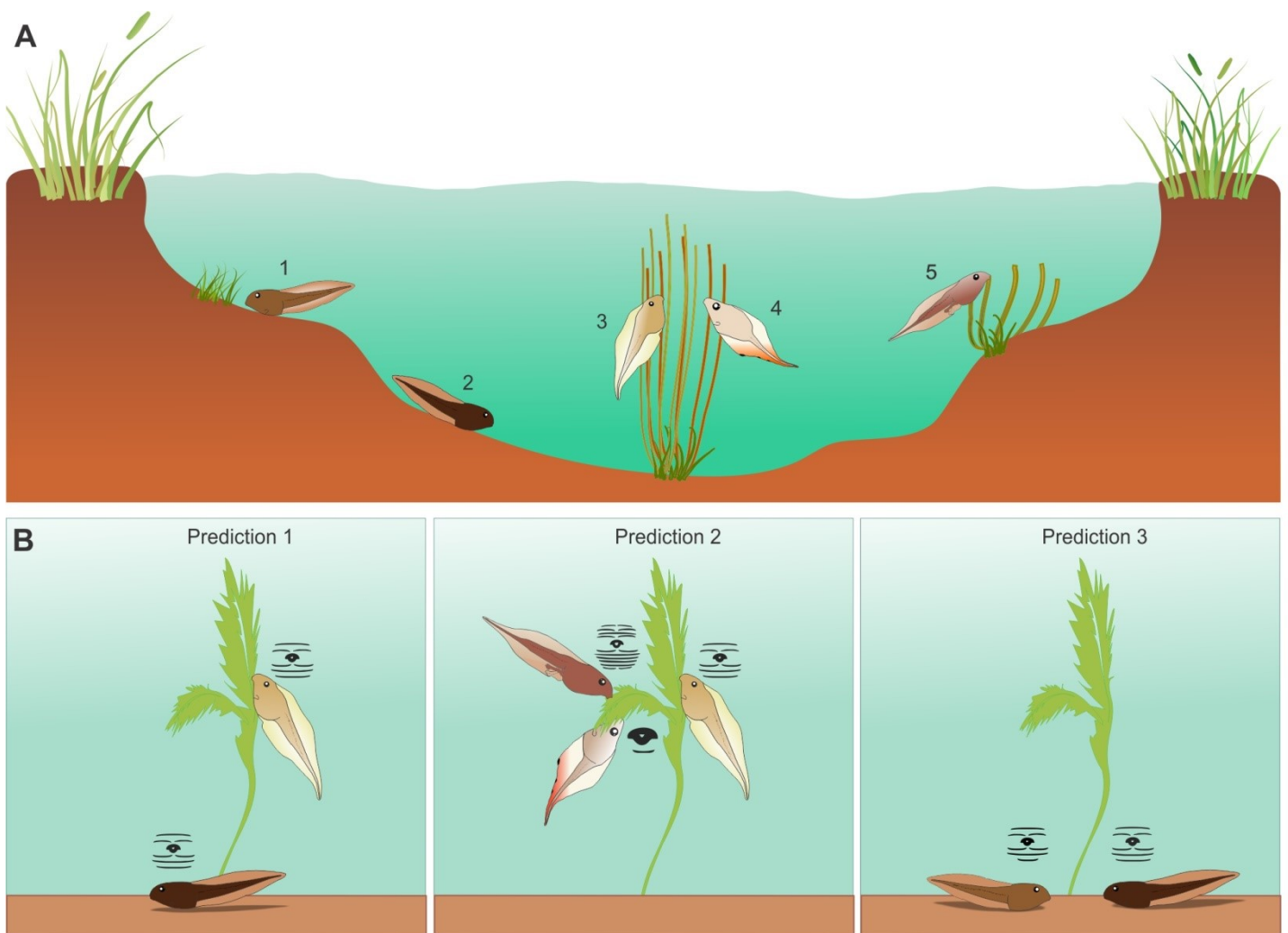


Fig. 2. Schematic drawing of the tadpoles' microhabitats. (A) The illustration (not drawn to scale) indicates where the tadpoles of the different species are usually found in natural ponds whether temporary or permanent. Tadpoles close to the bottom—*P. cuvieri* (1), which can also be found close to aquatic vegetation (Eterovick and Sazima, 2000) and *L. fuscus* (2). Tadpoles in the water column—*S. fuscovarius* (3), *D. minutus* (4) and *T. typhoni* (5). Tadpoles of the three species are generally found close to vegetation. Tadpoles of *T. typhoni* are also found in shallow water (Schulze et al. 2015). (B) Schematic for our predictions. From the left to the right, we expect (1) differences in feeding efficiency between species that inhabit different depths of the water column, with higher growth rates on horizontal surfaces for bottom-dwelling tadpoles, and on vertical surfaces for midwater tadpoles. We also expected (2) different foraging abilities depending on the angle where tadpoles forage, among species that inhabit the same microhabitat, but differ substantially in oral morphology. Next we expected (3) similar ability to remove food from substrates for species that inhabit the same microhabitat and have similar oral morphology, with higher growth rates when grazing on horizontal surfaces. Our predictions (B) were based on the microhabitats where the tadpoles occur naturally (A).

Sampling and experiment design

All tadpoles were collected from ponds in the northwest region of São Paulo state, Brazil (Fig. 3) between October 2015 and February 2016. Tadpoles were acclimatized in the laboratory in polyethylene aquaria for three days before the beginning of the experiments. During the acclimation period, we maintained tadpoles in

dechlorinated water, at a 12:12 light:dark photoperiod, with air temperature between 27°C and 28°C and at a water temperature of approximately 25.5°C. Tadpoles also received a powdered commercial algal based food that contains *Spirulina* and sea algal meal (Sera Micron®) *ad libitum*.



Fig. 3. Sampling area. The black dots represent the ponds where tadpoles were collected in each municipality (orange, yellow and green areas) of São Paulo state (highlighted in dark grey on the smaller map of Brazil). The cross on the São Paulo state map represents the northwest region where these municipalities are located. Credit: Alba Navarro Lozano.

Experiments were conducted under the same conditions of luminosity and temperature that the tadpoles experienced during acclimation. However, during the experiment, tadpoles were individually housed in glass aquaria (15 x 10 x 13 cm) with the containers' sides covered with a blue adhesive to prohibit visual contact between tadpoles in neighboring aquaria, and to reduce stress that other colors may cause (based

on fishes; Maia and Volpato, 2013). The aquaria were filled with dechlorinated water that was gently aerated.

We used tadpoles in similar developmental stage (26 – 29; Gosner, 1960) during the experiments because tadpoles in this period grow in size (trunk and tail), but do not have well developed limbs. Also during this period there is little differentiation of other anatomical structures, such as oral structures (McDiarmid & Altig 1999). Within species, we selected tadpoles of similar overall total length.

To standardize food availability, we followed the protocol used by Venesky et al. (2013). We diluted Sera Micron® in water at a concentration of 40 mg/ml⁻¹; then brushed the suspension on one side of a standard glass microscope slide (surface area 19.8 cm²). We repeated the brushing procedure three times for each slide, then allowed the slides to dry for 24 h. We fit the slides in plastic supports, which were then placed on a metal screen at the bottom of each aquaria—this allowed us to orient the slides with food at different angles. Specifically, we placed one slide with food at one of the following five treatment angles per aquarium: 0°, 45°, 90°, 135° and 180° (Fig. 4). We individually tested from 10 to 12 tadpoles of each species at each of the five angles (Table S1). The tadpoles remained in the aquaria for seven days during testing. The experiments were conducted using two species at a time which resulted in 110 different aquaria during a trial (55 aquaria for each species). During the experiments, the test aquaria were placed side by side in four lines and the order of treatments was randomized. We changed the microscope slides containing food twice per day in each test aquarium to assure food was readily available.

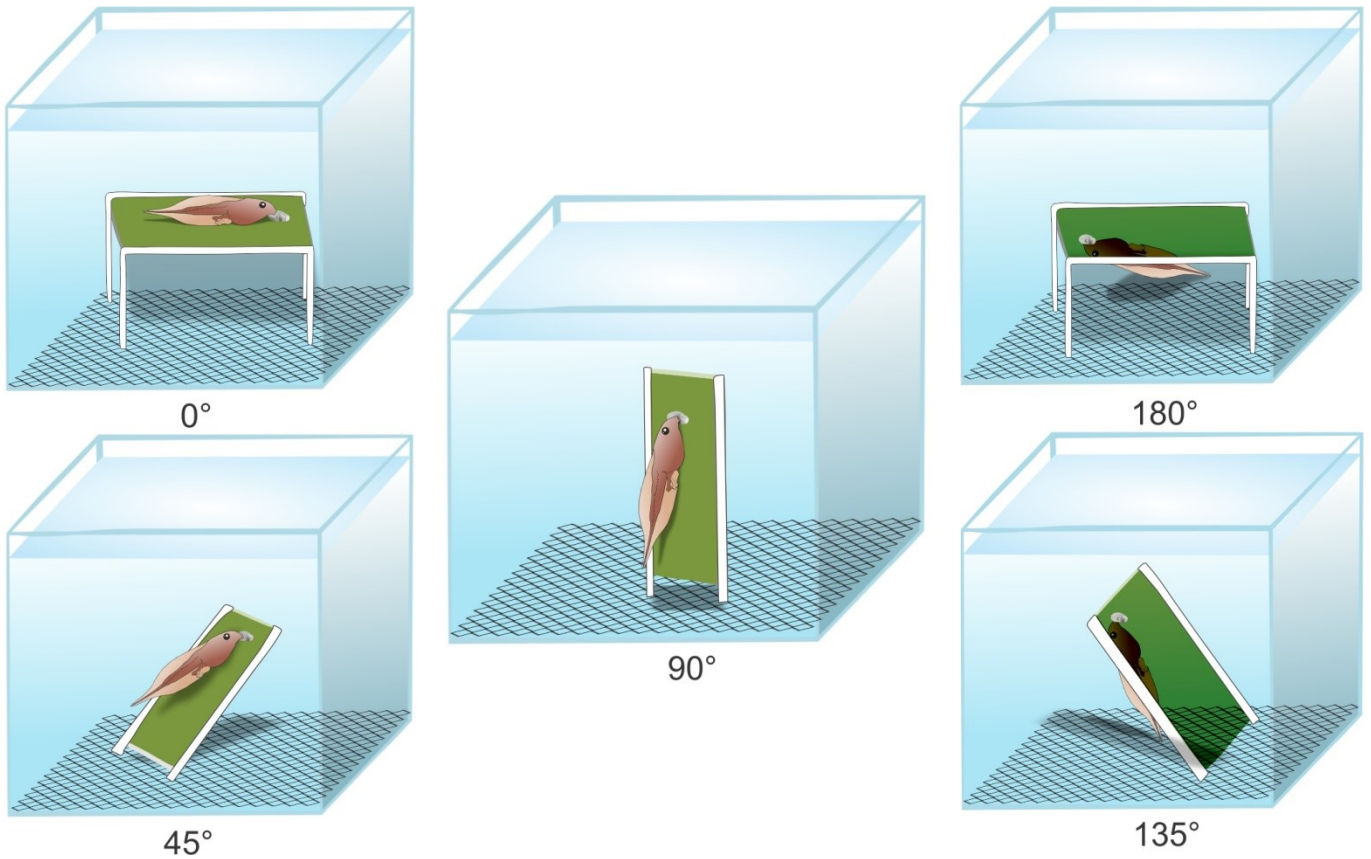


Fig. 4. Experiment design. Schematic drawing (not to scale) for tadpole feeding during the experiments. Each treatment is represented by one tadpole in a glass aquarium. The green bar represents the food on a microscope slide, oriented by the plastic supports (in white) on a metal screen at the bottom of the aquarium. The spot in the green bar represents the mark that tadpoles leave on the slide after removing food.

We used an analytical balance with readability of 0.1 mg to measure the tadpoles mass before and after the experiments. At the time they were weighed, we photographed each tadpole to estimate its length with ImageJ[®] software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). We used body length rather than total length to assess tadpole growth because tails, especially fins and flagella, could be easily injured. By taking measurements from photographs instead of directly from the tadpoles, we reduced the amount of time we handled tadpoles and kept them out of the water.

Mass and body length before and after the experiments were used to calculate (Eqn 1) the tadpole's relative growth (*RG*):

$$RG(x) = \frac{(X_{final} - X_{initial})}{X_{initial}}$$

where *X* represents either the mass or body length measurement (Table S1).

We estimated food consumption with pictures taken from each slide after tadpoles feed on them. Using the GIMP[®] software (<https://www.gimp.org/>), we overlaid the picture with a grid (2 x 2 mm²) and counted the number of squares filled and not filled with food to calculate the percentage of food consumption (consumption = not filled squares/total of squares).

Tadpoles gain mass directly by consuming food, but also experience energetic costs associated with searching for and removing food from the substrate. As such, we consider feeding efficiency as the growth rate (RG) of individuals, rather than food consumed, to account for differences in energetic costs of removing food from different substrate angles.

Ethics statement

We collected the tadpoles with approval from the Institute of Environment and Natural Renewable Resources (IBAMA) and Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio)—Authorization and Information System on Biodiversity (SISBio) permit number: 18163-1 to Denise de Cerqueira Rossa-Feres. Maintenance of tadpoles and the experiments were in accordance with the Ethics Commission on the Use of Animals (CEUA - 121/2015).

After the experiment, tadpoles were immersed in an anesthetic solution of 2% lidocaine. The tadpoles were then placed in a preservative solution made up of 70% ethanol and 15% formalin. This procedure was important to confirm species identification and also to make the tadpole specimens available for future studies. Preserved specimens were deposited in the Scientific Collection of Universidade Federal de Goiás (UFG).

Statistical analyses

We first tested whether species with similar oral configuration, but different microhabitat use, differ in efficiency when removing food from substrates at different orientations (Prediction 1, Fig. 2B). For this prediction, we used a two-way ANCOVA to test how relative body mass (response variable) was affected by treatment angle (predictor variable, five levels: 0°, 45°, 90°, 135° and 180°) and by species identity (predictor variable, two levels: *S. fuscovarius*—midwater, and *L. fuscus*—bottom-dwelling), using food consumption as the covariate. We also used a two-way ANOVA to test how relative body size (as the response variable) was affected by the same treatments (predictor variable, five levels—angle of substrates) and the same species (predictor variable, two levels) as factors.

We next tested whether species that usually occur at the same depth within the water column, but differ in oral morphology, vary in efficiency when grazing upon substrates at different orientations (Prediction 2, Fig. 2B). We used the same statistical model as above to test this prediction: two-way ANCOVA with relative body mass as the response variable, with angles (five levels: 0°, 45°, 90°, 135° and 180°) and species identity (three levels: *D. minutus*, *S. fuscovarius*, *T. typhoni*) as predictor variables and food consumption as the covariate. When relative size was the response variable, we used a two-way ANOVA with angles (five levels—same as before) and species (three levels—as before) as predictor variables.

Finally, we tested whether species that commonly occur in the same depth within the water column and present similar oral morphologies have similar efficiencies feeding at the same substrate orientations (Prediction 3, Fig. 2B). We used the same statistical model to test this prediction: two-way ANCOVA with relative body mass as the response variable, with angles (five levels: 0°, 45°, 90°, 135° and 180°) and species identity (two levels: *P. cuvieri*, *L. fuscus*) as predictor variables and food consumption

as the covariate. When relative size was the response variable, we used a two-way ANOVA with angles (five levels—same as above) and species (two levels—same as above) as predictor variables.

We considered the amount of food consumed as a covariate for relative mass only, once we confirmed that mass was a more direct correlate with food consumed than linear measurements of size (Leips and Travis, 1994; Álvarez and Nicieza, 2002).

When the analyses of variance and covariance identified significant effects of factors on the response variable, we used the *post hoc* Fisher's test (Least Significant Difference, LSD) to identify specific differences among groups. It was necessary to log transform the relative mass data of species tested in the first and second predictions in order to meet the assumptions of the analyses. We performed all analyses with R software (version 1.0.143, R Development Core Team, 2017).

RESULTS

Food consumption rate was a positive predictor of tadpole mass (all prediction tests: $p < 0.05$, Table 1). The substrate orientation influenced the feeding efficiency of tadpoles that have similar external oral morphology, but differ in where they are found within a pond. For example, tadpoles of *L. fuscus* and *S. fuscovarius* (benthic and nektonic, respectively) have similar oral morphology, but their relative mass gain depended on the substrate orientation. However, substrate orientation did not affect the relative mass gain of species that occur within the same microhabitat (e.g. bottom-dwelling tadpoles). Among tadpoles that differ in their oral morphology, but occur in the same microhabitat, we found a species by treatment interaction. This indicates that some species had similar growth rates regardless the orientation of substrates, but others were more efficient when feeding in specific orientations.

Table 1. Effect of the orientation of the substrate upon which tadpoles could graze (treatments) on growth rate (relative mass and body size) of species.

Species	Prediction	Response variable	Source	df	F	p
<i>S. fuscovarius</i> <i>L. fuscus</i>	1. Midwater and bottom-dwelling tadpoles	Relative mass*	Consumption rate	1	35.88	< 0.001
			Species	1	1.07	0.30
			Treatments	4	5.07	0.001
			Species*Treatments	4	0.46	0.75
			Residuals	83		
		Relative body size**	Species	1	0.74	0.39
			Treatments	4	3.06	0.02
			Species*Treatments	4	1.13	0.34
			Residuals	84		
			<i>S. fuscovarius</i> <i>T. typhonius</i> <i>D. minutus</i>	2. Midwater tadpoles	Relative mass*	Consumption rate
Species	2	308.43				< 0.001
Treatments	4	11.56				< 0.001
Species*Treatments	8	3.71				< 0.001
Residuals	132					
Relative body size**	Species	2			28.41	< 0.001
	Treatments	4			3.74	0.006
	Species*Treatments	8			1.13	0.34
	Residuals	133				
	<i>L. fuscus</i> <i>P. cuvieri</i>	3. Bottom-dwelling tadpoles			Relative mass*	Consumption rate
Species			1	12.60		< 0.001
Treatments			4	1.43		0.22
Species*Treatments			4	2.21		0.07
Residuals			95			
Relative body size**			Species	1	88.85	< 0.001
			Treatments	4	0.53	0.71

Species*Treatments	4	1.33	0.26
Residuals	96		

*ANCOVA two-way; **ANOVA two-way. df, degrees of freedom; F, F-ratio (observed F statistic value); p, probability value.

Bottom-dwelling vs midwater tadpoles with similar oral morphology

When comparing *L. fuscus* and *S. fuscovarius*, substrate orientation significantly affected tadpole relative mass ($F = 5.07$, $p = 0.001$). Neither species nor the interaction between species and treatment affected relative mass change (Table 1). Tadpoles of both species experienced the greatest change in mass when feeding on horizontal angles (i.e. 0° and 180° ; Fig. 5A). Specifically, tadpoles gained 30% more mass when feeding on substrates at 0° compared to tadpoles that fed on substrates at 135° (Fischer test, $p = 0.002$).

We found differences in tadpole's relative body length among substrate orientations ($F = 3.05$, $p = 0.02$, Fig. 5B, Table 1), but not between species (Table 1). Tadpoles feeding upon both substrates at 0° and 180° increased 7% more than tadpoles grazing on substrates at 45° (Fischer test, $p = 0.02$), 90° (Fischer test, $p = 0.01$) and 135° (Fischer test, $p = 0.04$).

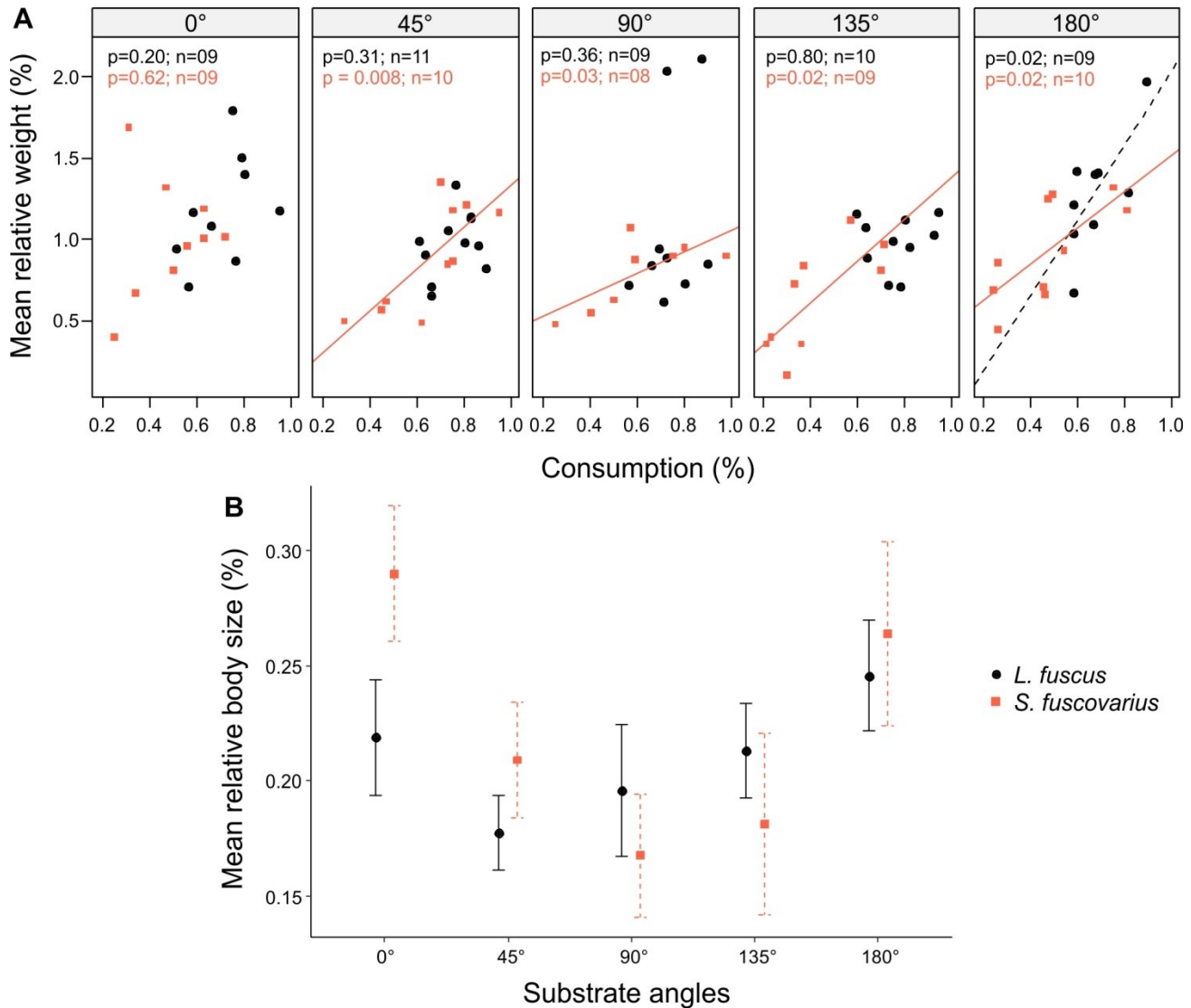


Fig. 5. Effect of substrate orientation on growth rate of bottom-dwelling (*L. fuscus*) and midwater (*S. fuscovarius*) tadpoles that have similar external oral morphology. The legend identifies the species for both graphs. (A) Relative mass vs percentage of food consumed by orientation of the substrates (two-way ANCOVA). Solid and dashed lines represent significant regression lines between relative mass and food consumption by treatment. The probability values (p) for this relationship and the number of tadpoles tested (n) are presented in respective colors to each species in the panels. Symbols (circles and squares) represent each individual. (B) Relative body size vs percentage of food consumed by orientation of the substrates (two-way ANOVA). Symbols represent mean values and bars indicate standard error. Species had similar growth rates (A, B, $p > 0.05$), but performed better feeding on horizontal substrates (A, B, $p < 0.05$).

Similar microhabitat (midwater) but different oral morphology

The interaction between substrate angles and species significantly accounted for the variation in tadpoles' mass ($F = 3.71$, $p < 0.001$, Fig. 6A, Table 1). Tadpoles of *T. typhonius* and *S. fuscovarius* did not differ in their relative mass feeding on substrates at all the angles tested. Tadpoles of *D. minutus* had the poorest performance when grazing on substrates at 45° (i.e. half the mass of tadpoles feeding at horizontal angles, Table

S1). These tadpoles, which have the simplest oral disc, gained more mass than the other two species.

When we analyzed the relative lengths of tadpoles, we found variation among species ($F = 28.41$, $p < 0.001$, Fig. 6B, Table 1) and among treatments ($F = 3.74$, $p = 0.006$), but not their interaction. Among species, tadpoles of *D. minutus* had the least increase in size compared to *T. typhoni* (Fischer test, $p < 0.001$) and *S. fuscovarius* tadpoles (Fischer test, $p < 0.001$). We did not find differences in relative growth between *T. typhoni* and *S. fuscovarius* (Fischer test, $p = 0.84$). Among orientations, tadpoles feeding at 0° increased 8% more than those at 90° (Fischer test, $p < 0.001$) and 5% more than those at 135° (Fischer test, $p = 0.03$). Also tadpoles feeding at 180° increased 6% more than tadpoles feeding at 90° (Fischer test, $p = 0.006$).

Due to this intriguing result for *D. minutus* (i.e. the highest mass gain and the lowest body growth among species), we investigated whether the low increase in body size was compensated for by an increase in tail lengths (using Eqn1). We only used tail measurements from individuals whose tail was not folded behind their body in the pictures; ($n = 43$). Indeed, we verified that their tails increased around 30% in length and was 20% greater than the increase in body size.

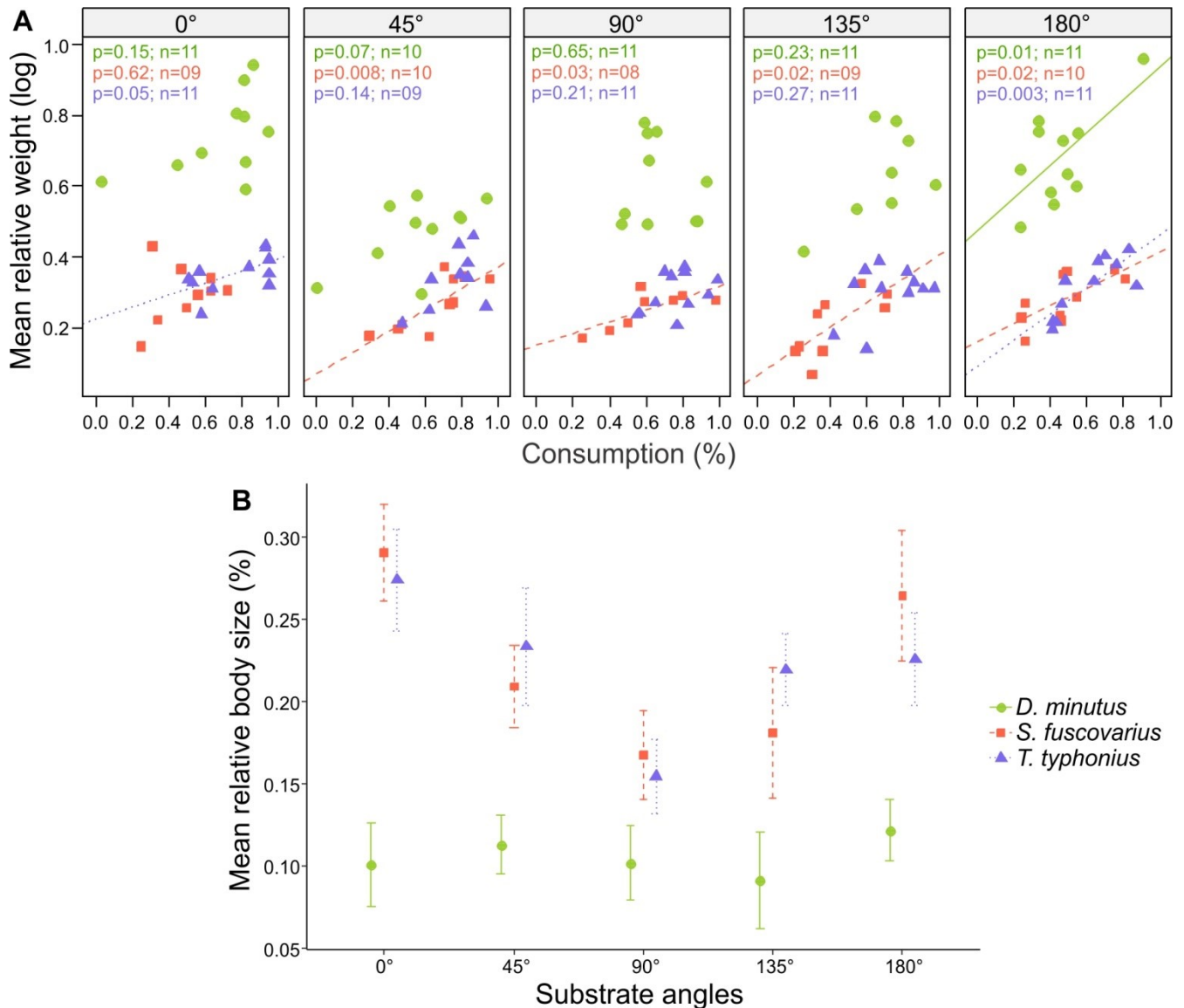


Fig. 6. Effect of substrate orientation on growth rate of midwater tadpoles with different oral configurations. The legend for species applies to both graphs. (A) Relative mass vs percentage of food consumed by substrate angles (two-way ANCOVA). Solid and dashed lines represent significant regression lines between relative mass and food consumption by treatment. The probability values (p) of this relationship and the number of tadpoles tested (n) are presented in respective colors to each species in the panels. Symbols (circles, triangles and squares) represent each individual. (B) Relative size vs percentage of food consumed by orientation of the surfaces (two-way ANOVA). Symbols represent mean values and bars indicate standard error. The orientation of the substrates affects not only the ability of tadpoles to feed, but also their growth rates. Note that some species were more specialists and had higher growth rates depending on the substrate orientation. Tadpoles of *D. minutus* were generalists and presented a higher increase in relative mass despite the angle of substrate (A, interaction effect between species and substrate orientations, two-way ANCOVA, $p < 0.001$). However, this species had the least increase in body size (but a high increase in tail length).

Similar microhabitat (bottom) and oral morphology

The relative mass gained by bottom-dwelling tadpoles with similar oral morphology showed no effect of treatments ($F = 1.43$, $p = 0.22$, Fig. 7A, Table 1).

Between species, tadpoles of *L. fuscus* doubled their mass, while the mass gain for

tadpoles of *P. cuvieri* was only half that of *L. fuscus* tadpoles ($F = 12.60$, $p < 0.001$, Table S1).

Also, treatments had no effect on tadpole's relative body size ($F = 0.53$, $p = 0.71$), but tadpoles of *L. fuscus* increased 10% than those of *P. cuvieri* ($F = 88.84$, $p < 0.01$, Fig. 7B, Table 1).

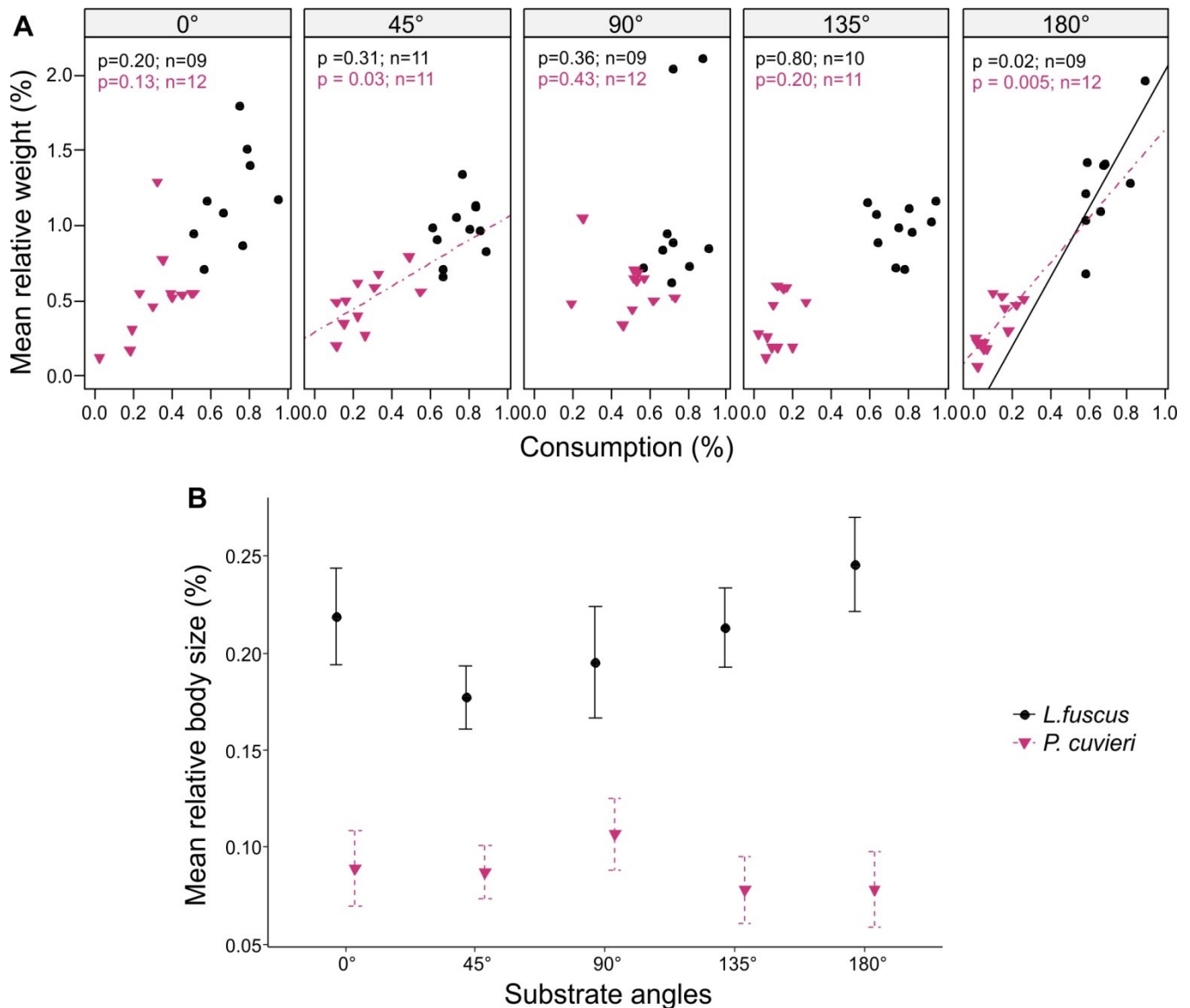


Fig. 7. Effect of substrate orientation on growth rate for bottom-dwelling tadpoles with similar oral configuration. The legend for species applies to both graphs. (A) Relative mass vs percentage of food consumed by treatment. Solid and dashed lines represent significant regression lines. Symbols (circles and inverted triangles) represent each individual. Probability values (p) of the relationship between relative mass and consumption and the number of tadpoles tested (n) are presented in respective colors to each species. (B) Relative size vs percentage of food consumed by substrate angles (two-way ANOVA). Symbols represent mean values and bars indicate standard error. Species were equally capable of exploring substrates at the same orientations (A, B, $p > 0.05$), with differences in growth rate only between species (A, B, $p < 0.001$).

Other behavioral observations

Tadpoles moved their tails much less frequently when feeding at the angles of 0° and 180°, floating while grazing. In contrast, at 45°, 90° and 135° tadpoles swam up and down while grazing.

DISCUSSION

Theory suggests that morphologically similar species who use the same resources have the highest competitive potential (MacArthur and Levins 1967) and may fail to coexist (Gause 1934). Among tadpoles, competition for nutritional resources has controversially been considered weak (e.g. Heyer 1976) or of secondary importance in natural settings (Skelly and Kiesecker, 2001; Schiesari et al., 2009). That is because of a general perception that tadpoles are not particularly selective in terms of when and where they acquire food, feeding in a rather continuously and non-discriminatory fashion on the most available resources (Lajmanovich 2000). This perception is endorsed by the fact that despite diversity in oral morphology, much of what is found in tadpole alimentary tracts are the same common and abundant food items (Rossa-Feres et al., 2004). This suggests that food is not below a limiting threshold to force competition (Heyer 1976).

There is evidence, however, that tadpoles can select and compete for resources based on the nutritional properties of the food and/or by the characteristics of the substrates where they graze (e.g. Kupferberg, 1997; Pfennig et al., 2007; Ramamonjisoa et al., 2017). In our study we provide new insights on niche partitioning among tadpoles as we show that the orientation of substrates can affect tadpole's growth rates. Regardless of whether food type is a limiting resource for tadpoles or not, the physical properties of the substrates where they forage can be. Although we used an experimental approach to control for the substrate orientation, food can be found on the

surfaces of macrophytes, rocks, or even suspended in the water column and thus oriented in all sorts of directions. Our data indicate that tadpoles may thus partition the habitat in terms of the surface orientations upon which they most efficiently graze.

Overall, all tadpoles were able to feed and grow on substrates at all orientations, however some species (e.g. *T. typhoni* and *S. fuscovarius*) showed the best feeding efficiencies when foraging on horizontal substrates (i.e. at the angles of 0° and 180°). Although we did not measure any functional morphological traits, it is plausible that tadpoles of these species can make kinematic adjustments of their oral apparatus at these substrate angles to provide the best contact with the substrate (McDiarmid & Altig 1999). Furthermore tadpoles appear to be able to feed at these angles with little active swimming, because they exhibited little tail movement while grazing. The size of their lungs and the adjustment of their center of buoyancy may provide more stability and reduce energy costs (Alexander 1966), influencing tadpoles' efforts to get the optimal position for grazing. In contrast, tadpoles had lower growth rates when feeding on substrates at 45°, 90°, and 135°. In these treatments, tadpoles swam more while grazing. The lower growth rates may thus reflect an increased energetic cost for tadpoles feeding at these angles and not kinematic adjustments.

Bottom-dwelling vs midwater tadpoles with similar oral morphology

Body shape commonly reflect tadpoles' preferred microhabitat (Marques and Nomura, 2015; Queiroz et al., 2015), but this may not correlate closely with the substrate orientations upon which tadpoles feed most efficiently. Tadpoles of *S. fuscovarius* are usually found close to leaves and aquatic plants in midwater (Schulze et al. 2015). Yet, contrary to our prediction, they exhibited the least efficiency on substrates positioned at 90° angle. In fact, bottom-dwelling and midwater tadpoles had

similar growth rates when feeding on horizontal substrates (similar relative mass at 0° and relative body size at 0° and 180°). In contrast, tadpoles of *L. fuscus* have higher feeding efficiencies grazing at all the substrate orientations—tadpoles doubled mass at all the angles tested. This reflects a large niche breadth in terms of orientation of substrates.

These species differ in overall external morphology, but have similar oral morphology. Besides, their oral discs are in the anteroventral position (Rossa-Feres & Nomura 2006). This suggests that the tadpoles' overall morphology is of secondary importance in influencing their ability to feed at different orientations. Differences in external body morphologies may be important in helping the larvae to orient to surfaces upon which they graze—specifically maintaining an optimal body position while grazing. Body shape may also reflect adaptations to factors other than feeding behavior. For example, midwater tadpoles usually have deep tails with high fins and a flagellum at the tip. This design may aid maneuverability for the tadpole when under predator attack (Wassersug 1989).

Similar microhabitat (midwater) but different oral morphology

We found statistically significant differences in feeding efficiency among tadpoles that live in the same microhabitat but have different oral morphology when allowed to graze on substrates at different orientations. This suggests that interspecific variation in mouthparts influences the ability of tadpoles of different species to forage, depending on characteristics of the physical habitat. This in turn, reflects niche partitioning among species.

Tadpoles of *T. typhoni* and *S. fuscovarius* were equally able to gain mass feeding at all orientations of substrates, but they had higher body lengths in specific

angles. In particular, the increase in body size of both species was higher for tadpoles feeding on horizontal surfaces and for tadpoles of *T. typhoni* on substrates at 45°. This indicates that these tadpoles can be more restricted in their microhabitats, feeding preferentially on surfaces where they benefit both by gaining mass and growing more. Tadpoles of *D. minutus*, which have the simplest oral morphology, were more generalists in terms of their effectiveness in graze on substrates at different orientations, with similar growth rates at all angles of substrates (despite reduced relative mass gain at 45°). These tadpoles achieved higher relative mass than the other species, but, inversely, had smaller body lengths. That was compensated for by greater investment in tail growth, which was greater than body growth. Thus, tadpoles of *D. minutus* differed from the other midwater species in their strategy to invest in growth of different parts of their body.

Although these species co-occur in close proximity to each other in ponds (Prado et al., 2009), they can forage for the same nutritional resources in functionally different ways (e.g. Rupp and Hulse, 2014). As such, our results challenge the presumption that competition is low for tadpoles (Heyer 1976). Even if tadpoles do not partition the environment in terms of what they ingest, our data demonstrate that they may differ in terms of where they can most effectively acquire food and grow well. When tadpoles explore the same alimentary resources, variation in performance is the most likely factor to producing shifts in the microhabitats used by tadpoles for foraging and consequently their feeding niche (e.g. Pfennig and Murphy, 2002; Pfennig et al., 2007). Contrary to Heyer (1976) then, we suggest that competition may be a factor driving the evolution of diversity in tadpole mouthparts and thus lead to species segregation among anuran larvae.

Similar microhabitat (bottom) and oral morphology

As the bottom-dwelling species that we examined are morphologically similar in body shape and oral morphology, we predicted that tadpoles would be equally efficient in feeding on the variously oriented substrates. This was corroborated. Both species (*P. cuvieri* and *L. fuscus*) were grazing generalists in terms of the orientations of substrates. This ability to graze and grow successfully upon substrates despite their orientation might represent an additional and important factor for these tadpoles to survive in a variety of habitats where they are found. These habitats include marginal areas of deep water ponds, shallow ponds (Queiroz et al. 2015, Schulze et al. 2015) and even in puddles close to streams (e.g. *P. cuvieri* in 1cm-deep puddles, Eterovick and Sazima, 2000; and in the very shallow margins of rivulets, D. C. Rossa-Feres, unpublished observation).

We did observe some differences in feeding efficiency between the tadpoles of *L. fuscus* and those of *P. cuvieri*. Tadpoles of *L. fuscus* consumed more food and also had higher growth rates than the *P. cuvieri* larvae. Possibly other factors contribute to differences in feeding efficiency between these species, such as behavior—e.g. levels of activity can have a straightforward relationship with consumption of food (Anholt & Werner 1995). Other variables might also be important for these species in defining their preferred feeding niche (e.g. vegetation, Waringer-Löschenkohl, 1988; pH, Devi et al., 2016; ontogeny, Glos et al., 2017).

Conclusions and future directions

In our study, tadpoles were able to feed on substrates at all angles tested, however, with different efficiency. Differences in feeding efficiency and morphological specializations can play an important role in nutritional acquisition in structurally

complex environments (Higham 2007). Morphological variation in the tadpole oral apparatus can be key to their feeding efficiency. The differences that we found in the tadpoles' feeding performance when foraging on substrates at different angles may thus be an important aspect of niche partitioning for the species.

In summary, this study advances our understanding of the ecology of neotropical tadpoles, which are poorly studied despite their high taxonomic diversity (especially in Brazil; Rossa-Feres et al., 2015). Our experiments demonstrate that the orientation of substrates influences tadpoles feeding efficiency, which is fundamental for tadpole survival. Whereas some species (e.g. bottom-dwelling tadpoles and larvae of *D. minutus*) are more generalists in terms of the orientation of the substrate upon which they feed efficiently, other species are more specialists and perform better feeding on substrates at specific orientations. This indicates that species are not only segregated by preferred position in the water column (e.g. bottom/midwater/surface), but also by the orientation of substrates upon which they graze.

We suggest that competition has been underappreciated in studies with anuran larvae. Even if food type is not a limiting resource for tadpoles, their efficiency to capture food depends on physical properties of substrates, as we have demonstrated with orientations of surfaces in our experiments. Competition can be reduced for tadpoles by using different portions of the same substrate (e.g. the stems *versus* the underside of a leaf) and at the same depth of the water column. Thus, tadpoles may partition aquatic habitats more than previously presumed—e.g. not only in terms of their depths in the water column, but also due to the orientations of substrates upon which they feed.

In our study we were not able to elucidate intrinsic differences in nutrient assimilation among the species. Together with how much food the larvae are able to

remove from the substrates and ingest, nutrient assimilation may influence their growth rates. Such basic data about tadpoles' biology would fill major gaps in our knowledge of anuran larval ecology and evolution. Similarly, kinematic data on how tadpoles position their oral disc, body and tail while grazing on different substrates would further advance our understanding of what behavioral factors influence tadpole feeding efficiency. Future studies should test more species and explore other physical properties of the microhabitat that may be relevant to tadpole resource partitioning. These could include, for example, time of day, surface stiffness, and surface roughness. Such research would greatly advance our understanding of how tadpoles of different species coexist.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Prof. Dr. Luiz H. Florindo for supporting this study with equipment and infrastructure and for his indispensable ideas and discussions. We thank Katiuce O. R. Picheli for providing the beautiful photographs of tadpoles and Alba Navarro Lozano for producing the map where we collected tadpoles. We also thank friends from LET – Laboratório de Ecologia Teórica/UNESP São José do Rio Preto for their valuable help during the experiments.

REFERENCES

- ALEXANDER, R.M. 1966. Physical aspects of swimbladder function. *Biol. Rev.* 41(1):141–176.
- ALFORD, R.A. 1986. Habitat use and positional behavior of anuran larvae in a northern florida temporary pond. *Copeia* 1986(2):408–423.
- ALTIG, R. 2006. Discussions of the origin and evolution of the oral apparatus of anuran tadpoles. *Acta Herpetol.* 1(2):95–105.
- ALTIG, R. 2007. A primer for the morphology of anuran tadpoles. *Herpetol. Conserv. Biol.* 2(1):71–74.
- ALTIG, R. & JOHNSTON, G.F. 1989. Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies, and habitats. *Herpetol. Monogr.* 3(1989):81–109.
- ÁLVAREZ, D. & NICIEZA, A.G. 2002. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Funct. Ecol.* 16(5):640–648.
- ANHOLT, B.R. & WERNER, E.E. 1995. Interaction between food availability and predation mortality mediated by adaptive behavior. *Ecology* 76(7):2230–2234.
- BEGON, M., TOWNSEND, C.R. & HARPER, J.L. 2006. *Ecology: from Individuals to Ecosystems*. 4th ed. Blackwell Publishing, Malden, USA.
- DARWIN, C. 1859. *On the Origin of Species*. John Murray, London, UK.
- DEVI, L.M., THABAH, C.M., HOOROO, R.N.K. & DEY, S. 2016. Morphological and microstructural changes of the oral apparatus in two anuran tadpoles, in regard to pH. *Micron* 8241–51.
- DOS SANTOS, T.G., ROSSA-FERES, D.C. & CASATTI, L. 2007. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. *Iheringia. Série Zool.* 97(1):37–49.
- ETEROVICK, P.C. & SAZIMA, I. 2000. Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: effects of seasonality, habitat, and predation. *Amphibia-Reptilia* 21439–461.
- GAUSE, G.F. 1934. *The Struggle for Existence*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- GLOS, J., WOLTER, J., STRUCK, U. & RÖDEL, M.-O. 2017. Ecological shifts during larval development in two West African savanna frogs. *J. Trop. Ecol.* 33(01):50–59.
- GOSNER, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16(3):183–190.
- HEYER, W.R. 1976. Studies in larval amphibian habitat partitioning. *Smithson. Contrib. to Zool.* 2421–27.
- HIGHAM, T.E. 2007. The integration of locomotion and prey capture in vertebrates: Morphology, behavior, and performance. *Integr. Comp. Biol.* 47(1):82–95.
- HIGHAM, T.E. & JAYNE, B.C. 2004. Locomotion of lizards on inclines and perches: hindlimb kinematics of an arboreal specialist and a terrestrial generalist. *J. Exp. Biol.* 207(Pt 2):233–248.
- IRSCHICK, D.J., AUSTIN, C.C., PETREN, K., FISHER, R.N., LOSOS, J.B. & ELLERS, O. 1996. A comparative analysis of clinging ability among pad-bearing lizards. *Biol. J. Linn. Soc.* 59(1):21–35.
- KUPFERBERG, S. 1997. Facilitation of periphyton production by tadpole grazing: functional differences between species. *Freshw. Biol.* 37(2):427–439.
- LAJMANOVICH, R.C. 2000. Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia* 25(2):71–79.

- LEIPS, J. & TRAVIS, J. 1994. Metamorphic responses to changing food levels in two species of Hylid frogs. *Ecology* 75(5):1345–1356.
- MACARTHUR, R. & LEVINS, R. 1967. The limiting similarity convergence, and divergence of coexisting species. *Am. Nat.* 101(921):377–385.
- MACARTHUR, R.H. 1958. Population ecology of some warblers of northeastern coniferous forests. *Ecology* 39(4):599–619.
- MAIA, C.M. & VOLPATO, G.L. 2013. Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. *Zoology* 116(1):64–66.
- MARQUES, N.S. & NOMURA, F. 2015. Where to live? How morphology and evolutionary history predict microhabitat choice by tropical tadpoles. *Biotropica* 47(2):227–235.
- MCDIARMID, R.W. & ALTIG, R. 1999. Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- ORTON, G.L. 1953. The systematics of vertebrate larvae. *Syst. Zool.* 2(2):63–75.
- PFENNIG, D.W., RICE, A.M. & MARTIN, R.A. 2007. Field and experimental evidence for competition's role in phenotypic divergence. *Evolution* (N. Y). 61(2):257–271.
- PRADO, V.H.M., FONSECA, M.G., DE ALMEIDA, F.V.R., NECCHI, O. & ROSSA-FERES, D.C. 2009. Niche occupancy and the relative role of micro-habitat and diet in resource partitioning among pond dwelling tadpoles. *South Am. J. Herpetol.* 4(3):275–285.
- QUEIROZ, C. de S., DA SILVA, F.R. & ROSSA-FERES, D.C. 2015. The relationship between pond habitat depth and functional tadpole diversity in an agricultural landscape. *R. Soc. Open Sci.* 2150165.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RAMAMONJISOA, N., RAKOTONOELY, H. & NATUHARA, Y. 2017. Food preference in relation to resource toughness and protein level in a pond dwelling tadpole. *J. Herpetol.* 51(1):47–51.
- ROSSA-FERES, D.C., JIM, J. & FONSECA, M.G. 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Rev. Bras. Zool.* 21(4):745–754.
- ROSSA-FERES, D.C. & NOMURA, F. 2006. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Biota Neotrop.* 6(1):.
- ROSSA-FERES, D.C., VENESKY, M.D., NOMURA, F., ETEROVICK, P.C., VERA CANDIOTI, M.F., MENIN, M., JUNCÁ, F.A., SCHIESARI, L.C., HADDAD, C.F.B., GAREY, M.V., DOS ANJOS, L.A. & WASSERSUG, R.J. 2015. Taking tadpole biology into the 21st century: a consensus paper from the First Tadpoles International Workshop. *Herpetol. Brasileira* 4(2):48–59.
- RUPP, M.F. & HULSEY, C.D. 2014. Influence of substrate orientation on feeding kinematics and performance of algae-grazing Lake Malawi cichlid fishes. *J. Exp. Biol.* 2173057–3066.
- SCHIESARI, L., WERNER, E.E. & KLING, G.W. 2009. Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: Implications for food web and experimental ecology. *Freshw. Biol.* 54(3):572–586.
- SCHULZE, A., JANSEN, M. & KOÖHLER, G. 2015. Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: Molecular identification, morphological characterisation, and ecological assignment.

- SEALE, D.B., HOFF, K. & WASSERSUG, R. 1982. *Xenopus laevis* larvae (Amphibia, Anura) as model suspension feeders. *Hydrobiologia* 87(2):161–169.
- SEALE, D.B. & WASSERSUG, R.J. 1979. Suspension feeding dynamics of anuran larvae related to their functional morphology. *Oecologia (Berl.)* 39:259–272.
- SHAFFER, H.B. & LAUDER, G. V. 1985. Patterns of variation in aquatic Ambystomatid salamanders: Kinematics of the feeding mechanism. *Evolution (N. Y.)* 39(1):83–92.
- SKELLY, D.K. & KIESECKER, J.M. 2001. Venue and outcome in ecological experiments: manipulations of larval anurans. *Oikos* 94(1):198–208.
- STARRETT, P.H. 1973. Evolutionary patterns in larval morphology. In *Evolutionary Biology of the Anurans* (J. L. Vial, ed.) University of Missouri Press, Columbia, USA, p.251–271.
- VASCONCELOS, T. da S. & ROSSA-FERES, D.C. 2005. Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (Amphibia, Anura) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotrop.* 5(2):1–14.
- VASCONCELOS, T. da S., DOS SANTOS, T.G., ROSSA-FERES, D.C. & HADDAD, C.F.B. 2011. Spatial and temporal distribution of tadpole assemblages (Amphibia, Anura) in a seasonal dry tropical forest of southeastern Brazil. *Hydrobiologia* 673(1):93–104.
- VENESKY, M.D., ROSSA-FERES, D.C., NOMURA, F., ANDRADE, G.V. de, PEZZUTI, T.L., DE SOUSA, V.T.T., ANDERSON, C. V. & WASSERSUG, R.J. 2013. Comparative feeding kinematics of tropical hylid tadpoles. *J. Exp. Biol.* 216:1928–1937.
- VERA CANDIOTI, M.F. 2007. Anatomy of anuran tadpoles from lentic water bodies: systematic relevance and correlation with feeding habits. *Zootaxa* 1–175.
- WARINGER-LÖSCHENKOHL, A. 1988. An experimental study of microhabitat selection and microhabitat shifts in european tadpoles. *Amphibia-Reptilia* 9:219–236.
- WASSERSUG, R.J. 1989. Locomotion in amphibian larvae (Or “Why aren’t tadpoles built like fishes?”). *Am. Zool.* 29(1):65–84.
- WASSERSUG, R.J. & YAMASHITA, M. 2001. Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 131:183–195.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table 1. Mean $\pm$ standard deviation (s.d.) of measurements, relative and absolute growth of species.

Species	Treatment	n	Measurements				Relative (%)		Absolute	
			Body size (mm)		Mass (mg)		Body size	Mass	Body size (mm)	Mass (mg)
			Initial	Final	Initial	Final	Mean $\pm$ s.d.	Mean $\pm$ s.d.	Mean $\pm$ s.d.	Mean $\pm$ s.d.
<i>T. typhoni</i>	0°	11	12.03 $\pm$ 0.63	15.31 $\pm$ 1.15	286.76 $\pm$ 40.51	644.89 $\pm$ 88.85	0.27 $\pm$ 0.10	1.26 $\pm$ 0.28	3.30 $\pm$ 1.20	358.10 $\pm$ 74.30
	45°	9	12.24 $\pm$ 1.03	15.06 $\pm$ 1.23	276.61 $\pm$ 52.05	601.58 $\pm$ 111.27	0.23 $\pm$ 0.10	1.20 $\pm$ 0.42	2.80 $\pm$ 1.20	324.90 $\pm$ 93.50
	90°	11	12.30 $\pm$ 1.12	14.16 $\pm$ 0.97	284.89 $\pm$ 63.06	565.10 $\pm$ 110.62	0.15 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.26	1.90 $\pm$ 0.80	280.20 $\pm$ 70.60
	135°	11	11.84 $\pm$ 1.03	14.38 $\pm$ 0.77	268.82 $\pm$ 54.32	534.76 $\pm$ 87.19	0.21 $\pm$ 0.07	1.02 $\pm$ 0.32	2.50 $\pm$ 0.70	265.90 $\pm$ 76.20
	180°	11	11.99 $\pm$ 0.57	14.68 $\pm$ 1.29	268.99 $\pm$ 43.23	564.85 $\pm$ 130.58	0.22 $\pm$ 0.09	1.09 $\pm$ 0.38	2.70 $\pm$ 1.10	295.90 $\pm$ 106.40
			12.08 $\pm$ 0.88	14.72 $\pm$ 1.08	277.21 $\pm$ 50.63	582.24 $\pm$ 105.70	0.22 $\pm$ 0.09	1.11 $\pm$ 0.33	2.60 $\pm$ 1.00	305.00 $\pm$ 84.20
<i>D. minutus</i>	0°	11	10.77 $\pm$ 0.96	11.80 $\pm$ 0.69	64.65 $\pm$ 11.73	356.03 $\pm$ 45.14	0.10 $\pm$ 0.08	4.75 $\pm$ 1.64	1.00 $\pm$ 0.70	291.30 $\pm$ 51.20
	45°	10	10.09 $\pm$ 0.77	11.22 $\pm$ 1.08	89.39 $\pm$ 14.81	268.90 $\pm$ 68.43	0.11 $\pm$ 0.05	2.03 $\pm$ 0.62	1.10 $\pm$ 0.60	179.50 $\pm$ 62.10
	90°	11	10.31 $\pm$ 1.11	11.35 $\pm$ 1.22	70.88 $\pm$ 17.08	287.67 $\pm$ 61.30	0.10 $\pm$ 0.07	3.22 $\pm$ 1.21	1.00 $\pm$ 0.70	216.80 $\pm$ 57.80
	135°	11	11.05 $\pm$ 0.82	12.06 $\pm$ 0.99	73.90 $\pm$ 14.50	320.15 $\pm$ 64.49	0.09 $\pm$ 0.08	3.48 $\pm$ 1.33	1.00 $\pm$ 0.80	246.20 $\pm$ 65.50
	180°	11	10.16 $\pm$ 0.96	11.37 $\pm$ 0.94	61.68 $\pm$ 17.17	293.06 $\pm$ 66.84	0.12 $\pm$ 0.06	4.02 $\pm$ 1.68	1.20 $\pm$ 0.60	231.40 $\pm$ 65.40
			10.48 $\pm$ 0.92	11.56 $\pm$ 0.98	72.10 $\pm$ 15.06	305.16 $\pm$ 61.24	0.10 $\pm$ 0.07	3.50 $\pm$ 1.30	1.00 $\pm$ 0.70	233.00 $\pm$ 60.40
	0°	9	7.71 $\pm$ 0.61	9.93 $\pm$ 0.80	124.83 $\pm$ 37.93	241.63 $\pm$ 41.12	0.29 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.37	2.20 $\pm$ 0.60	116.80 $\pm$ 28.70
	45°	10	8.56 $\pm$ 0.51	10.35 $\pm$ 0.90	162.94 $\pm$ 28.57	308.00 $\pm$ 79.81	0.20 $\pm$ 0.07	0.88 $\pm$ 0.32	1.80 $\pm$ 0.70	145.00 $\pm$ 61.10

<i>S. fuscovarius</i>	90°	8	8.73 ± 0.63	10.20 ± 0.99	149.39 ± 38.57	270.63 ± 86.79	0.16 ± 0.07	0.79 ± 0.21	1.40 ± 0.70	121.20 ± 51.40
	135°	9	8.07 ± 0.52	9.53 ± 1.05	139.03 ± 20.32	228.04 ± 58.05	0.18 ± 0.11	0.64 ± 0.32	1.40 ± 0.90	89.00 ± 48.80
	180°	10	7.56 ± 0.53	9.53 ± 0.82	115.71 ± 11.99	224.02 ± 45.92	0.26 ± 0.12	0.93 ± 0.30	1.90 ± 0.90	108.30 ± 39.90
			8.13 ± 0.56	9.91 ± 0.91	138.38 ± 27.48	254.46 ± 62.34	0.22 ± 0.09	0.85 ± 0.30	1.70 ± 0.70	116.00 ± 45.90
<i>L. fuscus</i>	0°	9	9.37 ± 0.53	11.41 ± 0.63	134.11 ± 19.22	293.41 ± 61.36	0.21 ± 0.33	1.18 ± 0.07	2.00 ± 0.60	159.30 ± 50.10
	45°	11	9.62 ± 0.43	11.32 ± 0.73	152.75 ± 21.84	298.90 ± 33.57	0.17 ± 0.19	0.97 ± 0.05	1.70 ± 0.50	146.10 ± 22.70
	90°	9	9.55 ± 0.81	11.36 ± 0.58	144.48 ± 34.53	291.24 ± 61.02	0.19 ± 0.57	1.08 ± 0.08	1.80 ± 0.70	146.80 ± 53.30
	135°	10	9.35 ± 0.57	11.32 ± 0.58	145.15 ± 27.38	285.54 ± 45.98	0.21 ± 0.16	0.98 ± 0.06	1.90 ± 0.60	140.40 ± 25.50
<i>P. cuvieri</i>	180°	9	9.58 ± 0.48	11.92 ± 0.52	143.18 ± 15.00	324.16 ± 40.90	0.24 ± 0.35	1.28 ± 0.07	2.30 ± 0.60	180.90 ± 40.40
			9.49 ± 0.56	11.47 ± 0.61	143.93 ± 23.59	298.65 ± 48.57	0.20 ± 0.32	1.10 ± 0.07	1.90 ± 0.60	154.90 ± 38.40
	0°	12	7.93 ± 0.73	8.62 ± 0.77	103.93 ± 22.91	156.53 ± 32.22	0.09 ± 0.06	0.53 ± 0.29	0.70 ± 0.40	52.60 ± 21.50
	45°	11	7.62 ± 0.49	8.27 ± 0.39	100.55 ± 19.95	148.36 ± 22.33	0.08 ± 0.04	0.49 ± 0.17	0.60 ± 0.30	47.80 ± 14.90
<i>P. cuvieri</i>	90°	12	7.86 ± 0.76	8.66 ± 0.71	105.94 ± 21.32	165.11 ± 28.49	0.10 ± 0.06	0.58 ± 0.19	0.80 ± 0.60	59.10 ± 14.70
	135°	11	7.42 ± 0.65	7.96 ± 0.35	92.94 ± 19.17	123.56 ± 14.08	0.07 ± 0.05	0.36 ± 0.18	0.50 ± 0.30	30.60 ± 11.50
	180°	12	7.38 ± 0.45	7.93 ± 0.51	90.87 ± 17.64	120.23 ± 26.68	0.07 ± 0.06	0.32 ± 0.16	0.50 ± 0.50	29.30 ± 15.60
			7.64 ± 0.62	8.29 ± 0.55	98.84 ± 20.20	142.76 ± 24.76	0.08 ± 0.05	0.46 ± 0.20	0.60 ± 0.40	43.80 ± 15.60

Measures of mass and body size were taken on the first day of the experiment before releasing the tadpoles into the aquaria (Initial), and on the seventh day, at the end of the experiment (Final). Relative growth was calculated as Eqn1. Absolute growth was calculated as the difference between the initial and final measures of tadpoles. Values in bold represent mean and s.d. for the species, considering all orientations. n: number of tadpoles by treatment.

CAPÍTULO 3

Smooth, rough, or striated: Influence of substrate texture on tadpoles' growth rates

Fabiane Santana Annibale, Verônica Thiemi Tsutae de Sousa, Carlos Eduardo de Sousa, Matthew D. Venesky, Denise de Cerqueira Rossa-Feres, Richard J. Wassersug and Fausto Nomura

Esse capítulo será preparado para submissão ao periódico *PlosOne*

ABSTRACT

Tadpoles graze food upon a variety of substrates that differ in surface texture (e.g. smooth leaves, rough rocks). We tested how interspecific variation in the external oral morphology of nine species influenced tadpoles' performance when feeding on smooth, striated or rough substrates. We looked into: differences in (1) the number of labial tooth rows, (2) number of gaps in the labial tooth rows and (3) emarginations and number of gaps in the marginal papillae rows among species.

Tadpoles with a higher number of labial tooth rows were generalists in terms of substrate surface textures, whereas those with few keratinized structures were specialists on smooth surfaces. Tadpoles with the same number of labial tooth rows, but different number of gaps in these structures were able to grow well regardless the texture of substrates. However, tadpoles with the generalized oral configuration (i.e., LTRF: 2(2)/3(1)] had higher growth rates than the other species. Among these tadpoles, the species with a single marginal papillae row with no gaps and emargination performed well grazing upon all the substrates tested. Tadpoles with the same marginal papillae row configuration have the same ability to acquire food from the same substrates; tadpoles with more gaps in this soft tissue performed well only when grazing on rough substrates.

We demonstrated that variation in oral morphology influences tadpoles' ability to acquire food from substrates with different textures, with consequences to growth rate. We provide insights about specializations in feeding behavior and the adaptive significance of variation in external oral morphology.

Key words: Feeding behavior, foraging surfaces, anuran larvae, niche breadth, ecomorphology.

INTRODUCTION

Compared to other vertebrates tadpoles have a simple body form. In contrast they have exceptionally complex oral structures used for feeding — mainly grazing upon substrates (Orton, 1953; Wassersug, 1975). For most tadpoles, the oral apparatus is comprised of an oral disc with keratinized jaw sheaths and rows of labial teeth, surrounded by a soft tissue and marginal papillae (McDiarmid and Altig, 1999). When a tadpole closes its mouth during a gape cycle, the jaws can bite organic material off the substrate (Venesky et al., 2010a). The labial teeth help to anchor the oral disc to the substrate and can also cyclically rake organic material from the substrate to optimizing grazing (Wassersug and Yamashita, 2001; Venesky et al., 2010a). The soft tissue of the oral disc can help holding the keratinized structures on the substrate, and marginal papillae may also have a sensory role (Altig and Brodie, 1972; Van Dijk, 1981; Wassersug and Yamashita, 2001). Tadpoles can adjust to these structures to achieve the best contact with the substrate to remove food efficiently (McDiarmid and Altig, 1999; Venesky et al., 2010a; Wassersug and Yamashita, 2001).

Physical characteristics of substrates are known to influence feeding for many grazing animals. That is because these substrates vary in physical properties — i.e., in their toughness, texture, orientation, temperature, composition, color (e.g. Ximenez et al., 2012; Hanlon et al., 2015; Ramamonjisoa et al., 2017). Among herbivorous insect species, for example, as surface toughness increases, less food is removed from the substrates (Clissold et al., 2009). As such, the content ingestion becomes slower and the assimilation of nutrients in the gut decreases. Among tadpoles, as toughness of substrates increases, tadpoles choose softer materials, regardless the nutritious content (Ramamonjisoa et al., 2017). There appears to be a trade-off between the nutritional gain and the effort to remove and ingest food from the substrates (Ramamonjisoa et al., 2017). As tadpoles

forage on diverse substrates, from smooth leaves to irregular rocky surfaces (Duellman and Trueb, 1994), many other physical properties may influence tadpoles feeding as well.

Differences in substrate surface texture, for example, may be a major constraint on nutrient acquisition by tadpoles, because they determine the friction between the oral structures of animals and the surface upon which they graze. When tadpoles feed on relatively smooth surfaces, the labial tooth rows can have a large area of contact with the substrate and can aid the jaw sheaths in removing food material. However, the ability of the teeth to anchor the oral disc to the surface may be ineffective on very smooth surfaces because of low friction (Wassersug and Yamashita, 2001). Conversely, when tadpoles feed on rough and irregular surfaces, their adherence to the surface may be higher. The labial teeth may have a better contact with rougher surfaces, holding the oral disc to the surface and allowing the jaws to bite off food more effectively. The marginal papillae may possibly interdigitate with crevices on irregular surfaces, increasing friction and thus, further helping hold tadpole mouths against the surface (based on fish, Wainwright et al., 2013; Ditsche et al., 2014). However, rugose substrates provide refuge for macroalgae as they diminish the ability of grazing animals like tadpoles to reach food within recesses (Dudley and D'Antonio, 1991). This ability to acquire food from substrates may differ among species as tadpoles' oral structures vary in many features, as shape and flexibility of oral structures (Altig, 2006). Jaws vary in size, curvature, thickness and size of serrations (McDiarmid and Altig, 1999). The labial teeth vary among species in shape; e.g., in curvature, size, and presence of cusps on their heads (Vera Candioti and Altig, 2010). The rows of labial teeth and marginal papillae also vary in number and configuration; e.g., in number and position of gaps, and in emarginations (McDiarmid and Altig, 1999). Variation in oral structures may thus affect the ability of tadpoles to adjust their mouths to different shapes and textures of substrates.

As substrate surface texture influences tadpole feeding mechanics (Wassersug and Yamashita, 2001) that is likely to influence tadpole performance measured by their growth rate. Differences in tadpoles' performance based on substrate surface texture could lead to niche partitioning among species. If species differ in their ability to capture nutrients off of surfaces that vary in texture that could explain why one can find multi-species tadpole assemblages where gut contents suggest that there is little variation in diet.

We designed experiments to test whether tadpole grazing on surfaces with different textures — smooth, rough and striated — affected their growth rates as a measure of performance. We included in our experiments species with different oral configuration. The tadpoles varied in the number of labial tooth rows, the number and disposition of gaps in their labial tooth rows and in their marginal papillae rows, and lastly emarginations of the rows of marginal papillae. We predicted that tadpoles' performance would vary due to differences in (1) the number of labial tooth rows, (2) number of gaps in the labial tooth rows and (3) emarginations and number of gaps in the marginal papillae rows. Species with fewer labial tooth rows (e.g., a single row) would have higher growth rates grazing upon a broader range of surface textures. A low number of keratinized structures is supposed to add flexibility to the oral disc allowing tadpoles to graze efficiently even in crevices on rough substrates (Venesky et al., 2010b; Venesky et al., 2011). Thus, this type of oral disc may be better adjustable to more types of surfaces. Species with more gaps in labial tooth and marginal papillae rows, and with more emarginations in the marginal papillae rows, would perform better feeding on striated and rough substrates. We based this prediction on the idea that more gaps may facilitate mobility of oral structures (Gradwell, 1975; McDiarmid and Altig, 1999) allowing them to conform better to irregular surfaces. Finally, species with more rows and less gaps may not be as efficient in

accessing recesses on the surface of rough substrates. We thus predicted that they would perform better feeding on smooth surfaces.

MATERIALS AND METHODS

Species

We selected pond dwelling tadpoles from nine anuran species. The tadpoles varied in the number of: 1) labial tooth rows, 2) gaps in the labial tooth rows, and 3) gaps and emarginations in the marginal papillae rows (Table 1, Fig. 1). These species are commonly found in the same habitats and often consume the same resources; e.g., tadpoles of *Physalaemus cuvieri*, *P. nattereri*, and *Leptodactylus fuscus* can be found together on the bottom of the same pond; Vasconcelos et al., 2011).

Table 1 Oral configuration of tadpoles of the species tested.

Species	n	Labial tooth row formula	Marginal Papillae Configuration		
			Row number	Emarginations	Gaps
<i>Dendropsophus minutus</i> ¹	36	0 / 1	1(V) / 2(L)	-	D
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i> ¹	21	2(2) / 2	1	L	DV
<i>Leptodactylus podicipinus</i> ^{1,2}	33	2(2) / 3	2(V) / 3(L)	V	D
<i>Leptodactylus fuscus</i> ^{2,3}	45	2(2) / 3(1)	1	-	D
<i>Physalaemus cuvieri</i> ^{2,3}	35	2(2) / 3(1)	1	L	DVL
<i>Physalaemus nattereri</i> ^{2,3}	45	2(2) / 3(1)	1	L	D
<i>Scinax fuscovarius</i> ^{2,3}	36	2(2) / 3(1)	1	L	D
<i>Hypsiboas raniceps</i> ²	21	2(1,2) / 3(1)	1	V	D
<i>Hypsiboas albopunctatus</i> ²	36	2(1,2) / 3(1)	1	V	D

The number beside the species name represents the prediction in which the species was tested. That is, variation in: (1) the number of labial tooth rows, (2) number of gaps in the labial tooth rows and (3) emarginations and number of gaps in the marginal papillae rows of species influences tadpoles' performance when feeding on substrates with different surface textures. V: ventral; L: lateral; DV: dorsal and ventral; DVL: dorsal, ventral and lateral.

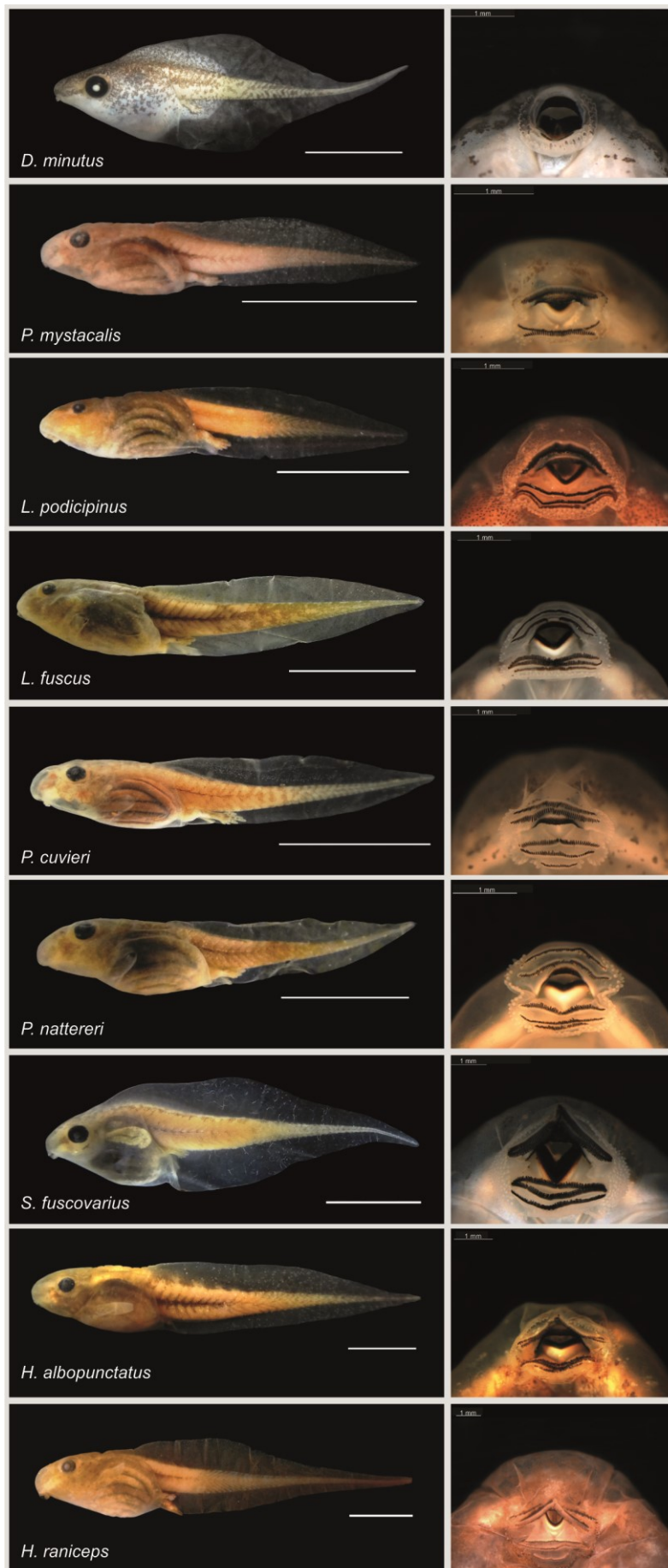


Fig. 1 Lateral view (left) and external oral morphology (right) of the species tested in the three predictions. Prediction 1: tadpoles with 1 to 3 posterior labial tooth rows (*D. minutus*, *P. mystacalis* and *L. podicipinus*, respectively). Prediction 2: tadpoles with the same number of labial tooth rows, but with 1 to 3 gaps in these structures [*L. podicipinus* (1); *L. fuscus*, *P. cuvieri*, *P. nattereri* and *S. fuscovarius* (2); *H. albopunctatus* and *H. raniceps* (3)]. Prediction 3: tadpoles with the same labial tooth row configuration, but different marginal papillae row configuration. That is a marginal papillae row: complete (*L. fuscus*), with a lateral emargination (*P. nattereri* and *S. fuscovarius*), with a lateral emargination and gaps (*P. cuvieri*). Credit: Katiuce O. R. Picheli.

Collection and acclimation of tadpoles

Tadpoles were collected between January and April 2017 from ponds located in open areas on the northwestern region of São Paulo state, Brazil (Fig. 2). They were housed in polyethylene aquaria containing dechlorinated water, which was gently and constantly aerated. We used a 12:12 light:dark photoperiod and air room temperature circa 28°C, which maintained water at ~25.5°C. We fed tadpoles *ad libitum* with a commercial algae-based powdered food, containing *Spirulina* and sea meal (Sera Micron®). Tadpoles were acclimatized in these conditions for at least three days before the experiment.

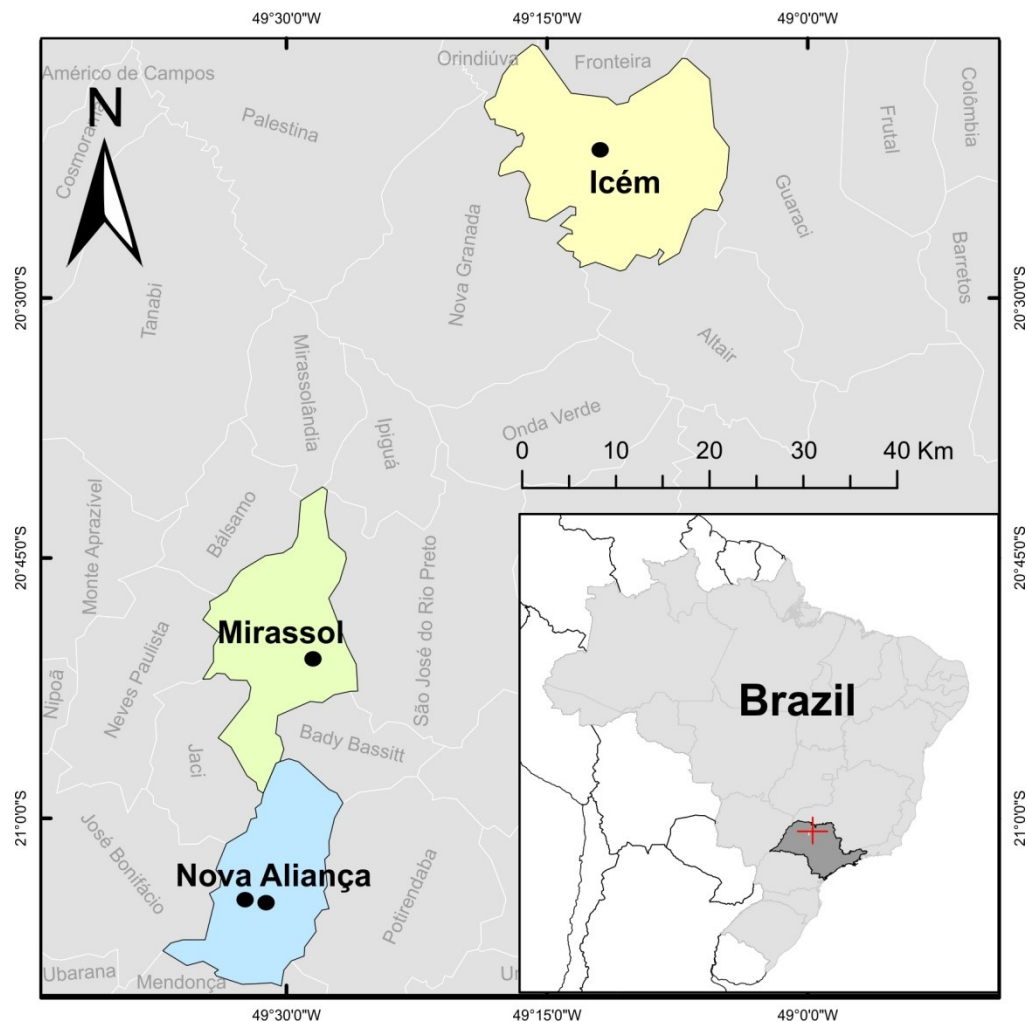


Fig. 2 Sampling area. Tadpoles were collected in lentic water bodies (black dots) in three municipalities (blue, green and yellow areas) in the northwestern region (red cross) of São Paulo state (dark gray area in the map of Brazil). Credit: Alba Navarro Lozano.

Experiment

During the experiments, temperature and photoperiod were maintained the same as in the acclimation period. The experimental design was based on Annibale et al. (2019). We used glass aquaria (15x10x13cm) filled with dechlorinated water and one tadpole per aquaria. The water in each aquarium was continuously aerated, and it was not changed during the experiment to avoid stressing the animals. We covered the aquaria walls with a blue adhesive to reduce stress that other background colors and movement outside the aquaria might cause to tadpoles (based on fishes, Maia and Volpato, 2013). We arranged the aquaria in rows on the laboratory bench and randomized the order of treatment that each aquarium would represent.

We offered the food to the tadpoles on plates (3.2 x 17.5 cm) made of a moldable plastic (TermoMorph[®]). The surfaces of the plates were either 1) smooth, with no recesses or any other irregularities on their surfaces (Fig. 3A), 2) grooved to give a striated surface with a clear pattern to their roughness (Fig. 3B) or 3) abraded in such a way that they were irregularly rough (Fig. 3C). These plates represented three treatments in an increasing order of complexity in the substrate surface texture: smooth, striated and rough, respectively. The three surface textures reflect stylized surface contours that can be found in nature ponds — certain aquatic plants have smooth leaves but striated stems; rocky surfaces are rougher and irregularly textured.

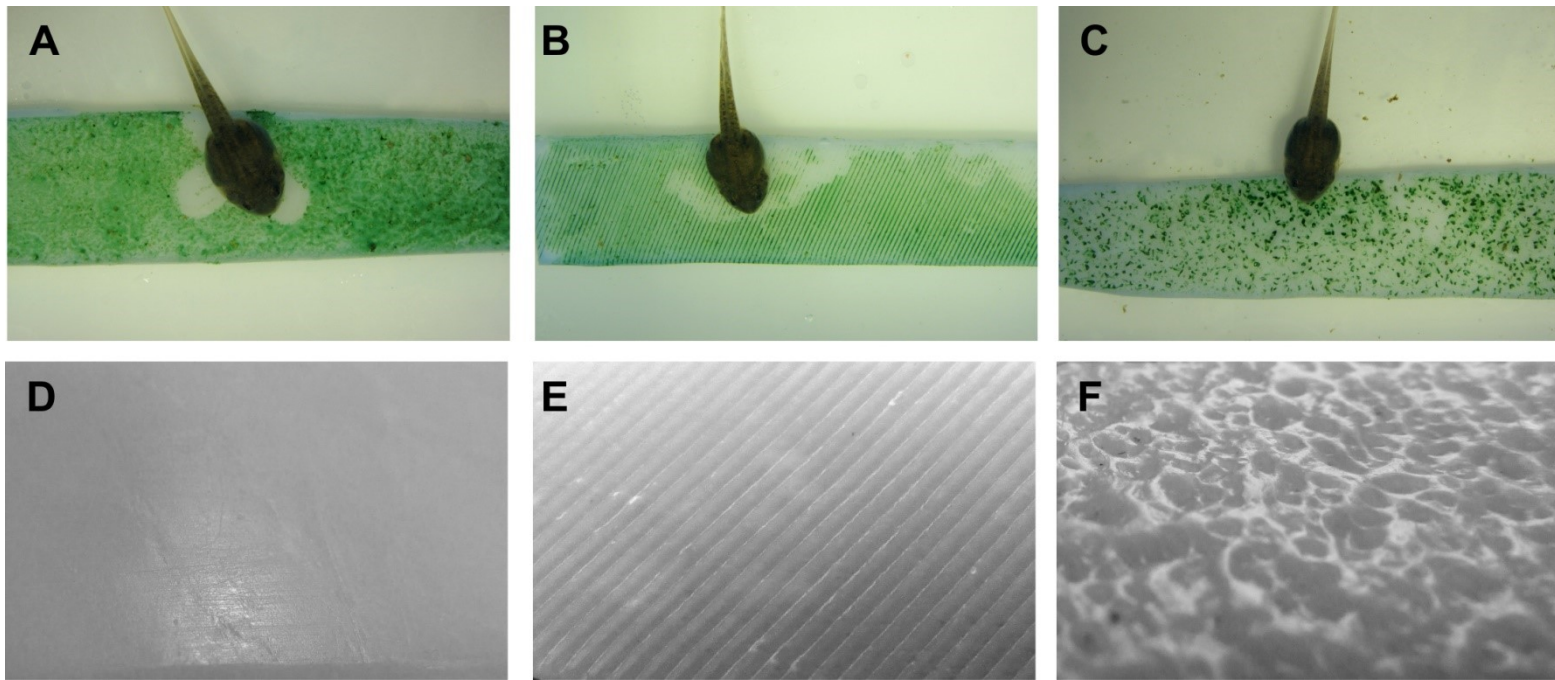


Fig. 3 Experiment treatments. Images A-C shows a tadpole grazing on a plastic plate coated with Sera Micron (in green). Images D-F shows details of the plastic plate textures. These images correspond to the following surface textures tested: (A and D) smooth, (B and E) striated, and (C and F) rough. As tadpoles graze, they scour the substrate, so it is possible to see the marks left on the surface where food was removed. The species in the images are: (A) *S. fuscovarius*, (B) *L. podicipinus* and (C) *L. fuscus*.

On each plate, we spread 03 ml of a liquid mixture of water and Sera Micron[®] (concentration of 80 mg.ml⁻¹). We allowed the plates to air dry for at least 6 hours so the mixture would be firmly attached to the surfaces (adapted from Venesky et al., 2013). Next, we placed one plate per aquarium (respective to each treatment), horizontally and at the bottom of the aquaria. Our previous research established that tadpoles will feed on Sera Micron presented to them in this fashion (see Annibale et al., 2019). We changed the plates twice a day to guarantee that food would be available *ad libitum* throughout the experiment.

Each tadpole received food on plates with the same type of texture during the whole experiment. The experiment lasted five days for all species. We tested from 10 to 15 tadpoles of each species per treatment ($n_{\text{total}} = 308$). Within species, we selected tadpoles with similar total length (Table S1) and Gosner stages (between 28 to 32, Gosner, 1960). Some species had a lower sampling as tadpoles did not attend to the requirements of similar size and developmental stage (Table S1).

In order to estimate the tadpole's relative growth during the experimental period, we weighed and photographed each tadpole at the beginning and at the end of the experiment. We used an analytical balance (A&D, GR-200) with readability of 0.1 mg to weigh the tadpoles, and used a digital camera (Sony Cyber Shot DCS TX 10 and TX20) to photograph the larvae in lateral view. The photographs were analyzed with the software ImageJ® (<https://imagej.nih.gov/ij/>) to obtain measures of tadpole's body and total length (i.e., body + tail length). By doing so, we obtained respectively the initial and final measures of tadpole mass and size. We inferred the tadpoles' relative growth, using the formula:

$$rg(x) = \frac{\Delta x}{x_i},$$

where Δ = difference between the final and initial measures, x = mass or size measures, and i = initial measure.

We captured digital images of all the plastic plates offered to the tadpoles using a scanner (HP, LaserJet M1132). We used the particle analysis tool in the software ImageJ® to quantify the percentage of food removed from each plate. In total, we analyzed 10 plates by tadpoles (two plates by day during five days of experiment). We calculated the mean percentage of food removed from these 10 plates as a measure of food consumption by tadpole for the following analyses.

Statistical analyses

We tested the hypothesis that tadpoles with different oral morphologies differ in performance when feeding on substrates with different surface textures. Because all tested tadpoles feed by rasping organic material from surfaces (e.g. Venesky et al., 2013; Annibale et al., 2019; F.S. Annibale, pers. obs.), we considered differences in external oral morphology as the main factor to produce variation in the tadpoles' ability to feed on substrates with different textures. We used the taxonomic name of species as a surrogate for

the variation in number of labial tooth rows and in configuration of the rows of labial tooth and marginal papillae among them for all analyses.

We analyzed separately the relative mass and size (body and total length) of tadpoles to verify the effect of the different substrates on different parameters of growth. We used the growth rates of the tadpoles as a measure of their efficiency to graze and consume food from surfaces, and then invest it in growth. However tadpoles that consumed more food did not necessarily gain more mass. Presumably, such differences in tadpoles mass are due to intrinsic differences in digesting the food and in nutrient assimilation. Because we were not able to distinguish these effects, we used the relative growth (not the absolute values) to reduce the effects inherent to the species (i.e., the initial and final measures of tadpoles). We also used food consumption as a covariate to control its effect on the relative mass gained by tadpoles when testing our predictions. We did not use food consumption as the covariate in the analyses of tadpoles' size (body and total size) because the amount of food that animals consume is more directly related to the increase in mass than length (Leips and Travis 1994; Álvarez and Nicieza 2002).

In order to meet the analyses assumptions we log transformed the relative mass for every analyses performed with this variable and the total size of species with a different number of gaps in labial tooth rows (Prediction 2). We used the *post hoc* Tukey's test (Honestly Significant Difference, HSD) to identify differences among groups when the analyses of variance and covariance found the effect of an explanatory variable on the response variable. When the interaction between factors was significant, we analyzed the results by interpreting the graphs. All analyses were performed in R software version 1.0.143 (R Development Core Team 2017).

Prediction 1: variation in the number of labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures

We used a two-way ANCOVA to test the effect of different types of substrates on the relative mass of species with different number of tooth rows. We selected only three species for this prediction because they represented an increasing order in the number of posterior labial tooth rows (i.e. from 1 to 3, Fig. 4). Also, only these species have complete posterior labial tooth rows in our pool of tadpoles, so selecting them removed the effect of gaps in these structures for the analysis. The tadpole's relative mass was the response variable in our statistical model, which also included species and substrate texture as explanatory variables, and the percentage of food consumed by tadpoles as a covariate. Each of our explanatory variables had three levels (species: *D. minutus*, *L. podicipinus*, and *P. mystacalis*; substrate texture: smooth, striated, and rough).

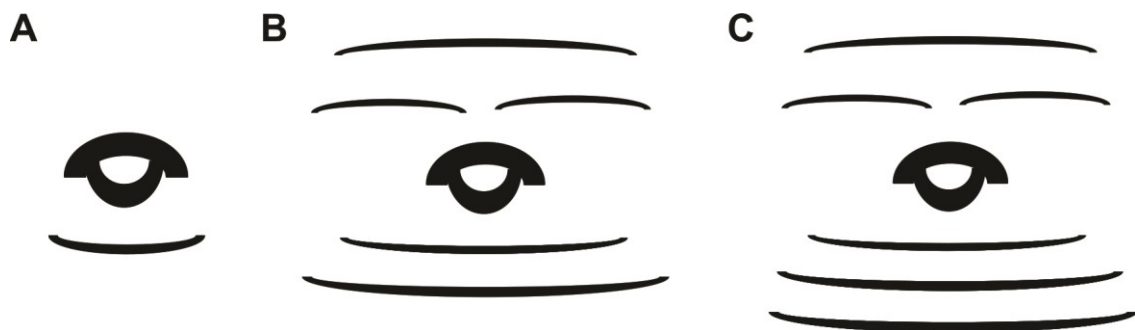


Fig.4. Schematic illustration (not to scale) for variation in the number of labial tooth rows among the species tested in Prediction 1. The schemes represent tadpoles of (A) *D. minutus*, (B) *P. mystacalis* and (C) *L. podicipinus*, and the increasing order in the number of labial tooth rows among species. Note that all the species have complete posterior tooth rows.

We used an ANOVA-two-way to test whether irregularities on substrate surfaces affect tadpole's increase in body size. In this case we used the species identity and the treatments as explanatory variables, and tadpoles' body size as response variable. We used the same statistical model with tadpoles' total size as response variable.

Prediction 2: variation in the number of gaps in the labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrate with different textures

For this prediction, we selected only species with the same number of labial tooth rows: two anterior and three posterior. They varied in the number of gaps in these structures (i.e. from 1 to 3, considering both anterior and posterior tooth rows, Fig. 5). Thus, we tested seven species.

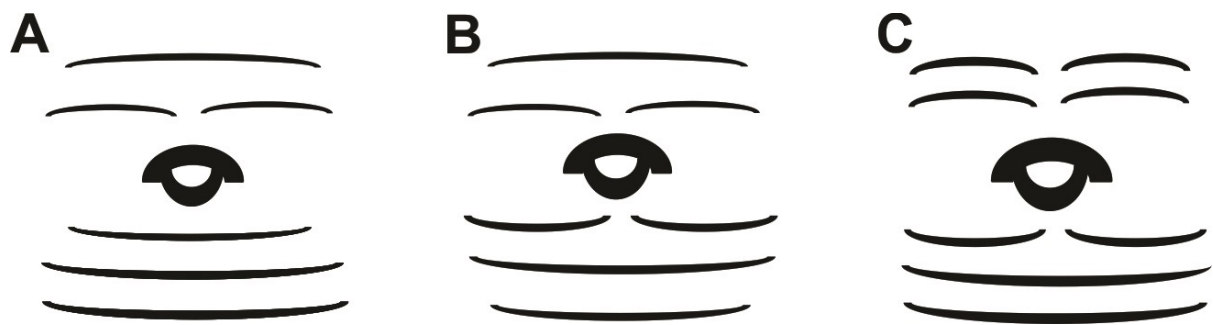


Fig. 5 Schematic illustration (not to scale) for variation in the number of gaps in the labial tooth rows among the species tested in Prediction 2. All tadpoles tested in this prediction have the same number of labial tooth rows (i.e. 2 anterior and 3 posterior), but they differ in the number of gaps in these keratinized structures. Tadpoles of (A) *L. podicipinus* have one gap, (B) *L. fuscus*, *P. cuvieri*, *P. nattereri* and *S. fuscovarius* have 2 gaps, and (C) *H. albopunctatus* and *H. raniceps* have 3 gaps.

We used a two-way ANCOVA to test the effect of different types of substrates on the gained mass of species with different number of gaps in labial tooth rows. We used tadpoles' relative mass as the response variable, and the percentage of food consumed by tadpoles as a covariate. In this case, we used as explanatory variables the species (seven levels: *P. nattereri*, *P. cuvieri*, *L. fuscus*, *S. fuscovarius*, *L. podicipinus*, *H. albopunctatus* and *H. raniceps*), and the substrate type (three levels – smooth, striated and rough).

We also tested the effect of the different substrates on tadpole's body size among the same species using a two-way ANOVA. We used the relative body size as a response variable and the species identity and the substrate textures as the explanatory variables. We used the same statistical model with tadpoles' total size as response variable.

Prediction 3: variation in marginal papillae configuration influences differently the food consumption of species grazing upon substrates with different textures

To this test, we selected only species with the same oral configuration: the same number of labial tooth rows and the same number and position of gaps in these structures — i.e. $LTRF = 2(2)/3(1)$. Tadpoles varied only in the marginal papillae configuration, representing an increasing order of complexity in morphology — i.e. a marginal papillae row: complete, emarginated with no gaps, emarginated with gaps, respectively (Fig. 6). Thus, we tested four species.

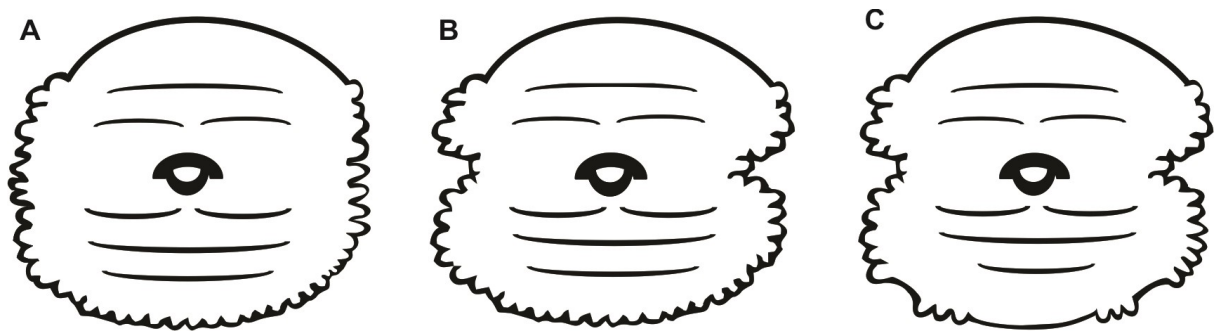


Fig.6 Schematic illustration (not to scale) for variation in the marginal papillae configuration. The schemes represent tadpoles of (A) *L. fuscus*, (B) *P. nattereri* and *S. fuscovarius*, and (C) *P. cuvieri*. All these tadpoles have the same number of labial tooth rows and the same number of gaps in these structures [$LTRF = 2(2)/3(1)$]. They also have a single marginal papillae row, but this structure is complete in tadpoles of *L. fuscus*, laterally emarginated in tadpoles of *P. nattereri* and *S. fuscovarius*, and is laterally emarginated and interrupted by lateral and ventral gaps in *P. cuvieri*.

When testing the effect of the different substrate textures on species with different marginal papillae row configuration, we used food consumption as a response variable. Differences in growth rate among them were already known, as these tadpoles were part of the group of species tested in Prediction 2.

We used a two-way ANOVA to test the effect of different surface textures on the food consumed by species with differences in marginal papillae row configuration. We used the percentage of food consumed by tadpoles as the response variable. Species identity (four levels: *L. fuscus*, *P. cuvieri*, *P. nattereri* and *S. fuscovarius*), and the substrate texture (three levels – smooth, striated and rough) were used as explanatory variables.

RESULTS

In our experiments, tadpoles were able to feed upon all types of surfaces but with different performances as measured by their growth rates. In general, tadpoles feeding on striated surfaces had lower growth rates in contrast to those feeding on smooth and rough substrates.

Prediction 1: variation in the number of labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures

Despite the different number of tooth rows on the oral disc among the species, tadpoles had a similar increase in body size regardless the substrate upon which they grazed (Table 2, Fig. 7A).

However, the interaction between species and the surface texture produced variation in the relative total size of tadpoles (Table 2, Fig. 7B). Both tadpoles with a low and an intermediate number of labial tooth rows (*D. minutus* and *P. mystacalis*, respectively) had the greatest increase in total size when grazing on smooth surfaces. However, these tadpoles showed less change in total sizes grazing on substrates with more recesses. Tadpoles with more labial tooth rows (*L. podicipinus*) had the opposite response: the rougher the surfaces, the higher the increase in total size. For example, feeding on rough substrates, tadpoles of *L. podicipinus* increased 6% more than *D. minutus* and 8% more than *P. mystacalis*.

Interaction between species and treatments also explained variation in the relative mass of the tadpoles (Table 2, Fig. 7C). Tadpoles with more labial tooth rows (*L. podicipinus*) gained mass regardless the substrate texture on which they grazed. Tadpoles with an intermediate number of labial tooth rows (*P. mystacalis*) performed

well on both smooth and rough substrates. On striated surfaces though, tadpoles with fewer labial tooth rows (*D. minutus*) gained 26% more mass than *P. mystacalis*. When surface was smooth, tadpoles of *D. minutus* gained more mass.

Considering the three growth measures, tadpoles of *L. podicipinus* had good performances feeding on the three types of surfaces. Tadpoles of *P. mystacalis* perform well (e.g. in terms of relative body size and mass gain) when grazing on both smooth and rough substrates. Tadpoles of *D. minutus* appear to have a specialized feeding behavior as they had higher performances feeding on smooth substrates. Overall the increase in number of labial tooth rows allowed tadpoles to acquire food effectively from a broader range of surface textures.

Table 2 Effect of the different types of substrate textures (smooth, striated and rough) on the growth rates of species* with different number of tooth rows.

Response variable	Source	Df	F	P
Relative body size**	Species	2	0.53	0.59
	Surfaces	2	1.46	0.23
	Species*Surfaces	4	1.01	0.4
	Residuals	79		
Relative total size**	Species	2	11.76	< 0.001
	Surfaces	2	0.78	0.46
	Species*Surfaces	4	4.24	0.003
	Residuals	79		
Relative mass***	Food consumption	1	1.12	0.29
	Species	2	2.11	0.12
	Surfaces	2	3.23	0.04
	Species*Surfaces	4	3.03	0.02
	Residuals	80		

* *D. minutus*, *L. podicipinus* and *P. mystacalis*; ** ANOVA test; *** ANCOVA test.

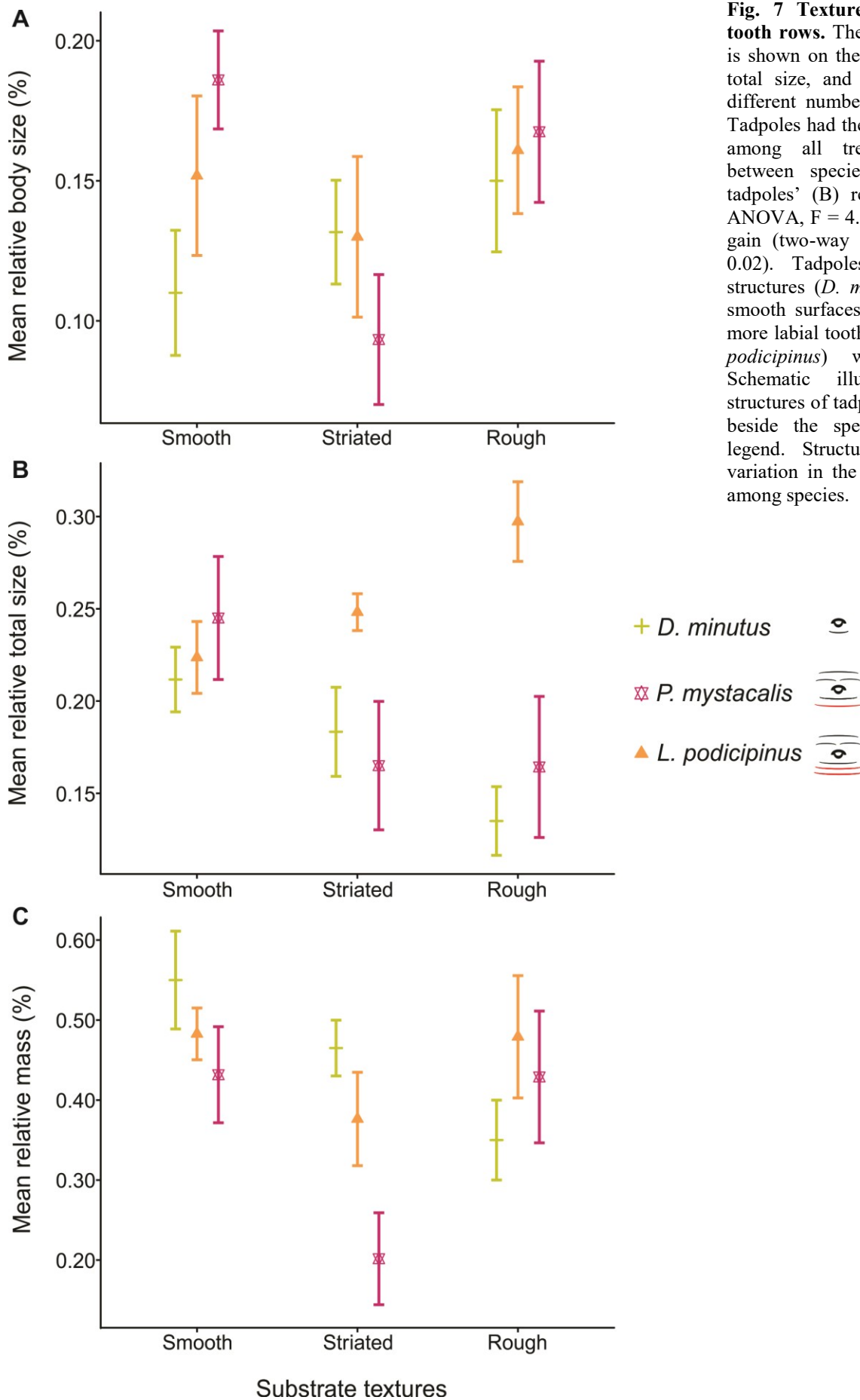


Fig. 7 Textures and number of labial tooth rows. The effect of substrate textures is shown on the (A) relative body size, (B) total size, and (C) mass of species with different number of labial tooth rows. (A) Tadpoles had the same increase in body size among all treatments. The interaction between species and substrates affected tadpoles' (B) relative total size (two-way ANOVA, $F = 4.24$, $p = 0.003$) and (C) mass gain (two-way ANCOVA, $F = 3.03$, $p = 0.02$). Tadpoles with fewer keratinized structures (*D. minutus*) were specialists on smooth surfaces (B and C). Tadpoles with more labial tooth rows (*P. mystacalis* and *L. podicipinus*) were grazing generalists. Schematic illustrations of keratinized structures of tadpoles' oral disc are provided beside the species names in the graph legend. Structures in red represent the variation in the posterior labial tooth rows among species.

Prediction 2: variation in the number of gaps in the labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures

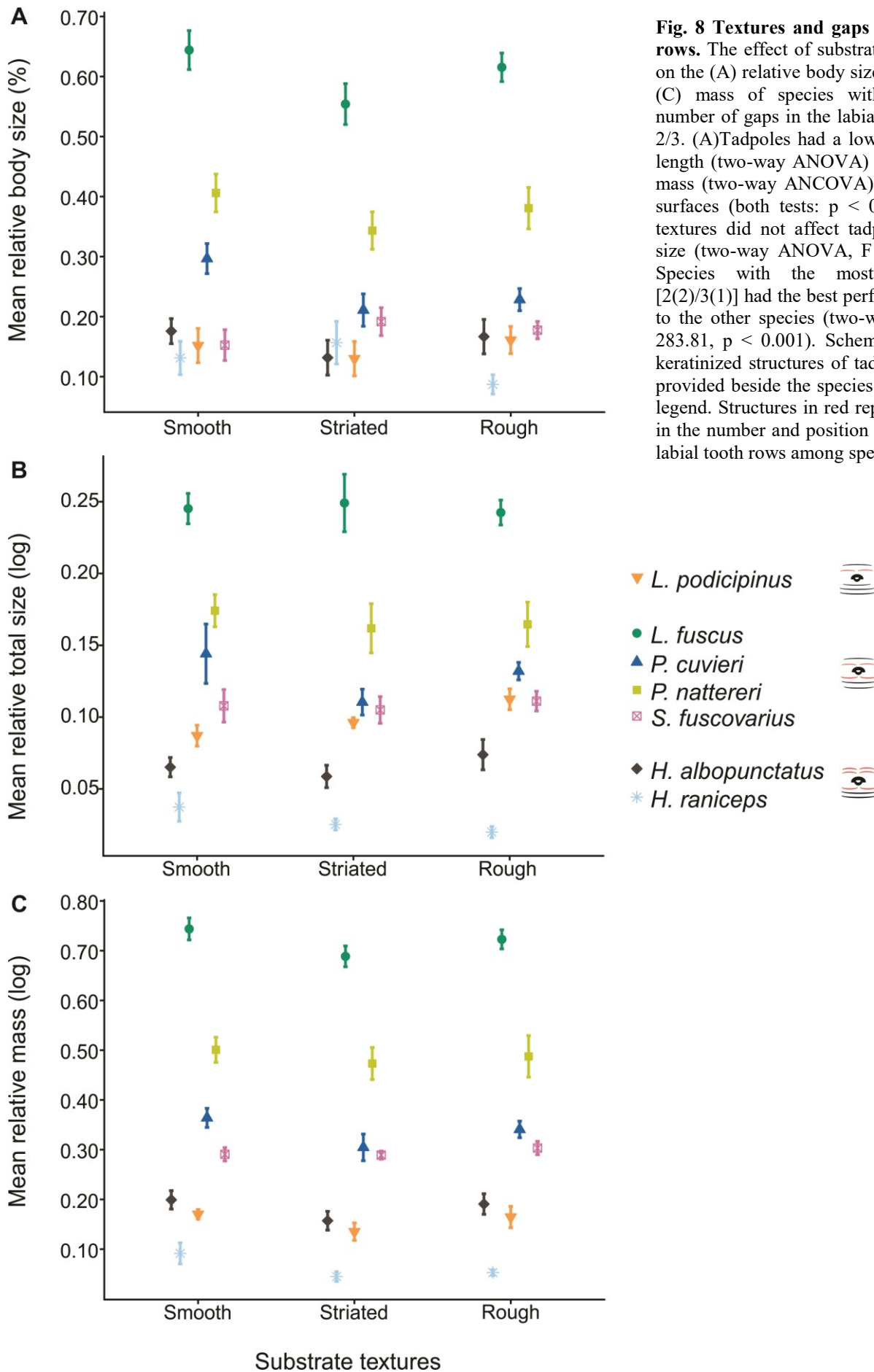
We found tadpoles to be overall more efficient grazing on smooth and rough substrates than on striated ones, regardless their oral morphology (Table 3, Figs. 8A and C). In comparison to the other substrates, tadpoles feeding off of striated surfaces increased 3% less in body size and 15% less in mass. Tadpoles' relative total size was similar among species and treatments (Fig. 8B).

Differences in oral morphology were important in explaining variation in tadpoles' growth rates. Note that all these species tested here had the same number of labial tooth rows—two anterior and three posterior. They differed only in the number of gaps in labial tooth rows. As such, our results can be interpreted regarding three types of oral configuration, representing an increasing order for the number of gaps in the labial tooth rows. That is, tadpoles with: one gap (LTRF = 2(2)/3 — *L. podicipinus*), two gaps (LTRF = 2(2)/3(1) — *L. fuscus*, *P. cuvieri*, *P. nattereri* and *S. fuscovarius*); and three gaps (LTRF = 2(1,2)/3(1) — *H. albopunctatus* and *H. raniceps*) in the labial tooth rows. Tadpoles with the generalized LTRF [2(2)/3(1)] had the best performances in the three tests. Together, they grew 2 times larger in body length (Figs. 8A and S1A), and 3 times longer in total length (Figs. 8B and S1B) than the other species. Their mass, at minimum, doubled (Figs. 8C and S1C) compared to both *Hypsiboas* tadpoles and *L. podicipinus*. Tadpoles either with one more or one less gap in the labial tooth rows (both *Hypsiboas* and *L. podicipinus*, respectively) had a similar increase in body size and mass gain. They only differed in relative total length, where tadpoles with fewer gaps (*L. podicipinus*) grew almost three times larger than the *Hypsiboas* tadpoles.

Table 3. Effect of different types of substrate textures (smooth, striated and rough) on the gained mass of species* with different oral configuration — i.e., different number of gaps in labial tooth rows.

Response variable	Source	Df	F	P
Relative body size **	Species	6	123.26	< 0.001
	Surfaces	2	3.65	0.02
	Species*Surfaces	12	0.97	0.47
	Residuals	230		
Relative total size **	Species	6	100.94	< 0.001
	Surfaces	2	0.74	0.47
	Species*Surfaces	12	0.54	0.88
	Residuals	227		
Relative mass ***	Food consumption	1	74.94	< 0.001
	Species	6	283.81	< 0.001
	Surfaces	2	4.04	0.019
	Species*Surfaces	12	0.57	0.86
	Residuals	229		

* *H. albopunctatus*, *H. raniceps*, *L. fuscus*, *L. podicipinus*, *P. cuvieri*, *P. nattereri* and *S. fuscovarius*; ** ANOVA test; *** ANCOVA test.



Prediction 3: variation in marginal papillae configuration influences differently the food consumption of species grazing upon substrates with different textures

The interaction between the substrate textures and species produced variation in the percentage of food consumed by tadpoles (Table 4, Fig. 9). All species with LTRF 2(2)/3(1) were able to graze effectively on rough surfaces. They consumed from 80 to 90% of the food from this surface. It is important to note that 1) *L. fuscus* tadpoles were able to feed equally well on both smooth and rough surfaces, and that 2) *P. cuvieri* consumed less than 50% of the food available on smooth and striated surfaces.

Species with exactly the same oral disc configuration (*P. nattereri* and *S. fuscovarius*) showed the same response to the experiment. They were able to acquire food effectively from a relatively wide range of surface textures (Fig. 9). The simpler oral configuration of *L. fuscus* tadpoles (i.e., a largely continuous marginal papillae row with only one dorsal gap) allowed tadpoles to be more effective on acquiring food regardless of surface textures (Fig. 9). Comparatively, tadpoles of *P. cuvieri*, which have more complex mouths (i.e., with emargination and more gaps on the marginal papillae) were able to feed effectively on a narrower range of surface textures. These tadpoles did not perform well under the striated treatment (Fig. 9).

Table 4. Effect of different types of substrate textures (smooth, striated and rough) on the percentage of food consumed by tadpoles of species* with different marginal papillae configuration — i.e., different number of gaps and emarginations in this soft tissue.

Response variable	Source	Df	F	p
Food consumption **	Species	3	108.32	< 0.001
	Surfaces	2	180.97	< 0.001
	Species*Surfaces	12	26.12	< 0.001
	Residuals	149		

* *L. fuscus*, *P. cuvieri*, *P. nattereri* and *S. fuscovarius*; ** ANOVA test.

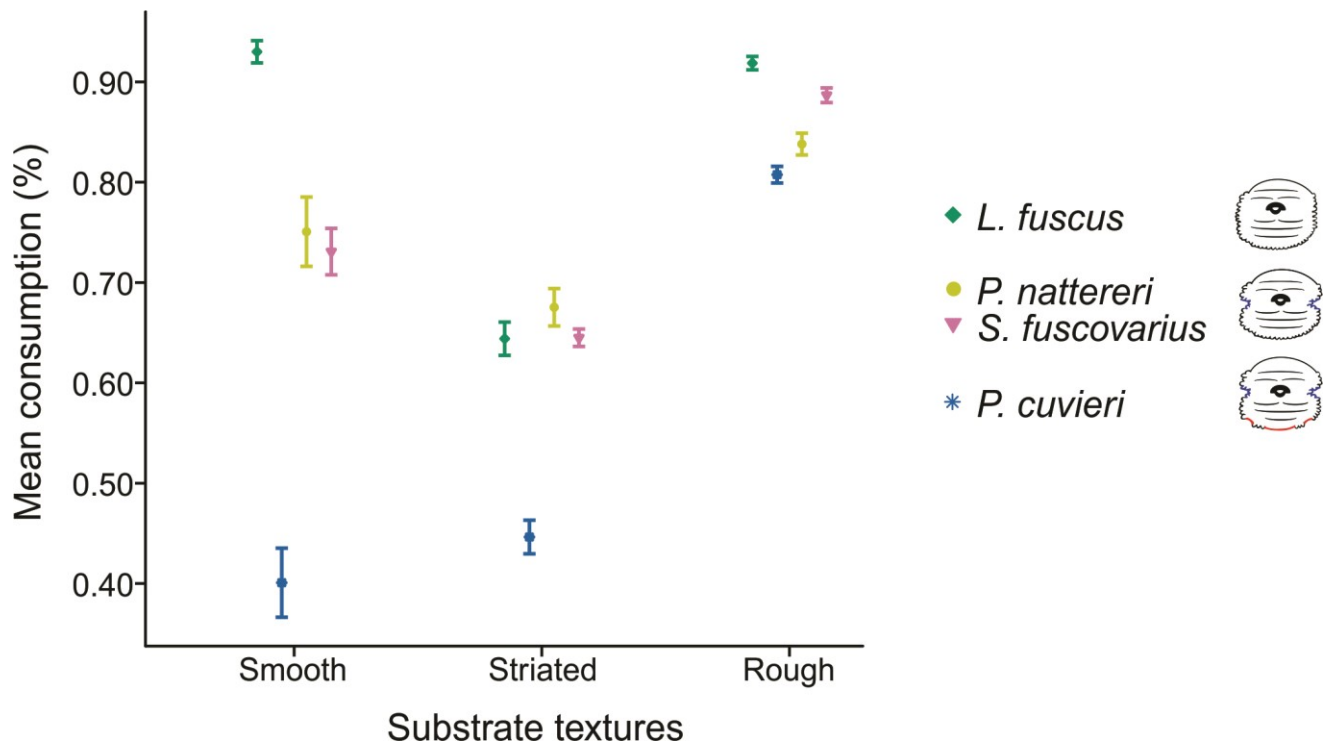


Fig. 9 Textures and marginal papillae row configuration. Variation in food consumption among treatments of species with the same labial tooth row formula [2(2)/3(1)], but different marginal papillae configuration (i.e., gaps and emarginations). The interaction between substrates and species produced variation in the percentage of food consumed by the tadpoles (two-way ANOVA, $F = 26.12$, $p < 0.001$). All tadpoles consumed more food on rough substrates. Tadpoles with more gaps in the marginal papillae (*P. cuvieri*) were specialists on rough substrates. The other species were grazing generalists despite differences in the configuration of their marginal papillae. Schematic illustrations of tadpoles' oral disc are provided beside the species names in the graph legend. Colored structures represent variation in tadpoles' marginal papillae row among species — red: number and position of gaps; blue: emarginations.

DISCUSSION

Gut content can reveal much about what tadpoles ingest (e.g., Rossa-Feres et al., 2004; Prado et al., 2009; Santos et al., 2016; Kloh et al., 2019), but fail to reveal where they acquire food most efficiently and any specialization they have to acquire food from different substrates. Consequently the role of variation in tadpole oral morphology to niche partitioning is not as clear as it is for other groups of animals such as birds (Grant and Grant, 2002) or mammals (Evans and Pineda-Munoz, 2018). Physical properties of substrates upon which tadpoles graze can influence their survivorship (Hanlon et al., 2015), feeding preference (Ramamonjisoa et al., 2016; 2017) and feeding efficiency (Annibale et al., 2019). Thus, the substrate characteristics may be more significant than diet in revealing how species' use and

partition the environment. Our study is in line with these previous investigations, as we demonstrate that the growth rate of tadpoles with different oral morphologies varies when they graze on substrates with different textures. Such finding adds to our understanding of how tadpoles use the environment.

Overall, all tadpoles tested here were able to feed and grow at all treatments. In the aquatic habitat, tadpoles encounter food in a variety of substrates, with different surface textures. Even a single substrate may have more than one type of texture. For example, a rough rock can present smooth areas due to the development of biofilm. This changes the frictional properties of the substrates (Ditsche et al., 2014) leading tadpoles to deal with different resistances while grazing on substrates. However, the overall growth rate of tadpoles grazing food from striated substrates was lower than on other surface textures. This may be because we grooved the plastic plates to produce striated surfaces regularly spaced and with equal topography (i.e., width between crevices: 01 mm, depth: 0.5 mm). In natural environment this pattern may not be so common (but part of substrates as stems of leaves) or be more subtle, so tadpoles may not be familiar to this type of surface texture. Even so, other scales of irregularities can be tested in the future, so we can understand how tadpoles are adapted to substrate surfaces textures.

Prediction 1: variation in the number of labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures

Tadpoles with a different number of labial tooth rows differ in their growth rates when feeding on surfaces with different textures. Tadpoles with the oral disc terminally positioned usually have small oral discs, with few keratinized structures (McDiarmid and Altig, 1999). The low number in keratinized structures is considered a factor that increases flexibility of the oral disc. As such, these tadpoles have been presumed to extract food effectively from

crevices in rough surfaces (Venesky et al., 2010b; Venesky et al., 2011). Likewise, an increased flexibility could also mean that these tadpoles would be able to graze upon a broader range of substrates. We observed, though, the opposite. Tadpoles with the lowest number of labial tooth rows (*D. minutus*) were specialists on smooth surfaces, but on surface textures with a higher complexity, tadpoles' performance decreased. As such, the low number of labial tooth rows in tadpoles of *D. minutus* may have constrained their ability to access food on substrates with irregularities. In contrast, a greater number of keratinized structures in the oral disc is supposed to reduce flexibility of the oral disc. As such, tadpoles with more labial tooth rows could be specialists in grazing specific substrates, mainly the smooth ones. However, we found that tadpoles with more labial tooth rows (*P. mystacalis* and *L. podicipinus*) performed better grazing on substrates with different surface textures. Tadpoles of *P. mystacalis* only had a lower performance when feeding on striated surfaces. Tadpoles of *L. podicipinus* were generalists and performed well in all treatments. Thus, contrary to previous suppositions a higher number of labial tooth rows do not constrain tadpoles' performance on substrates with complex textures.

A higher number of labial tooth rows in the oral disc, implies a higher number of labial teeth. In turn, the number of labial teeth influences tadpoles' efficiency to acquire food (Venesky et al., 2010a). That is because tadpoles with more labial teeth are able to consume a higher amount of food with fewer gape cycles. In our study, tadpoles with more labial tooth rows (*P. mystacalis* and *L. podicipinus*) had higher growth rates than tadpoles of *D. minutus* (except for mass gain). Thus, it is possible that variation in the number of labial tooth rows may also influence tadpoles' growth rates by producing differences in the effort to remove food from substrates with different textures.

Differences in efficiency to obtain resources can reflect the fundamental niche of species (Wainwright, 1991; Peres-Neto, 1999). Higher growth rates on substrates with

specific surface textures may indicate some level of specialization of species feeding behavior. Tadpoles of *D. minutus* usually forage on aquatic vegetation away from the bottom of ponds (Schulze et al. 2015). As such, they probably forage more often on smoother (e.g., leaves of aquatic vegetation) than rough surfaces (e.g., rocks and sticks which lie in the bottom of the water body). Furthermore these tadpoles also feed by filtering planktonic organisms in the water (Rossa-Feres et al. 2004). This feeding behavior is usually related to species with small oral discs with few keratinized structures (Vera Candioti, 2007).

Tadpoles of *P. mystacalis* and *L. podicipinus* in contrast are both bottom-dwelling, but differ in microhabitat selection. Tadpoles of *L. podicipinus* are found in bustling schools in shallow areas of ponds (Schulze et al. 2015). These ponds are usually structurally complex and present a broader range of substrates, which vary in surface texture—e.g., rocks, leaves, muds and fallen tree branches (FSA, personal observation). Tadpoles of *P. mystacalis*, in contrast, are commonly found in small puddles and cow hoof prints close to ponds or swamps, or in very shallow areas on the margins of ponds (Schulze et al., 2015; Pelinson et al., 2016). These habits clearly have less diversity in substrate surface texture.

It should be pointed out that the irregularities that we produced were smaller than tadpoles' oral discs. It is possible that species with few keratinized structures are capable of grazing a broader range of substrate textures if crevices are still narrow, but wider than those that we produced. On substrates with narrow crevices tadpoles with few keratinized structures may be able to poke their whole oral discs into the crevices and reach the food, whereas tadpoles with more keratinized structures may not be able to do the same. If the size of crevices is closer to the size of tadpoles' oral discs, they may depend on the efficiency of their keratinized structures to obtain the food. In this case, a high number of labial tooth rows can be advantageous for tadpoles to graze substrates with more complex textures, as we observed in this study.

Prediction 2: variation in the number of gaps in the labial tooth rows influences differently the growth rate of species grazing upon substrates with different textures

Tadpoles with a different number of gaps in the labial tooth rows (but the same number of tooth rows) are generalists in terms of the efficiency to feed off of surfaces with different surface textures. Despite a general lower performance on striated substrates, tadpoles gained mass and grew well grazing on all the types of surface textures tested. Thus, specific configurations of gaps do not favor tadpoles to feed on specific substrate surface textures, at least for the range of variation that we tested.

All the species selected to test this prediction have the same number of labial tooth rows, are dietary generalists (Rossa-Feres et al., 2004; Prado et al., 2009) and occur in a variety of structurally complex habitats (Prado et al., 2009; Vasconcelos et al., 2011; Schulze et al., 2015). Thus, it is likely that these tadpoles graze on organic material that grows on a diversity of substrates that vary in texture.

We found, though, interesting differences in growth rate among the species. Tadpoles with the most common oral configuration [i.e. LTRF = 2(2)/3(1) seen in *L. fuscus*, *P. nattereri* and *P. cuvieri*, *S. fuscovarius* in our study] performed better than the other species. Such high performances of tadpoles with this particular LTRF suggest a general selective advantage for this type of oral configuration. This can help to explain why this oral configuration is widespread among anuran families, and is found in tadpoles from a wide range of habitats, either lentic and lotic (Orton, 1953; Altig and Johnston, 1989; McDiarmid and Altig, 1999). Other configurations, with either more or less gaps in the labial tooth rows may represent adaptations to other feeding contexts. This includes: specialization in substrates that differ in shape (contoured versus flat), firmness (compact versus the particulate matter at the bottom of ponds), surface orientation (e.g. great performances of *L. fuscus* tadpoles feeding upon a

variety of surface angles, Annibale et al., 2019). These studies, though, remain to be tested. We also encourage future studies to investigate the function of these structures. Whether gaps in labial tooth rows influence the performance of tadpoles on other feeding contexts, understanding the function of these gaps will be enlightening to answer how — e.g. adding mobility to the labial tooth rows while grazing, enabling the jaws to reach larger gapes, modifying the oral disc shape.

Prediction 3: variation in marginal papillae configuration influences differently the food consumption of species grazing upon substrates with different textures

Different hypotheses regarding the function of marginal papillae have been raised through the years. For example, during air-breathing they can prevent water from entering the tadpoles' mouths (Wassersug and Yamashita, 2001). Gradwell (1975) suggested that they help modify the oral disc shape and increase flexibility of oral structures when tadpoles feed on irregular substrates. They have also been hypothesized to increase adherence of the oral disc to the substrate (Altig and Johnston, 1989). We did not test specifically the function of such structures, but we show that variation in marginal papillae configuration can explain differences in tadpoles' ability to acquire food. Tadpoles with more gaps (i.e. ventral and dorsal) in the marginal papillae perform better grazing upon rough substrates whereas the tadpoles with less interrupted rows of marginal papillae consume food with similar efficiencies regardless the substrate texture.

Contrary to our prediction, tadpoles of *L. fuscus* consume as much food on rough as on smooth surfaces. As for lotic species, a marginal papillae row with no emargination and with less gaps can be effective in helping tadpoles adhere to irregular substrates, such as rocks (Altig and Johnston, 1989). Their marginal papillae row, with no indentations and only one dorsal gap, may aid suction to the oral disc on both smooth and rough surfaces.

Emarginations in the marginal papillae are widely used in taxonomy to describe species and differentiate them (e.g. Altig, 1970; Rossa-Feres and Nomura, 2006; Schulze et al., 2015). However, the function of such structure has never been even explored. In our study, emarginations in the marginal papillae were not a good predictor of efficiency in acquiring food. Whether tadpoles have the oral disc emarginated or not, that does not seem to cause differences in feeding performance on substrates with different surface textures; e.g., tadpoles of *L. fuscus*, *P. nattereri* and *S. fuscovarius* consumed the same amount of food on both striated and rough surfaces (Fig. 4).

A higher number of gaps in the marginal papillae seems to restrict the ability of *P. cuvieri* tadpoles to acquire food from smooth and striated surfaces, but improves feeding on rough surfaces. Gaps in marginal papillae row probably reduce the adherence of the oral disc to smooth substrates. However when feeding on substrates with more recesses, gaps may modify the oral disc shape to conform to the irregular substrate (McDiarmid and Altig, 1999; Gradwell, 1975). As such, adherence and adjustment of the oral disc may be improved, increasing the ability of keratinized structures to rake organic material from the substrates.

Tadpoles of *P. cuvieri* however were not able to consume as much food on striated as on smooth surfaces, contrary to our expectations. Also, tadpoles with fewer gaps in the marginal papillae (*L. fuscus*, *P. nattereri* and *S. fuscovarius*) are as able as *P. cuvieri* to consume food on rough substrates. Thus the functional implications of variation in gaps in the marginal papillae rows and of the marginal papillae themselves remain unresolved. More effort is needed to understand the adaptive significance of the variation in the marginal papillae configuration.

Final considerations

The role of morphology on animals ecology is a long standing issue (e.g., since Darwin, 1859) that we pursue for understanding the adaptive significance of variation in anatomical structures among species. Among anuran larvae, variation in oral morphology has been extensively investigated throughout the years. Due to the efforts on functional and adaptive morphology studies, we now have a better understanding about the feeding behavior (Wassersug and Yamashita 2001) of different species (Venesky et al., 2011; 2013) and in different ecological contexts (e.g., different temperatures, de Sousa et al., 2015). In our study, we demonstrated how variation in oral morphology influences the efficiency of tadpoles to remove food from substrates with different surface textures and assimilate that food into growth. We also provide insights about the outcomes of the interaction between oral morphology and substrate surface textures, such as possible specializations in feeding behavior.

Differences in feeding performance can be determinant to influence how species select and partition resources (Pfennig and Murphy, 2002; Higham 2007; Pfennig et al., 2007). That is because there is likely a trade-off between the effort to remove food from substrates and its nutritional gain (Ramamonjisoa et al., 2016; 2017). As such, tadpoles may select substrates by textures upon which they graze with better performances. This, in turn, may lead to specializations in feeding behavior. Differences in feeding efficiency can also lead to shifts in microhabitat use (Pfennig and Murphy, 2002; Pfennig et al., 2007). When tadpoles differ in competitive ability, those that perform better can deplete resources, use chemical interference or even be aggressive towards an inferior competitor (Miller, 1967; Faragher and Jaeger, 1998). As such, tadpoles may forage on other substrates (Pfennig and Murphy, 2002; Pfennig et al., 2007), regardless of whether they perform well or not. Furthermore, variation in

performance to acquire food can also provide evidences to support the adaptive significance of variation in oral morphology (e.g. Losos, 1990; Betz, 2002).

Future studies may find different results by producing other patterns of micro-abrasions on substrates — e.g. a gradient in size of crevices, other types of textures. Also, the number of species tested here corresponded to the possible options given the period in which tadpoles occur and the time dedicated to the experiments. Thus, future studies could invest in testing more species to increase the sampling types of external oral morphology, and testing other types of surface textures to represent a higher range of substrates that tadpoles usually graze upon. In our study, we were not able to discuss extensively how tadpoles use their oral structures when grazing the different textures of substrates. This could have helped us explain why species differ in feeding performance. Thus, we encourage future studies to test the function of gaps in labial tooth rows, gaps and emarginations in the marginal papillae row, and the marginal papillae themselves. There is a need as well to elucidate other factors that may limit tadpoles' ability to access nutrients. These include additional features of the substrate texture and topography, physical obstacles that modify access to food, the addition of other tadpoles to the system (hetero- or con-specifics), and tadpoles' feeding kinematics when grazing on different types of textures. Finally, more classic natural history would help us understand where and how tadpoles live (Wainwright, 1991; Peres-Neto, 1999; Wassersug, 2000).

REFERENCES

- ALTIG, R. 1970. A key to the tadpoles of the continental United States and Canada. *Herpetologica* 26(2):180–207.
- ALTIG, R. 2006. Discussions of the origin and evolution of the oral apparatus of anuran tadpoles. *Acta Herpetol.* 1(2):95–105.
- ALTIG, R. & BRODIE, E.D. 1972. Laboratory behavior of *Ascaphus truei* tadpoles. *J. Herpetol.* 6(1):21–24.
- ALTIG, R. & JOHNSTON, G.F. 1989. Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies, and habitats. *Herpetol. Monogr.* 3(1989):81–109.
- ANNIBALE, F.S., DE SOUSA, V.T.T., DE SOUSA, C.E., VENESKY, M.D., ROSSA-FERES, D.C., NOMURA, F. & WASSERSUG, R.J. 2019. Influence of substrate orientation on tadpoles' feeding efficiency. *Biol. Open* 8(1):bio037598.
- BETZ, O. 2002. Performance and adaptive value of tarsal morphology in rove beetles of the genus *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). *J. Exp. Biol.* 205(8):1097–1113.
- CLISSOLD, F.J., SANSON, G.D., READ, J. & SIMPSON, S.J. 2009. Gross vs. net income: How plant toughness affects performance of an insect herbivore. *Ecology* 90(12):3393–3405.
- DARWIN, C. 1859. *On the Origin of Species*. John Murray, London, UK.
- DITSCHKE, P., WAINWRIGHT, D.K. & SUMMERS, A.P. 2014. Attachment to challenging substrates - fouling, roughness and limits of adhesion in the northern clingfish (*Gobiesox maeandricus*). *J. Exp. Biol.* 217(14):2548–2554.
- DUDLEY, T.L. & D'ANTONIO, C.M. 1991. The effects of substrate texture, grazing, and disturbance on macroalgal establishment in streams. *Ecology* 72(1):297–309.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press Baltimore and London, EUA.
- EVANS, A.R. & PINEDA-MUNOZ, S. 2018. Inferring mammal dietary ecology from dental morphology. In *Methods in Paleoecology* Springer International Publishing, p.37–51.
- FARAGHER, S.G. & JAEGER, R.G. 1998. Tadpole bullies: examining mechanisms of competition in a community of larval anurans. *Can. J. Zool.* 76:144–153.
- GOSNER, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16(3):183–190.
- GRADWELL, N. 1975. The bearing of filter feeding on the water pumping mechanism of *Xenopus* tadpoles (Anura: Pipidae). *Acta Zool.* 56:119–128.
- GRANT, P.R. & GRANT, B.R. 2002. Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin's finches. *Science* (80-.). 296(5568):707–711.
- HANLON, S.M., LYNCH, K.J., KERBY, J.L. & PARRIS, M.J. 2015. Environmental substrates alter survival and foraging efficiencies in tadpoles. *Herpetol. Conserv. Biol.* 10(1):180–188.
- KLOH, J.S., FIGUEREDO, C.C. & ETEROVICK, P.C. 2019. How close is microhabitat and diet association in aquatic ecomorphotypes? A test with tadpoles of syntopic species. *Hydrobiologia* 828(1):271–285.
- LOSOS, J.B. 1990. Ecomorphology, performance capacity and scaling of West Indian *Anolis* lizards: an evolutionary analysis. *Ecol. Monogr.* 60(3):369–388.
- MAIA, C.M. & VOLPATO, G.L. 2013. Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. *Zoology* 116(1):64–66.
- MCDIARMID, R.W. & ALTIG, R. 1999. *Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- MILLER, R.S. 1967. Pattern and process in competition. *Adv. Ecol. Res.* 41–74.
- ORTON, G.L. 1953. The systematics of vertebrate larvae. *Syst. Zool.* 2(2):63–75.

- PELINSON, R.M., GAREY, M. V. & ROSSA-FERES, D.C. 2016. Effects of grazing management and cattle on aquatic habitat use by the anuran *Pseudopaludicola mystacalis* in agro-savannah landscapes. PLoS One 11(9):1–14.
- PERES-NETO, P.R. 1999. Alguns métodos e estudos em ecomorfologia de peixes de riachos. Oecologia Bras. 06(01):209–236.
- PFENNIG, D.W. & MURPHY, P.J. 2002. How fluctuating competition and phenotypic plasticity mediate species divergence. Evolution (N. Y). 56(6):1217–1228.
- PFENNIG, D.W., RICE, A.M. & MARTIN, R.A. 2007. Field and experimental evidence for competition's role in phenotypic divergence. Evolution (N. Y). 61(2):257–271.
- PRADO, V.H.M., FONSECA, M.G., DE ALMEIDA, F.V.R., NECCHI, O. & ROSSA-FERES, D.C. 2009. Niche occupancy and the relative role of micro-habitat and diet in resource partitioning among pond dwelling tadpoles. South Am. J. Herpetol. 4(3):275–285.
- RAMAMONJISOA, N., RAKOTONOELY, H. & NATUHARA, Y. 2016. Animal or algal materials: food toughness, food concentration, and competitor density influence food choice in an omnivorous tadpole. Herpetologica 72(2):114–119.
- RAMAMONJISOA, N., RAKOTONOELY, H. & NATUHARA, Y. 2017. Food preference in relation to resource toughness and protein level in a pond dwelling tadpole. J. Herpetol. 51(1):47–51.
- ROSSA-FERES, D.C., JIM, J. & FONSECA, M.G. 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). Rev. Bras. Zool. 21(4):745–754.
- ROSSA-FERES, D.C. & NOMURA, F. 2006. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. Biota Neotrop. 6(1):.
- SANTOS, F.J.M., PROTÁZIO, A.S., MOURA, C.W.N. & JUNCÁ, F.A. 2016. Diet and food resource partition among benthic tadpoles of three anuran species in Atlantic Forest tropical streams. J. Freshw. Ecol. 31(1):53–60.
- SCHULZE, A., JANSEN, M. & KOÖHLER, G. 2015. Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: Molecular identification, morphological characterisation, and ecological assignment.
- VAN DIJK, D.E. 1981. Material data other than preserved specimens. Monit. Zool. Ital. 15(May 2015):393–400.
- VASCONCELOS, T. da S., DOS SANTOS, T.G., ROSSA-FERES, D.C. & HADDAD, C.F.B. 2011. Spatial and temporal distribution of tadpole assemblages (Amphibia, Anura) in a seasonal dry tropical forest of southeastern Brazil. Hydrobiologia 673(1):93–104.
- VENESKY, M.D., ROSSA-FERES, D.C., NOMURA, F., DE ANDRADE, G. V., PEZZUTI, T.L., DE SOUSA, V.T.T., ANDERSON, C. V. & WASSERSUG, R.J. 2013. Comparative feeding kinematics of tropical hylid tadpoles. J. Exp. Biol. 216(10):1928–1937.
- VENESKY, M.D., WASSERSUG, R.J. & PARRIS, M.J. 2010a. How does a change in labial tooth row number affect feeding kinematics and foraging performance of a ranid tadpole (*Lithobates sphenoccephalus*)? Biol. Bull. 218(2):160–168.
- VENESKY, M.D., WASSERSUG, R.J. & PARRIS, M.J. 2010b. The impact of variation in labial tooth number on the feeding kinematics of tadpoles of southern leopard frog (*Lithobates sphenoccephalus*). Copeia (3):481–486.
- VENESKY, M.D., WASSERSUG, R.J. & PARRIS, M.J. 2011. Comparative feeding kinematics of temperate pond-dwelling tadpoles (Anura, Amphibia). Zoomorphology 130:31–38.
- VERA CANDIOTI, M.F. 2007. Anatomy of anuran tadpoles from lentic water bodies:

- systematic relevance and correlation with feeding habits. *Zootaxa* 1–175.
- VERA CANDIOTI, M.F. & ALTIG, R. 2010. A survey of shape variation in keratinized labial teeth of anuran larvae as related to phylogeny and ecology. *Biol. J. Linn. Soc.* 101(3):609–625.
- WAINWRIGHT, D.K., KLEINTEICH, T., KLEINTEICH, A., GORB, S.N. & SUMMERS, A.P. 2013. Stick tight: suction adhesion on irregular surfaces in the northern clingfish. *Biol. Lett.* 9(3):1–5.
- WAINWRIGHT, P.C. 1991. Ecomorphology: experimental functional anatomy for ecological problems. *Am. Zool.* 31(December 1989):680–693.
- WASSERSUG, R. 2000. Tadpoles: The biology of anuran larvae. *Copeia* 41125–1134.
- WASSERSUG, R.J. 1975. The adaptive significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in anurans. *Am. Zool.* 15(2):405–417.
- WASSERSUG, R.J. & YAMASHITA, M. 2001. Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 131183–195.
- XIMENEZ, S.S., GONÇALVES, T.P., OLIVEIRA, M.C.L.M. & TOZETTI, A.M. 2012. Substrate color selection by tadpoles of *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura, Leiuperidae). *Panam. J. Aquat. Sci.* 7(2):111–116.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table 1. Mean and standard deviation of measurements, absolute and relative growth of tadpoles.

Measurements									Absolute *			Relative (%)		
Species	n	Treatment	Body size (mm)		Total size (mm)		Mass (mg)		Body size	Total size	Mass	Body size	Total size	Mass
			Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Mean ± sd	Mean ± sd	Mean ± sd	Mean ± sd	Mean ± sd	Mean ± sd
<i>D. minutus</i>	12	Smooth	9.0±0.8	10.0±0.5	25.7±2.0	31.1±1.8	167.8±38.4	253.8±35	0.9±0.6	5.4±1.2	86.0±20.4	0.11±0.08	0.21±0.06	0.55±0.21
	12	Striated	8.4±0.9	9.5±1.0	25.0±3.2	29.4±3.0	153±47.8	221.3±62.8	1.1±0.5	4.4±1.7	68.4±19.7	0.13±0.06	0.18±0.08	0.47±0.12
	12	Rough	9.0±1.4	10.2±1.3	26.9±3.7	30.5±3.8	180±62.1	238.4±75.7	1.2±0.6	3.5±1.5	58.5±27.4	0.15±0.09	0.14±0.06	0.35±0.17
<i>S. fuscovarius</i>	12	Smooth	9.0±0.8	10.2±0.4	25.6±2.0	32.9±3.0	191.1±38.5	369.1±45.9	1.3±0.7	7.3±2.8	178.0±20.6	0.15±0.09	0.29±0.12	0.96±0.22
	12	Striated	8.3±0.4	9.9±0.7	25.7±2.5	32.7±2.4	175.1±26.2	340.2±48.4	1.6±0.7	6.7±2.0	165.2±26.8	0.19±0.08	0.28±0.10	0.95±0.13
	12	Rough	8.4±0.8	9.9±0.8	25.3±2.7	32.6±3.0	167.2±41.3	333.7±70.7	1.5±0.3	7.3±1.6	166.5±36.4	0.18±0.05	0.29±0.07	1.02±0.22
<i>H. albopunctatus</i>	12	Smooth	8.9±0.8	10.5±0.6	29.0±2.5	33.7±2.2	155.0±33.3	244.0±42.9	1.5±0.6	4.7±1.5	88.9±30.0	0.18±0.07	0.16±0.06	0.60±0.24
	12	Striated	8.8±0.4	10.0±0.8	28.4±2.0	32.5±2.1	151.9±24.0	217.8±31.2	1.1±0.9	4.1±1.8	65.8±27.7	0.13±0.10	0.15±0.07	0.45±0.22
	12	Rough	8.0±0.7	9.3±0.7	26.0±2.7	30.8±2.2	128.6±32.1	197.6±36.6	1.3±0.7	4.7±2.3	72.4±27.8	0.17±0.10	0.19±0.10	0.58±0.21
<i>H. raniceps</i>	8	Smooth	14.1±1.3	15.9±1.6	54.2±6.6	58.7±4.5	769.8±205.0	939.0±205.6	1.8±1.0	4.6±2.8	169.2±94.1	0.13±0.08	0.09±0.07	0.25±0.18
	7	Striated	14.3±1.6	16.5±1.6	58.7±6.2	62.1±5.3	906.1±293.6	991.8±279.1	2.2±1.1	3.4±1.3	85.7±38.0	0.16±0.09	0.06±0.02	0.11±0.06
	7	Rough	16.2±1.0	17.6±1.1	61.3±3.1	64.0±2.0	1060.1±179.0	1193.2±171.0	1.4±0.7	2.6±1.3	133.2±29.8	0.09±0.04	0.05±0.02	0.13±0.04
<i>L. fuscus</i>	15	Smooth	6.6±0.4	10.9±0.7	18.8±1.6	33.0±1.9	59.62±10.1	328.3±40.2	4.3±0.7	14.2±2.2	268.7±40.2	0.64±0.13	0.77±0.16	4.64±1.10
	15	Striated	6.3±0.4	9.8±0.6	17.0±2.4	30.0±2.3	50.66±8.6	248.3±49.3	3.5±0.7	12.9±3.4	197.7±45.8	0.55±0.13	0.80±0.35	3.96±0.85
	15	Rough	6.5±0.4	10.4±0.5	18.7±1.9	32.6±2.6	57.0±11.0	297.8±38.6	4.0±0.4	13.9±1.9	240.9±33.7	0.62±0.09	0.75±0.14	4.36±0.97
<i>L. podicipinus</i>	11	Smooth	8.7±0.5	10.0±0.6	22.8±1.2	27.9±1.4	127.3±13.5	188.2±20.8	1.3±0.7	5.1±1.4	60.9±13.8	0.15±0.09	0.22±0.06	0.48±0.11
	11	Striated	9.0±0.5	10.1±0.8	23.0±1.4	28.7±1.4	147.9±16.4	202.1±23.1	1.1±0.8	5.7±0.6	54.2±23.9	0.13±0.10	0.25±0.03	0.38±0.19
	11	Rough	8.6±0.4	10.0±0.7	21.2±2.0	27.4±2.3	125.0±24.4	184.2±45.4	1.4±0.6	6.3±1.3	59.2±30.6	0.16±0.08	0.30±0.07	0.48±0.25
<i>P. cuvieri</i>	12	Smooth	6.4±0.4	8.3±0.4	18.5±2.9	25.6±1.9	69.9±14.6	161.0±28.5	1.9±0.4	7.0±2.5	91.2±20.4	0.30±0.09	0.41±0.28	1.34±0.38
	11	Striated	6.5±0.5	7.9±0.8	18.9±1.2	24.3±1.6	65.4±12.0	133.9±32.0	1.4±0.6	5.5±1.4	68.5±25.2	0.21±0.09	0.29±0.08	1.05±0.39
	12	Rough	6.4±0.4	7.9±0.5	17.8±1.1	24.2±2.0	62.6±12.7	137.9±29.3	1.5±0.4	6.3±1.3	75.2±20.5	0.23±0.06	0.36±0.07	1.21±0.28
<i>P. nattereri</i>	15	Smooth	7.6±0.9	10.7±1.2	20.8±2.3	31.0±3.6	88.0±21.7	284.9±87.0	3.1±0.8	10.3±2.8	196.9±73.1	0.41±0.12	0.50±0.15	2.24±0.71
	15	Striated	7.5±0.6	10.1±1.1	20.5±2.6	29.7±3.5	84.9±19.12	258.3±82.5	2.6±0.9	9.2±3.7	173.4±74.9	0.34±0.12	0.47±0.25	2.09±0.86
	15	Rough	7.5±0.6	10.3±1.0	20.6±2.0	30.2±3.9	85.0±20.6	269.1±83.1	2.8±0.9	9.6±3.7	184.0±80.7	0.38±0.13	0.47±0.19	2.25±1.00
<i>P. mystacalis</i>	6	Smooth	7.1±0.5	8.5±0.6	20.2±2.6	25.0±1.9	88.2±20	124.5±18.2	1.3±0.2	4.8±1.3	36.3±10.1	0.19±0.04	0.25±0.08	0.43±0.15
	6	Striated	7.3±0.8	8.0±0.7	20.3±2.8	23.6±2.4	85.4±22.4	102±25.2	0.7±0.4	3.2±1.4	16.5±11.1	0.09±0.06	0.17±0.09	0.20±0.14
	9	Rough	6.9±1.1	8.0±1.0	20.0±3.0	23.1±2.4	87.7±36.4	123.1±55.7	1.1±0.4	3.1±1.7	35.4±28.0	0.17±0.07	0.16±0.10	0.43±0.25

n: sampling number of tadpoles;
* Absolute measure: difference between final and initial measures.

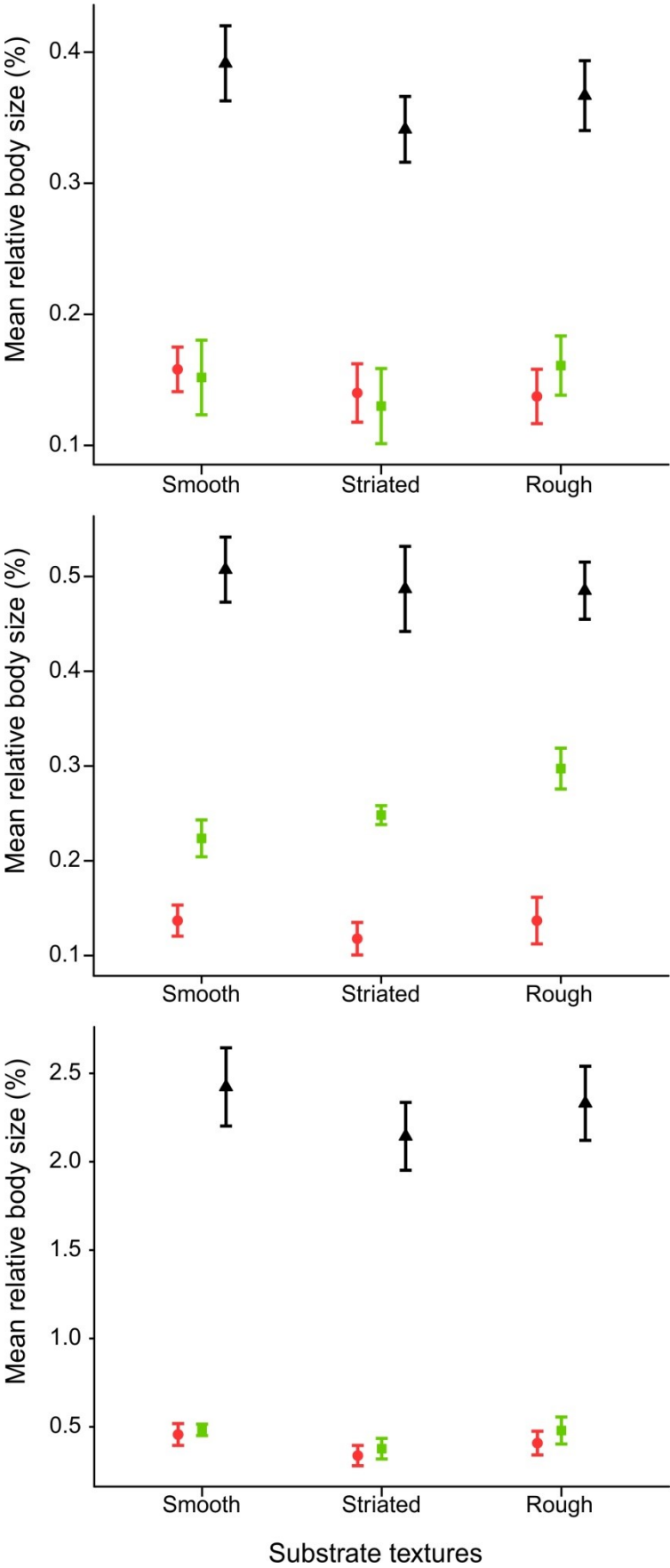


Fig. 1 Textures and gaps in the labial tooth rows. The effect of substrate textures is shown on the (A) relative body size, (B) total size, and (C) mass of species with variations in the number of gaps in the labial tooth row formula 2/3. (A) Tadpoles had a lower increase in body length (two-way ANOVA) and (C) gained less mass (two-way ANCOVA) feeding on striated surfaces (both tests: $p < 0.05$). (B) Substrates textures did not affect tadpoles' relative total size (two-way ANOVA, $F = 0.74$, $p = 0.47$). Species with the most common LTRF [2(2)/3(1)] had the best performances than the other species (two-way ANCOVA, $F = 283.81$, $p < 0.001$). Schematic illustrations of keratinized structures of tadpoles' oral disc are provided beside the species names in the graph legend. Structures in red represent the variation in the number and position of gaps in tadpoles' labial tooth rows among species.

CONCLUSÕES GERAIS

Estudos descritivos e experimentais vêm contribuindo com o conhecimento sobre as relações entre a morfologia e a ecologia de girinos. Através desses estudos, uma série de mudanças em terminologias e métodos vem sendo propostas e incorporadas para melhorar as pesquisas nessa área. Com isso, a produção científica sobre a ecomorfologia de girinos vem aumentando ao longo do tempo, com estudos publicados em revistas de alta visibilidade e influência, e majoritariamente em um idioma. Autores de países em desenvolvimento estão entre os que mais produzem estudos nessa área, porém o impacto desses trabalhos ainda não é tão alto. Existem ainda diversas lacunas no conhecimento que precisam ser consideradas em estudos futuros, principalmente em regiões neotropicais, onde a diversidade das larvas é alta.

Em nossos estudos experimentais nós concluímos que a orientação e a textura dos substratos onde girinos removem alimento podem influenciar o desempenho da alimentação das larvas. Além disso, diferenças no desempenho dos girinos são influenciadas pela variação interespecífica na morfologia oral externa. Girinos com morfologias semelhantes possuem também desempenhos semelhantes.

Quando girinos se alimentam em substratos onde o alimento é disposto em diferentes orientações, a natação e a flutuação dos girinos também podem influenciar o desempenho das espécies.

A variação no desempenho dos girinos que se alimentam em substratos com diferentes texturas é influenciada pelas diferenças no número de fileiras de dentes labiais e na configuração das papilas marginais entre as espécies, mas não pelo número de *gaps* em fileiras de dentes labiais.