

Temperatura crítica máxima, tolerancia al
frío y termopreferendum del tritón del
Montserrat (*Calotriton arnoldii*)

Universitat de Barcelona

Jenifer Contreras Cisneros

Centre de Recuperació de Fauna Salvatge de Torreferrussa

Director/a:

Joan Goma
Departamento de Biología,
Ecología y Ciencias
Ambientales

Tutor/a:

Alberth Montori Faura
Departamento de Biología,
Ecología y Ciencias
Ambientales

Màster de Biodiversitat

Data de presentació



Facultat de Biologia

Temperatura crítica máxima, tolerancia al frío y termopreferendum del tritón del Montseny (*Calotriton arnoldii*),

Universitat de Barcelona

Jenifer Contreras Cisneros

Centre de Recuperació de Fauna Salvatge de Torreferrussa

Master de Biodiversitat, Data de presentació

Estudiante:
Jenifer Contreras Cisneros

Director:
Joan Goma
Departamento de Biología,
Ecología y Ciencias
Ambientales

Tutor:
Alberth Montori Faura
Departamento de Biología,
Ecología y Ciencias
Ambientales

Abstract

During the last 100 years the planet has increased its temperature rapidly, this climate change could bring catastrophic effects for organisms. One of the most affected groups is the ectotherms, due to their direct dependence on the temperature. In recent years there have been several studies on the effects of temperature on several species of ectotherms. However, there are species whose thermal tolerances are still unknown. Such is the case of *Calotriton Arnoldi*, a critically endangered species, endemic to the Montseny in Spain and whose thermal biology is unknown. For this reason, three experiments were carried out on 60 individuals from the western and eastern population of *C. arnoldi* (males, females, juveniles and larvae), these experiments were focused on obtaining the CTMax, cold tolerance and thermopreferendum of this species in experimental conditions. The results obtained showed that the CTMax of the species exceeded 31°C, with a difference between the two populations, which could be due to differences in habitat. On the other hand, it was found that the species is good tolerating low temperatures (1°C), this could be due to the fact that the species, in its natural state, lives in high areas and in cold waters below 15°C. However, although the thermopreferendum of the species was expected to trend to cold temperatures, some individuals chose relatively high temperatures, obtaining a range of 11.7°C to 21.6°C. The results presented in this study are an advance in the knowledge of the thermal physiology of this species and support the importance of the temperature of the torrent on its survival. Knowing their thermal limits and their preferred temperature range will help to propose management measures that promote the conservation of torrents and vegetation cover to mitigate the temperature increase due to climate change.

Contenido

1. Introducción:	1
2. Metodología:	3
2.1 General:	3
2.2 Normas de Bioseguridad utilizadas	3
2.3 Temperatura crítica máxima (TCM _{máx})	4
2.4 Tolerancia al frío	5
2.5 Temperatura corporal preferida (Tp)	6
2.6 Análisis estadístico.....	8
3. Resultados:	9
3.1 Temperatura crítica máxima (TCM _{máx})	9
3.2 Tolerancia al frío.....	14
3.3 Temperatura preferida (Termopreferendum)	15
4. Discusión:	20
4.1 La tolerancia térmica de la especie <i>Calotriton arnoldi</i>	20
4.2 Rango de Temperatura corporal preferida (Tp) del Tritón del Montseny en el laboratorio.....	22
4.3 Implicaciones ecológicas y medidas de gestión	24
5. Conclusiones:	26
6. Agradecimientos:	27
7. Bibliografía:	27

1. Introducción:

En los últimos 100 años el planeta ha venido incrementando su temperatura rápidamente (Mearns *et al.*, 2001), tan solo entre los años 2006 y 2017 se ha observado un incremento de 0,87°C en la temperatura del planeta. Cabe recalcar que esta problemática ha sido producida por la acción antrópica y en concreto por el desarrollo industrial. Se estima que si el planeta supera un incremento de 1,5°C, la vida tal y como la conocemos no será la misma (Allen *et al.*, 2018). Se ha observado que a pesar de que las especies han soportado ciertos incrementos de temperatura a lo largo de su evolución, la velocidad con la cual la temperatura está cambiando en el planeta actualmente, no permitirá una adaptación por parte de las especies silvestres a estos cambios y pondrá en riesgo su supervivencia (Schneider & Root, 1998)

En las últimas décadas se han realizado una gran cantidad de estudios que demuestran los efectos que tienen los cambios de temperatura en distintos grupos de organismos (Parmesan & Yohe, 2003; Šamajová & Gvoždík, 2009; Dillon *et al.*, 2010). Uno de los grupos más afectados por el calentamiento global son los ectotermos entre ellos las salamandras y tritones (Dillon *et al.*, 2010), debido a que la temperatura afecta a estos organismos en todos sus niveles de organización, desde los procesos celulares hasta los procesos enzimáticos (Hochachka & Somero 2002). Estos procesos determinan ciertos rasgos entre los cuales se encuentran: el crecimiento, la reproducción, el metabolismo, las relaciones parasitarias, la supervivencia y el rango de distribución (Spotila, 1972; Gvoždík, 2012, 2015; Gvoždík & Kristín, 2017; Teixeira & Arntzen, 2002). En estudios previos se ha podido evidenciar los efectos que tiene el cambio climático en ectotermos de la Península Ibérica. En reptiles se observó un cambio latitudinal hacia el norte relacionado con el cambio climático (Moreno-Rueda *et al.*, 2012). En anfibios, por el contrario se observó un cambio de rango latitudinal hacia el sur y un cambio altitudinal hacia zonas de montaña. Sin embargo, este cambio de distribución en anfibios es bastante lento en relación al rápido cambio que están sufriendo sus ecosistemas en la Península (Enriquez-Urzelai *et al.*, 2019).

Debido a la importancia que tiene la temperatura en la biología y fenología de los ectotermos, muchos de estos organismos mantienen su temperatura corporal en un rango de temperatura preferido, el cual es característico de la especie. Sin embargo, esta temperatura podría variar debido a procesos fisiológicos como la aclimatación o termorregulación, esto les permitiría a los organismos fijar un nuevo rango de temperatura corporal preferida y afrontar de esta manera los cambios de temperatura (Gvozdik, 2005 ;Gvozdik, 2012; Young & Gifford, 2013). Sin embargo, procesos como la aclimatación

necesitan de una escala temporal grande, siendo poco efectiva contra cambios bruscos de temperatura (Young & Gifford, 2013).

Dados estos antecedentes es necesario conocer que sucede con ectotermos poco estudiados y de los cuales no se conoce ni su temopreferendum ni los rangos críticos característicos de la especie. Este es el caso de una especie de urodelo autóctono de Cataluña, el tritón del Montseny (*Calotriton arnoldi*). Esta especie de tritón muestra un reducido rango de distribución geográfica y con endemismo restringido al macizo del Montseny, ubicado en la península Ibérica. En el macizo se han podido localizar dos grupos de poblaciones claramente diferenciados, las poblaciones orientales y occidentales, las cuales no presentan flujo génico, y sí ciertas diferencias morfológicas (Carranza & Amat, 2005; Valbuena-Ureña *et al.*, 2013). Estos tritones ocupan exclusivamente torrentes de fuertes pendientes, con aguas frías que no sobrepasan los 15°C y con concentraciones de oxígeno elevadas (Montori & Campeny, 1991). Esta especie se encuentra en peligro crítico de extinción según la UICN (Carranza & Martínez-Solano, 2011; IUCN, 2009. Consultado: 01 de agosto de 2019). Su supervivencia se ha visto principalmente afectada por la tala y la deforestación, principalmente de hayedos, los cuales ofrecen suficiente cobertura para que la temperatura del agua no aumente en demasía (Amat, 2005). El calentamiento global es otro factor que afecta a esta especie, se ha estimado que en un siglo la temperatura media ambiental del Montseny ha aumentado 1,5°C. Si continúa aumentando podría producir períodos de sequía y causar mortalidad en los individuos de *C. arnoldi* (Peñuelas & Boada, 2003).

Debido a la relación que existe entre la temperatura y algunas especies de salamandras y tritones (Layne & Claussen, 1982; Šamajová & Gvoždík, 2009; Gvozdik, 2012; Young & Gifford, 2013; Gvoždík & Kristín, 2017), es imperativo conocer cómo la especie *C. arnoldi*, se comporta ante las variaciones de temperatura, un estudio que hasta el momento no se había realizado, y de esta manera poder plantear medidas de gestión que permitan minimizar los efectos de este aumento térmico. Por tal motivo, este trabajo se enfoca en tres objetivos principales 1) Determinar la temperatura crítica máxima (TCM_{áx}) a la que pueden ser sometidos los tritones antes de llegar a su temperatura letal y observar su comportamiento a altas temperaturas, 2) Determinar la tolerancia por parte de los tritones a temperaturas frías hasta 1°C. De esta forma podremos reconocer si su temperatura crítica mínima es inferior a esta temperatura y saber que sucede con los tritones cuando la temperatura del agua baja y, 3) Determinar la temperatura corporal preferida para *C. arnoldi*, para poder conocer un poco más sobre la biología de esta especie y sus rangos de temperatura preferidos en situaciones experimentales.

2. Metodología:

2.1 General:

Se ha trabajado exclusivamente con ejemplares de *C. arnoldi* mantenidos en el Centro de Recuperación de Fauna Salvaje de Torreferrussa, ubicado en Santa Perpetua de la Mogoda en Barcelona – España. Estos tritones se encuentran mantenidos en acuarios cuya temperatura oscila entre los 9°C en invierno y los 15°C en verano y con luces que se encienden y apagan cíclicamente simulando los fotoperiodos naturales. Las dos poblaciones, oriental y occidental, se encuentran separadas dentro del centro para evitar el contacto entre sí y así mantener la separación genética de las poblaciones. Por tal motivo, los experimentos diseñados se realizaron en tiempos distintos, es decir, primero se realizó la experimentación de calor con la población occidental y luego con la población oriental. En el mismo orden se realizaron las experimentaciones para las temperaturas frías y para el termopreferendum.

Los estudios fueron realizados durante los meses de abril, mayo, junio y julio del 2019. Se escogieron 30 individuos de cada población correspondientes a 5 grupos diferentes (6 machos adultos, 6 hembras adultas, 6 juveniles metamórficos, 6 larvas nacidas en el 2017 y 6 larvas nacidas en el 2018). Cada grupo fue sometido a los tres experimentos antes mencionados y que se describirán más adelante, para medir su tolerancia a temperaturas elevadas, temperaturas bajas y su preferencia de temperatura en el canal de agua.

2.2 Normas de Bioseguridad utilizadas

Para la realización de estos experimentos fue necesario tener ciertas normas de seguridad estrictas por tratarse de una especie considerada en peligro de extinción, para evitar que los individuos contraigan alguna enfermedad o que puedan fallecer durante la experimentación.

Cada persona que iba a entrar en contacto con los tritones tenía que lavarse las manos con iodo y utilizar guantes quirúrgicos, para evitar el traspaso de algún contaminante a los instrumentos o a los individuos. Todos los instrumentos de laboratorio y materiales que iban a entrar en contacto con el agua, en donde estarían sumergidos los tritones, tenían que ser desinfectados con alcohol o desinfectante y aclarados con agua antes de cada experimentación y entre cada grupo de individuos. El agua igualmente debía ser cambiada entre cada grupo de individuos y sobre todo entre ambas poblaciones para evitar el contagio

de algún patógeno. Cada grupo de individuos sometido a los experimentos fue observado por más de un investigador, para analizar las señales, determinar el final de las experimentaciones, y evitar que pueda ocurrir algún incidente

Es importante mencionar que ninguno de los 60 individuos utilizados para la experimentación sufrió daño alguno, y todos fueron regresados a sus acuarios al finalizar los experimentos. Se pudo observar que todos volvían a la normalidad después de unos segundos de haber sido colocados a la temperatura de estabulación.

2.3 Temperatura crítica máxima (TCM_{máx})

Este experimento fue realizado a partir del 8 de abril hasta el 24 de abril del 2019. Para el experimento de TCM_{máx} se realizó un procedimiento parecido al utilizado por Spotila (1972) y por Lutterschmidt y Hutchison (1997). Los 60 individuos de las dos poblaciones de *C. arnoldi* antes de la experimentación se encontraban aclimatados a una temperatura promedio de 11,3°C. Esta temperatura se asemejaba a las condiciones de temperatura naturales de los torrentes del Montseny. Como se mencionó anteriormente primero se realizó la experimentación de los individuos de la población occidental y posteriormente de la población oriental.

Se colocaron en grupos de 6 individuos comenzando con los machos, seguido de las hembras, juveniles, larvas del 2017 y finalmente larvas del 2018. Cada individuo fue pesado y posteriormente fue colocado en una canastilla de malla fina de metal de 8,5 cm de diámetro x 8 cm de profundidad, cada canastilla tenía una tapa hecha de malla de plástico para evitar que los tritones escapen. Las 6 canastillas fueron colocadas en un tanque de acero de 21 cm de ancho x 51 cm de largo x 45 cm de profundidad, el cual estaba lleno con 18 litros de agua que provenía de los acuarios y por lo tanto se encontraba a la misma temperatura a la cual se encontraban aclimatados los tritones. Para calentar el agua se utilizó una unidad termostática de inmersión "Digit cool" de J.P Selecta (Figura 1). La temperatura se fue incrementando en 1°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) cada 3 minutos, para tomar la temperatura y la saturación de oxígeno se utilizó un multimedidor digital HQ40D de Hach. El punto final del experimento fue el mismo considerado por otros autores, un set de espasmos continuos y pérdida de la locomoción o respuesta ante estímulos (Lutterschmidt & Hutchison, 1997). Para determinar la respuesta ante los estímulos se utilizó un agitador suave de goma con el cual se tocaba levemente a los individuos para observar su reacción.

Mientras la temperatura iba incrementando se observaron y registraron otras señales en algunos individuos. Entre estas señales se encontraban el vómito, movimiento de la cabeza de un lado a otro y espasmos esporádicos. Estas señales se analizarán posteriormente en la sección de Resultados.

2.4 Tolerancia al frío

Este procedimiento fue realizado entre el 20 de mayo y el 7 de junio del 2019, cuando la temperatura promedio en los acuarios se encontraba en 12,7°C. Se procedió con una metodología similar que en la experimentación con calor, se utilizaron 60 individuos por población, en los adultos se utilizaron los mismos individuos chipados que se utilizaron anteriormente y fueron evaluados en el mismo orden que en el experimento antes mencionado. Se utilizó la unidad termostática de inmersión “Digit cool” de J.P Selecta (Figura 1) para enfriar el agua del tanque, donde la temperatura fue decreciendo en 1°C (\pm 0,4°C) cada 3 minutos. Igualmente se registró la temperatura y la saturación de oxígeno presente en el agua con el multimedidor digital HQ40D de Hach. El punto final del experimento fue 1°C debido a que por problemas con el enfriador no se pudo probar temperaturas bajo cero y determinar el TCmin exacto. Igualmente se anotó cada observación y se registró la respuesta a estímulos por parte de los tritones como en el experimento anterior.



Figura 1. Diseño experimental utilizado para medir la Temperatura crítica máxima y la tolerancia al frío de *Calotriton arnoldi*.

2.5 Temperatura corporal preferida (Tp)

Los experimentos de termopreferendum se llevaron a cabo del 4 al 19 de julio del 2019, cuando la temperatura promedio del agua de los acuarios se encontraba en 14,5°C, temperatura a la cual los individuos se encontraban aclimatados. El experimento fue realizado en una habitación iluminada, que se encontraba a 19°C. Para realizar este experimento fue necesario formar un gradiente de temperatura en agua. Para esto se contó con un canal de tubo PVC de 1,50 metros de largo por 20 cm de diámetro. Este tubo fue dividido en tres secciones: la primera sección de 25cm, la segunda sección de 1m que fue donde se formó el gradiente de temperatura y la tercera sección de 25cm. Las tres secciones fueron separadas entre sí con discos de malla metálica fina. En el fondo de la segunda sección, se colocó aproximadamente 10cm de grava y por encima de este 2 cm de agua proveniente de los acuarios. En uno de los extremos del tubo se colocó una fuente de calor (calentador de agua) conectada a un termostato que mantenía la temperatura de ese extremo a 28°C. En el otro extremo se colocó una fuente de frío, que fue la misma unidad

termostática de inmersión utilizada en los experimentos anteriores, la cual mantenía la temperatura de ese extremo a 3,5°C. Dentro del canal se colocaron esponjas cada 10 cm, con un agujero para que pasen los tritones, que evitaban el movimiento convectivo o circulación del agua y de esta manera formar un gradiente más estable (Figura 2).

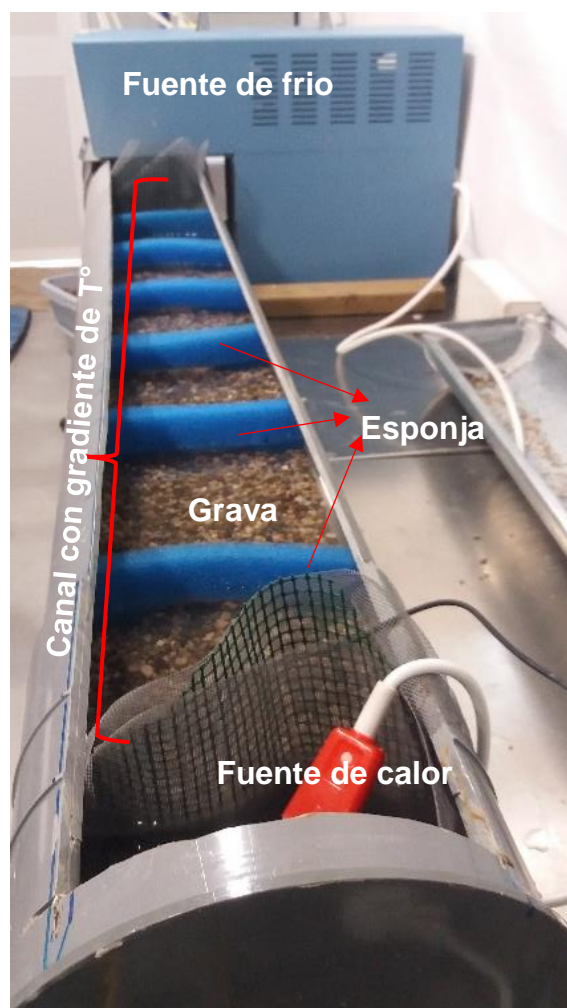


Figura 2. Canal de Termopreferendum utilizado para medir la Temperatura corporal preferida de *Calotriton arnoldi*.

Es importante recalcar que para que el gradiente funcione correctamente no es necesario contar con canales metálicos como los utilizados por otros autores en experimentos de termopreferendum (Balogová & Gvoždík, 2015; Gvoždík & Kristín, 2017; Šamajová & Gvoždík, 2009), más bien es indispensable utilizar fuentes de calor y de frío constantes, una superficie que mantenga la temperatura estable en cada zona (en este caso la grava) y utilizar elementos que impidan que haya demasiada circulación del agua dentro del canal (ej. esponjas).

Una vez formado el gradiente se tomó la temperatura cada 5cm, con un termómetro K de rápida respuesta de la marca HIBOK 14. El gradiente que se formó iba desde 3,5°C hasta 28°C, el incremento de temperatura a lo largo del gradiente exceptuando los extremos fue bastante homogéneo, incrementándose 1°C aproximadamente cada 5cm (Figura 3). Luego se procedió a colocar a los individuos en el mismo orden de los experimentos anteriores. Sin embargo, para este experimento no se utilizaron las larvas debido a que su tamaño era demasiado pequeño y por precaución no se realizó el experimento.

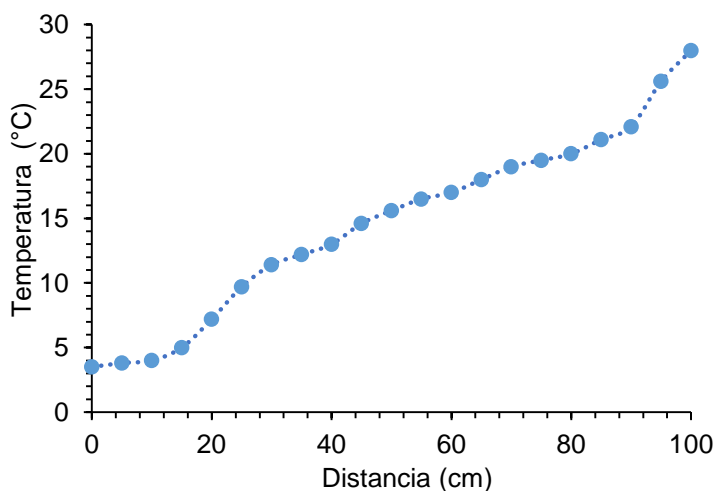


Figura 3. Gradiente de temperatura obtenido en el canal de 1m de termopreferendum. La temperatura mínima fue de 3,5°C y la temperatura máxima 28°C

De tal manera que los 6 machos, 6 hembras y 6 juveniles de ambas poblaciones fueron colocados en grupos de 3 individuos. Cada grupo de 3 individuos fue colocado en el canal en la casilla que se encontraba a la misma temperatura de estabulación, fueron observados desde un extremo durante 40 minutos. Trascurrido este tiempo se tomó la temperatura del lugar donde se encontraba el individuo, la temperatura corporal del mismo para comprobar si era igual a la temperatura del agua, la longitud desde el rostro a la cloaca y el peso. Después de realizar cada experimento se tomó la temperatura cada 5cm del canal para observar si el gradiente continuaba siendo estable.

2.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la temperatura crítica máxima (TCM_{máx}) y del termopreferendum (Tp) se utilizaron los paquetes “Car” (Fox & Weisberg, 2019), “Stats” (R Core Team, 2019), “Pgirmess” (Giraudoux, 2018), del programa R studio (versión 1.2.1335).

Para el TCM_{máx} primero se calcularon los valores medios de los pesos (excepto para las larvas del 2018, debido a su pequeño tamaño), de las Temperaturas críticas máximas (TCM_{máx}), del error estándar y de las temperaturas mínimas y máximas alcanzadas, para cada grupo de individuos de ambas poblaciones. Posteriormente para determinar si existía correlación entre las TCM_{máx} y los pesos de cada individuo se realizaron pruebas de correlación. Antes de realizar las correlaciones se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, para probar la normalidad de las variables de cada grupo estudiado. Para grupos cuyas variables presentaban normalidad se utilizó la correlación de Pearson y para grupos en los cuales una o ambas variables no presentaban normalidad se utilizó la correlación no paramétrica de Spearman.

Después de realizadas las correlaciones se procedió a analizar la TCM_{máx} tomando a las dos poblaciones en conjunto debido a que se trata de una sola especie. Posteriormente se analizó las TCM_{máx} dentro de cada población, para ello se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas (test de Levene), para determinar qué análisis utilizar para los diferentes datos. Para datos paramétricos, donde el test de Levene no salió significativo ($p > 0,05$), se utilizaron ANOVAs de un factor y una prueba post-hoc de Tukey y para datos no paramétricos, donde el test de Levene salió significativo ($p < 0.05$), se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con su respectivo post-hoc de comparaciones múltiples.

Posterior al análisis de cada población, se realizó un análisis 2 a 2 entre las dos poblaciones para cada grupo de individuos (machos occidental – machos oriental, hembras occidental – hembras oriental, juveniles occidental – juveniles oriental, larvas 2017 occidental – larvas

2017 oriental, larvas 2018 occidental – larvas 2018 oriental). Para ello se utilizó una prueba de Levene como en los casos anteriores para observar la igualdad o desigualdad de varianzas y una prueba de normalidad de Shapiro Wilk. Dada la falta de normalidad de los datos se utilizó una prueba pareada de Wilcoxon para realizar las comparaciones.

Para analizar los datos obtenidos en la experimentación de termopreferendum primero se obtuvieron los promedios de la temperatura del lugar en donde fueron encontrados al final el experimento (T_p), así como del peso y de la longitud Rostro cloaca (SVL), para cada grupo de individuos. Para obtener el rango de temperatura preferida de cada grupo se calculó el décimo y el nonagésimo percentil, los cuales según estudios previos caracterizan de manera confiable el rango de termopreferendum en tritones (Gvoždík, 2015; Gvoždík & Kristín, 2017).

Igual que para los análisis de la TCM_{máx}, se realizaron una serie de correlaciones. Para este caso se utilizaron correlaciones de Pearson para determinar si existía o no una relación entre la T_p y el peso de los individuos y entre la T_p y la SVL de los mismos. Posteriormente se realizó un análisis de la T_p de la especie en conjunto es decir de ambas poblaciones, occidental y oriental, para lo cual se realizó un test de homogeneidad de varianzas (Test de Levene), un ANOVA de un factor, con la prueba post-hoc de Tuckey, para saber si existía alguna diferencia o no entre los grupos de la especie. Después se realizó el análisis en cada población, para la población oriental se realizaron los mismos estadísticos utilizados para toda la especie, y para la población occidental se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis. Por último se realizaron comparaciones pareadas T-test entre los grupos de ambas poblaciones (machos, hembras y juveniles) para observar si había diferencias entre ellas.

3. Resultados:

3.1 Temperatura crítica máxima (TCM_{máx})

El punto final del experimento es decir la serie de espasmos en gran parte de los individuos fue bastante notoria. Al finalizar el experimento todos los individuos presentaron baja o nula respuesta a los estímulos externos justo antes de su límite, además este límite vino acompañado de espasmos de las extremidades, contracciones en el cuerpo, agarrotamiento y finalmente una parálisis completa, de la cual se recuperaron inmediatamente al entrar en contacto con agua a una menor temperatura.

Al analizar las dos poblaciones en conjunto se determinó que la TCM_{máx} de los machos (N=12) es de 31,7 (\pm 0,04); en hembras (N=12) es de 31,42 (\pm 0,05); en los juveniles (N=12) es de 31,53 (\pm 0,15); en las larvas del 2017 (N=12) es de 32,51 (\pm 0,32); y en las

larvas del 2018 (N=12) es de 31,69 (\pm 0,19). Al analizar las dos poblaciones por separado se observó que: dentro de la población occidental de *C. arnoldi* los machos (N=6) presentaban una TCMáx promedio de 31,68°C (\pm 0,07); las hembras (N=6) una TCMáx promedio de 31,38°C (\pm 0,07); los juveniles (N=6) tenían una TCMáx de 31,55°C (\pm 0,17); las larvas del 2017 (N=6) presentaban una TCMáx de 33,5°C (\pm 0,1); y las larvas del 2018 (N=6) presentaron una TCMáx de 32,28°C (\pm 0,03). Los individuos de la población oriental, presentaron los siguientes valores: Los machos (N=6) tenían una TCMáx de 31,72°C (\pm 0,04); las hembras (N=6) tenían una TCMáx de 31,45°C (\pm 0,09); los juveniles (N=6) presentaron una TCMáx de 31,5°C (\pm 0,27); las larvas del 2017 (N=6) tenían una TCMáx de 31,53°C (\pm 0,26); y las larvas del 2018 (N=6) presentaron una TCMáx de 31,1 (\pm 0,19) (Tabla 1).

Al analizar las correlaciones se puede observar que en ninguno de los grupos las TCMáx están relacionadas con el peso de los individuos puesto que todas las correlaciones no fueron significativas ($p > 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Peso promedio, temperaturas críticas máximas (TCMáx), correlación entre peso y TCMáx, en los 5 grupos de las dos poblaciones de <i>Calotriton arnoldi</i>							
Población occidental							
	Peso (g)	TCMáx (°C)	S.E	Mín (°C)	Máx (°C)	R²	p-valor
Machos	5,7	31,68	0,07	31,4	31,8	-0,39	0,44
Hembras	7,03	31,38	0,07	31,1	31,5	-0,52	0,29
Juveniles	2,33	31,55	0,17	31	32,1	-0,26	0,61
Larvas 2017	0,75	33,5	0,1	33	33,6	0,67	0,14
Larvas 2018	-	32,28	0,03	32,2	32,4	-	-
Población oriental							
Machos	6,12	31,72	0,04	31,6	31,8	-0,74	0,09
Hembras	4,33	31,45	0,09	31	31,6	-0,51	0,30
Juveniles	2,35	31,5	0,27	30,2	31,9	-0,21	0,69
Larvas 2017	1,4	31,53	0,26	30,5	32,2	-0,30	0,56
Larvas 2018	-	31,1	0,19	30,5	31,5	-	-

La tabla 2 refleja los resultados obtenidos al comparar los diferentes grupos estudiados. Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis para toda la especie se observó que existen diferencias altamente significativas entre los grupos ($\chi^2 = 13,43$; $p < 0,01$). Esto se corroboró al analizar la

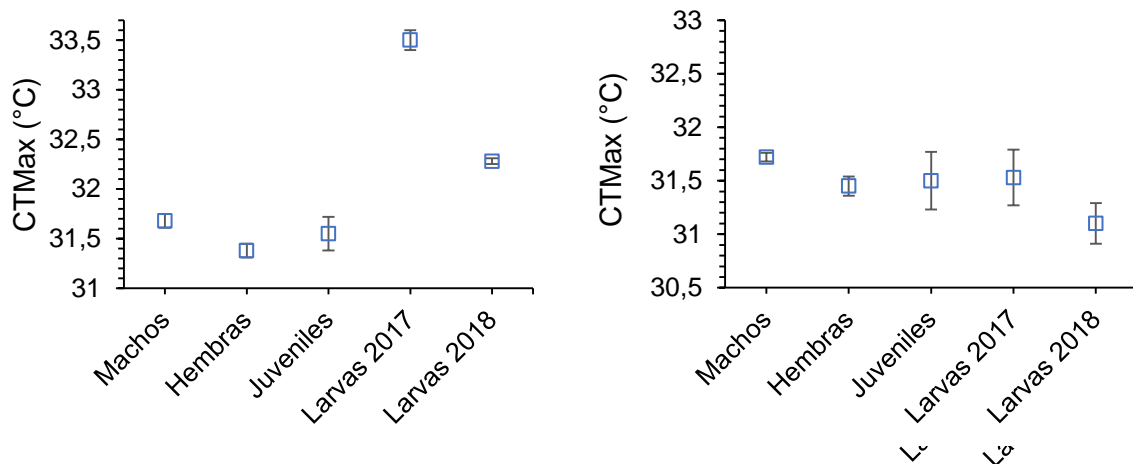


Figura 4. Promedio de la temperatura crítica máxima (TCM_{áx}) de los 5 grupos de la especie *C. arnoldi* (ambas poblaciones). Las barras corresponden al error estándar.

prueba post-hoc de comparaciones múltiples, la cual determinó que las diferencias existen entre las TCM_{áx} de las hembras y de las Larvas del año 2017 (Figura 4). Posteriormente cuando se analizó las poblaciones por separado en la población occidental se pudo determinar mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que hay diferencias significativas entre los grupos de la población occidental ($\chi^2 = 23,85$; $p < 0,0001$). Las diferencias se pudieron encontrar entre las TCM_{áx} de las hembras con ambos grupos de larvas del 2017 y del 2018 ($p < 0,05$), entre las larvas del 2017 y los machos ($p < 0,05$) y entre las larvas del 2017 y los juveniles ($p < 0,05$) (Figura 5). Para la población oriental el resultado del ANOVA no fue significativo (ANOVA: $F = 1,39$; $p > 0,05$), lo que indica que no hubo diferencias significativas entre las TCM_{áx} de los cinco grupos de esta población (Figura 6).

En los análisis estadísticos obtenidos al realizar las comparaciones pareadas entre las dos poblaciones (occidental y oriental), se pudo observar que las muestras obtenidas no

Figura 5. Promedio de la temperatura crítica máxima (TCM_{áx}) de los 5 grupos de la población occidental de *C. arnoldi*. Las barras corresponden al error estándar.

Figura 6. Promedio de la temperatura crítica máxima (TCM_{áx}) de los 5 grupos de la población oriental de *C. arnoldi*. Las barras corresponden al error estándar.

presentaban una distribución normal ($p < 0,05$). Fue necesario utilizar una prueba estadística no paramétrica, en este caso el Test de Wilcoxon, el cual indicó que únicamente las larvas, tanto del 2017 como del 2018, presentaban diferencias significativas entre ambas poblaciones ($W=36$; $p < 0,01$, en ambos casos). El resto de grupos, machos, hembras, y juveniles, no tuvieron diferencias significativas entre las TCMáx entre las dos poblaciones (Tabla 3).

A lo largo del experimento se pudo observar ciertas señales que indicaban que los individuos ya no estaban dentro de su temperatura de confort, dentro de estas señales se encontró el vómito, el movimiento de cabeza de un lado a otro, un pequeño espasmo y apertura de la boca. Dada la similitud en la TCMáx entre machos, hembras y juveniles de las dos poblaciones, se pudo considerar a la temperatura a la cual se dieron estas señales como un único grupo. Denotando que: del total de los individuos, 13 presentaron estas señales de incomodidad a una temperatura media de $26,24^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,27$) con un mínimo de $24,5^{\circ}\text{C}$ y un máximo de $27,3$

Tabla 2. Análisis estadísticos realizados para la temperatura crítica máxima (TCMáx) de la especie *Calotriton arnoldi*. Los valores en rojo hacen referencia a valores significativos

	Ambas poblaciones			Población occidental			Poblacion Oriental			
	Prueba de homogeneidad de Varianzas (Test de Levene)			Prueba de homogeneidad de Varianzas (Test de Levene)			Prueba de homogeneidad de Varianzas (Test de Levene)			
Grupos Residuales	GI	F valor	p-valor	GI	F valor	p-valor	GI	F valor	p-valor	
		4	14,395	4,20E-08	4	3,2976	0,02664	4	1,3813	0,2689
	55			25			25			
	Prueba de Kruskal – Wallis			Prueba de Kruskal – Wallis			ANOVA			
Grupos	X ²	GI	p-valor	X ²	GI	p-valor	GI	Suma de cuadrados	F-valor	p-valor
	13,437	4	0,009326	23,854	4	8,54E-05	4	1,215	1,392	0,265
	Prueba Post-hoc: Comparaciones múltiples (p=0,05)			Prueba Post-hoc: Comparaciones múltiples (p=0,05)						
	Dif. observada	Dif. critica	Diferencia	Dif. observada	Dif. critica	Diferencia				
Hembras-Juveniles	10,208333	20,01345	FALSE	3,083333	14,26717	FALSE				
Hembras-Larvas17	25,5	20,01345	TRUE	21	14,26717	TRUE				
Hembras-Larvas18	13,916667	20,01345	FALSE	15	14,26717	TRUE				
Hembras-Machos	14,958333	20,01345	FALSE	5,916667	14,26717	FALSE				
Juveniles-Larvas17	15,291667	20,01345	FALSE	17,916667	14,26717	TRUE				
Juveniles-Larvas18	3,708333	20,01345	FALSE	11,916667	14,26717	FALSE				
Juveniles-Machos	4,75	20,01345	FALSE	2,833333	14,26717	FALSE				
Larvas17-Larvas18	11,583333	20,01345	FALSE	6	14,26717	FALSE				
Larvas17-Machos	10,541667	20,01345	FALSE	15,083333	14,26717	TRUE				
Larvas18-Machos	1,041667	20,01345	FALSE	9,083333	14,26717	FALSE				

Tabla 3. Comparaciones 2 a 2 de la TCM_{ax} entre grupos de la población occidental y la población oriental de <i>C. arnoldi</i>.				
	Test de Levene (p-valor)	Test de Shapiro Wilk (p-valor)	Test de Wilcoxon	
			W-valor	p-valor
Machos	0,549	0,006741	17	0,9312
Hembras	1	0,006146	10,5	0,2306
Juveniles	0,9516	0,03168	16,5	0,8717
Larvas 2017	0,091	0,04794	36	0,003665
Larvas 2018	0.0006523	0,03454	36	0,004408

3.2 Tolerancia al frío

Al final de la experimentación con temperaturas bajas se pudo observar que en los individuos de la población occidental todos los machos (N=6) resistieron sin llegar a su temperatura mínima crítica hasta 1°C, lo mismo ocurrió con las larvas del 2017 (N=6) y las larvas del 2018 (N=6). Por otro lado, en las hembras (N=6) se observó que dos hembras no resistieron dicha temperatura y tuvieron que ser retiradas de la experimentación a 1,1°C y 1,5°C respectivamente. En los juveniles de la misma población (N=6) también se observó dicho comportamiento en tres individuos (dos a 1,1°C y uno a 1,2°C) y tuvieron que ser retirados del experimento. Esto indica que del 100% de individuos de la población (N=30) pertenecientes a los 5 grupos, tan solo el 16,7% (5 individuos) alcanzaron la TC_{min} a una temperatura promedio de 1,2°C ($\pm 0,08$) (Figura 7). Las señales que presentaron estos 5 individuos fueron similares a las observadas para la TCM_{ax}. En el resto de individuos se determinó la temperatura a la que comenzaban a aletargarse y a responder lentamente a los estímulos externos, en promedio esta temperatura fue de 2,05°C ($\pm 0,19$) (Figura 8).

En la población oriental se observó que todos los individuos de los 5 grupos: machos, hembras, juveniles, larvas 2017 y larvas 2018, pudieron resistir hasta 1°C sin llegar a su TC_{min}, es decir, el 100% de los individuos toleraron temperaturas bajas (Figura 7). En estos individuos se determinó que la temperatura de aletargamiento fue de 1,78°C ($\pm 0,18$) (Figura 8).

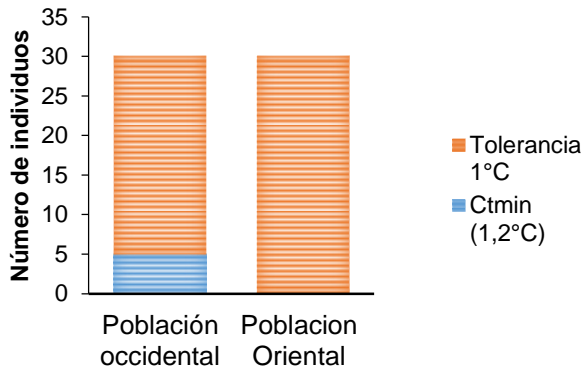


Figura 7. Número de individuos que toleraron la temperatura de 1°C y número de individuos que alcanzaron la temperatura crítica mínima (TCmin) en ambas poblaciones de *C. arnoldi*.

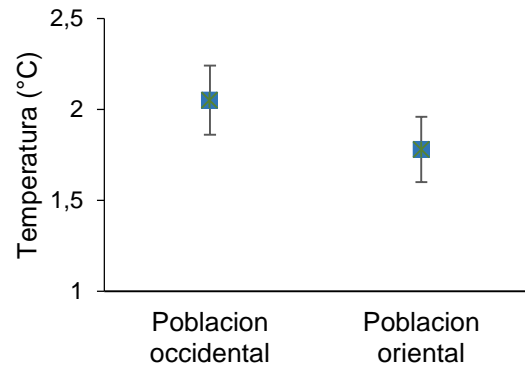


Figura 8. Promedio de la temperatura a la cual los individuos de *C. arnoldi* comienzan a aletargarse y a responder lentamente a estímulos externos

3.3 Temperatura preferida (Termopreferendum)

Los tritones que fueron utilizados en la experimentación mostraron una conducta similar en todos los grupos. Al ser colocados en el canal de termopreferendum estos se movieron activamente a lo largo del gradiente durante varios minutos hasta que se quedaron inmóviles en la zona que ellos deseaban. Una de las principales observaciones es que ningún individuo pasó hacia la última casilla que iba desde los 22 hasta los 28°C, lo mismo ocurrió hacia el extremo opuesto donde la temperatura fue de 3,5 a 5°C. Únicamente se desplazaron por las zonas que cada individuo consideraba adecuada y pasado 20 minutos aproximadamente ya mostraban una reducida actividad en el canal.

De tal manera se pudo identificar las temperaturas corporales preferidas (T_p), el peso, la longitud rostro-cloaca y los rangos (mínimo y máximo para cada grupo y para la especie en general) (Tabla 4). En el análisis en conjunto de toda la especie, es decir de ambas poblaciones, los machos ($N=12$) tenían una T_p de $14,89 (\pm 0,92)$ que iba desde un rango de $11,7$ a $19,48^\circ\text{C}$. Las hembras ($N=12$) presentaron una T_p de $17,51 (\pm 0,67)$ que iba desde un rango de $15,22$ a $20,88^\circ\text{C}$. Por último los juveniles ($N=12$) que presentaron una T_p promedio de $18,24 (\pm 0,87)$ que iba desde un rango de $13,79$ a $21,5^\circ\text{C}$. Al analizarlas por separado para la población occidental se observó que los machos ($N=6$) tenían una T_p de $13,35^\circ\text{C} (\pm 0,5)$ que iba desde un rango de $12,2$ a $14,6^\circ\text{C}$. Las hembras ($N=6$) tenían una T_p de $16,45^\circ\text{C} (\pm 0,48)$ que iba desde un rango de $15,3$ a $17,7^\circ\text{C}$. Los juveniles ($N=6$) tenían una T_p de $17,51^\circ\text{C} (\pm 1,46)$ que iba desde un rango de $13,7$ a $21,6^\circ\text{C}$. En la población oriental los

machos (N=6) presentaron una T_p de $16,43^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1,58$) que iba desde un rango de $11,7$ a 20°C . Las hembras (N=6) presentaron una T_p de $18,56^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1,13$) que iba desde un rango de $15,4$ a $21,3^{\circ}\text{C}$. Los juveniles (N=6) por su parte presentaron una T_p de $18,97^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,98$) que iba desde un rango de $16,4$ a 21°C .

Las correlaciones realizadas entre el termopreferendum con el peso de los individuos y entre el termopreferendum con la longitud corporal fueron no significativas ($p > 0,05$), lo que indica que la temperatura preferida de los diferentes grupos no estaba relacionada con estas variables (Tabla 4).

Tabla 4. Peso promedio, Longitud corporal, Temperatura preferida (T_p), Rango de temperaturas, correlación entre peso y T_p, correlación entre LRC y T_p, en los 3 grupos de las dos poblaciones de <i>Calotriton arnoldi</i>										
Población occidental										
	Peso (g)	SVL (cm)	T_p ($^{\circ}\text{C}$)	SE	Min	Max	R^2 Peso-T_p	p-valor	R^2 SVL-T_p	p-valor
Machos	5,15	5,95	13,35	0,5	12,2	14,6	-0,4	0,42	-0,15	0,78
Hembras	4,73	6,13	16,45	0,48	15,3	17,7	-0,76	0,08	-0,01	0,98
Juveniles	2,08	4,48	17,51	1,46	13,7	21,6	0,68	0,13	0,76	0,08
Población oriental										
Machos	5,63	6,05	16,43	1,58	11,7	20	-0,07	0,89	0,56	0,24
Hembras	3,98	5,61	18,56	1,13	15,4	21,3	-0,29	0,57	-0,03	0,95
Juveniles	2,2	4,32	18,97	0,98	16,4	21	-0,12	0,82	-0,06	0,92

El ANOVA realizado para los datos obtenidos de toda la especie tuvo un resultado significativo ($F=4,55$; $p < 0,05$), esto demuestra que si existe diferencias entre los 3 grupos (machos, hembras y juveniles). Para saber exactamente entre que grupos existía dicha diferencia se realizó el post-hoc de Tuckey, en el cual se pudo determinar que la única diferencia significativa que existe es entre los machos y los juveniles ($p < 0,05$). Siendo los machos los que presentaban una T_p menor y un rango de temperaturas que incluían temperaturas relativamente frías (Figura 9).

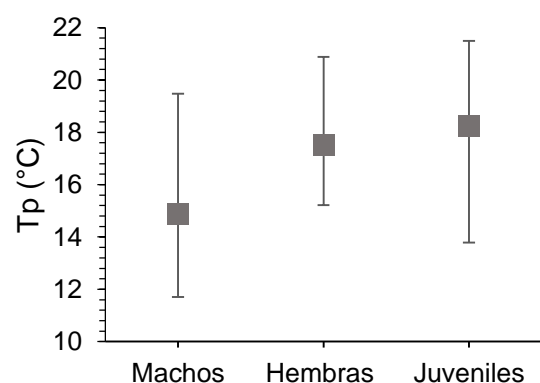


Figura 9. Temperatura corporal preferida (T_p) de los 3 grupos de la especie *C. arnoldi* (ambas poblaciones). Las barras corresponden al rango de termopreferendum de cada

Al analizar los resultados obtenidos para cada población se pudo observar que si hay diferencias significativas entre los grupos de la población occidental ($X^2=8,80$; $p<0,05$), esta diferencia se encuentra entre el grupo de los machos y hembras y machos y juveniles ($p<0,05$). Este resultado denota claramente que los machos presentan un rango donde las temperaturas son más bajas que las de los otros dos grupos. Además que los juveniles son capaces de ocupar un amplio rango de temperaturas que sobrepasan incluso las de los adultos (Figura 10). Para la población oriental el ANOVA no reveló diferencias significativas entre los machos, hembras y juveniles de la población ($F=1,17$; $p>0,05$) (Tabla 5). No obstante, se puede observar que los machos sí presentan una T_p menor, así como se había observado en la otra población, aunque no se pueda comprobar estadísticamente (Figura 11).

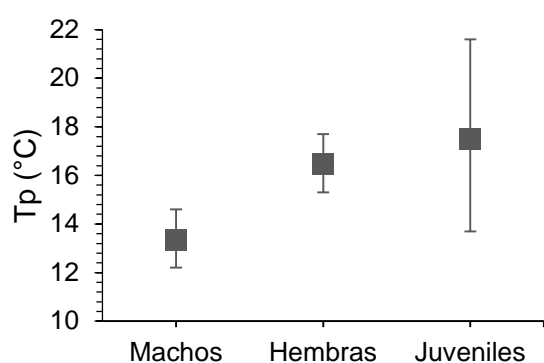


Figura 10. Temperatura corporal preferida (T_p) de los 3 grupos de la población occidental de *C. arnoldi*. Las barras corresponden al rango de termopreferendum de cada grupo.

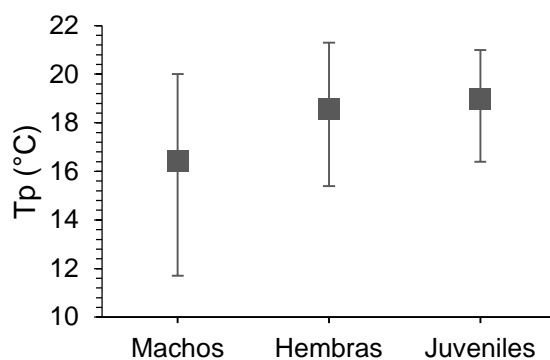


Figura 11. Temperatura corporal preferida (T_p) de los 3 grupos de la población oriental de *C. arnoldi*. Las barras corresponden al rango de termopreferendum de cada grupo.

De igual manera, al realizar las comparaciones 2 a 2 mediante el T-test no se encontraron diferencias significativas entre los machos, hembras y juveniles pertenecientes a las 2 poblaciones ($p>0,05$) (Tabla 6).

Tabla 6. Comparaciones 2 a 2 de la Temperatura preferida entre grupos de la población occidental y la población oriental de *C. arnoldi*.

	Test de Levene (p-valor)	Test de Shapiro Wilk (p-valor)	T-Test	
			T	p-valor
Machos	0,04309	0,06029	-1,857	0,1127

Hembras	0,03479	0,19	-1,728	0,1293
Juveniles	0,1759	0,1016	-0,821	0,4306

Tabla 5. Análisis estadísticos realizados para la temperatura preferida de toda la especie y por población (comparación entre machos, hembras, juveniles). Los valores en rojo hacen referencia a valores significativos

	Ambas poblaciones				Población occidental			Población oriental				
	Prueba de homogeneidad de Varianzas (Test de Levene)				Prueba de homogeneidad de Varianzas (Test de Levene)			Prueba de homogeneidad de Varianzas (Test de Levene)				
	GI	F valor	p-valor		GI	F valor	p-valor	GI	F valor	p-valor		
Grupos Residuales	2 33	1,4801	0,623		2 15	8,3095	0,003725	2 15	1,03020	0,3809		
	ANOVA				Prueba de Kruskal – Wallis			ANOVA				
	GI	Suma de cuadrados	F-valor	p-valor	X ²	GI	p-valor	GI	Suma de cuadrados	F-valor	p-valor	
Entre Grupos	2	74,43	4,558	0,0179	8,8086	2	0,0122	2	22,26	1,17	0,337	
Dentro de grupos	33	269,43						15	142,64			
	Prueba Post-hoc: Tuckey				Prueba Post-hoc: Comparaciones múltiples (p=0,05)							
	Diferencia	Mínimo	Máximo	p-valor	Dif, observada	Dif, critica	Diferencia					
Machos – Hembras	-2,616	-5,479042	0,24570	0,0786	7,5	7,3787	TRUE					
Machos - Juveniles	-3,3500	-6,212375	-0,4876	0,0188	8,25	7,3787	TRUE					
Juveniles – Hembras	0,7333	-2,129042	3,59570	0,8055	0,75	7,3787	FALSE					

4. Discusión:

4.1 La tolerancia térmica de la especie *Calotriton arnoldi*

La temperatura crítica máxima (TCM_{áx}) de una población es definida como: El punto térmico colectivo en el cual la actividad locomotora de los individuos se desorganiza y el animal pierde totalmente la capacidad de escapar de las condiciones que podrían causar su muerte (Cowles & Bogert, 1944; Lowe & Vance, 1955). Por tal motivo este punto térmico estaría determinado por un set de espasmos y pérdida de la respuesta locomotora (Hutchinson, 1961). Tomando en cuenta este precedente se puede afirmar que los individuos de *C. arnoldi* se comportaron de manera similar a lo descrito por Hutchinson (1961) y por Spotila (1972). Es decir, la mayor parte de individuos tuvieron un límite térmico bastante marcado del cual se recuperaron al entrar en contacto con agua menos cálida.

Al considerar a las dos poblaciones de *C. arnoldi* en conjunto es posible observar que todos los grupos presentan una temperatura crítica máxima (TCM_{áx}) promedio bastante similar, la cual sobrepasa los 31°C, siendo las larvas del 2017 las únicas que presentan una diferencia significativa, debido a su alta TCM_{áx}. Este patrón se puede identificar también si tomamos en cuenta únicamente a la población occidental donde ambas larvas del 2018 y 2017 presentan una TCM_{áx} significativa comparada con los otros grupos. Por otro lado, la población oriental no presentó este patrón debido a que tenían unas TCM_{áx} que no variaban significativamente entre todos sus grupos. Es decir, de todos los grupos analizados, únicamente las larvas de la población occidental marcaban una diferencia entre ambas poblaciones. Pero, ¿cuál es la razón para que únicamente las larvas de una de las poblaciones presenten este TCM_{áx} elevado en comparación a los otros grupos? Una posible respuesta serían las diferencias de hábitat y temperatura que puede haber entre los torrentes orientales y occidentales. Ambos torrentes podrían presentar condiciones de hábitat distintos, puesto que los torrentes orientales tienen una orientación más sureña que los occidentales. Esto pudo haber ocasionado que las dos poblaciones, las cuales presentan diferencias morfológicas y genéticas y que llevan miles de años separadas una de la otra (Valbuena-Ureña *et al.*, 2013), hayan desarrollado algún factor de adaptación local a la temperatura y este se exprese durante la etapa larval. En estudios previos se pudo determinar que las diferencias en la TCM_{áx}, dentro de una especie o entre varias especies de salamandras, están correlacionadas con los regímenes térmicos del hábitat. Por tal motivo, los patrones óptimos de ajuste de la temperatura crítica máxima pueden variar de un hábitat a otro (Layne & Claussen, 1982; Spotila, 1972). Sin embargo, esta razón no es del todo válida si hablamos de los grupos de la población occidental únicamente. Una hipótesis que se plantea en este estudio del porque las larvas del 2017 son tan diferentes, incluso aún

más que las del 2018, es la edad de las larvas. Se han realizado algunos estudios en distintas especies de anfibios que demuestran que sí puede haber diferencias entre las TCM_{max} de las larvas y los adultos debido a las presiones térmicas que presenten en el hábitat. Existen casos en los cuales algunas especies presentan larvas en desarrollo intermedio con una TCM_{max} mayor que larvas de una menor edad, por los procesos del desarrollo que se encuentren involucrados. Sin embargo, la razón por la cual ocurren estas diferencias es muy poco conocida (Bury, 2008; Cupp, 1980). En el caso de este estudio podría deberse a que las larvas del 2017 ya han pasado el año de vida y por ende ya han adquirido cierta tolerancia térmica en comparación con las del 2018.

A pesar de estas diferencias que se da entre ambas poblaciones, se puede observar que la especie presenta una TCM_{max} alta, que oscila entre los 31 y 33 °C. Similar a lo descrito para otras especies de salamandras de zonas templadas, las cuales tenían TCM_{max} que oscilaban entre los 32 y 34°C (Spotila, 1972). En general aunque los adultos y juveniles no alcancen los 32°C como otras especies, se han registrado especies de anfibios de zonas templadas que presentan TCM_{max} menores que las presentadas en este estudio, aproximadamente entre 26 y 29°C.(Bury, 2008). Adicionalmente, durante el estudio se pudo observar que 13 individuos presentaron señales bastante notorias de incomodidad, una de ellas el vómito a los 26°C en promedio (24,5 – 27,3°C). Estas señales podrían estar indicando un límite térmico de conformidad de la especie, que si se diera por un tiempo prolongado, podría ser perjudicial para su subsistencia. Esta temperatura no es tan elevada como la TCM_{max} y podría ser más plausible de alcanzar en la naturaleza.

Al otro extremo de la tolerancia térmica encontramos la tolerancia al frío o al congelamiento, la cual es un factor clave en la supervivencia de los organismos, se ha podido observar que en algunos ectotermos hay resistencia a temperaturas extremadamente bajas, incluso bajo cero. La manera que tienen estos organismos, para resistir estas temperaturas, es producir cierto tipo de proteínas que evitan la congelación de líquidos dentro del cuerpo. Sin embargo, hay organismos principalmente en los trópicos que no presentan esa capacidad y su tolerancia tiende a ser bastante pobre (Vo & Gridi-Papp, 2017). Por tal motivo, se considera que la tolerancia al frío tiende a ser extrema o mayor en zonas templadas, en donde la latitud es mayor. La altitud también jugaría un rol importante, siendo las especies de zonas altas más resistentes que las de zonas bajas (Sanabria *et al.*, 2015).

Debido a que *C. arnoldi* es una especie que habita principalmente torrentes de agua fría en el Montseny (Montori & Campeny, 1991) y además de eso es una especie que habita en zonas elevadas, era de esperarse que presente una tolerancia al frío bastante alta, como lo demostró en este estudio. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Layne y

Claussen (1982) y Sanabria y colaboradores (2015) quienes indican que la tolerancia a temperaturas bajas podría ser buena en organismos de zonas templadas y elevadas. Durante la experimentación se observó que la mayor parte de individuos empezaban a aletargarse y a moverse lentamente un poco antes o después de los 2°C. Sin embargo, no demostraron algún signo de que habían alcanzado su temperatura crítica mínima (TC_{min}), lo que indicaría que su límite sería dado por temperaturas menores a 1°C. Esta tolerancia se ha descrito en otros anfibios como *Desmognathus fuscus*, una salamandra que habita en riberas de montaña en Estados Unidos y que puede llegar a presentar una TC_{min} con temperaturas bajo 0 dependiendo de su aclimatación (Layne & Claussen, 1982).

Tanto la TC_{Máx} como la TC_{min} son temperaturas que se encuentran definidas genéticamente en la especie. Sin embargo pueden variar si se somete a diferentes temperaturas de aclimatación a los individuos (Sunday *et al.*, 2011; Young & Gifford, 2013; Vo & Gridi-Papp, 2017). Como ejemplo está el caso de varias especies de ectotermos de zonas templadas, en las cuales se observó un incremento de hasta 1°C en su TC_{Máx} por cada 10°C aumentados en la temperatura de aclimatación (Spotila, 1972). Este cambio de temperatura se ha observado que es mayor en ectotermos que habitan en ambientes con temperaturas variables (Layne & Claussen, 1982). Estos cambios por aclimatación también se han podido observar en la TC_{min} de algunas especies de ectotermos en donde se observó que a mayor temperatura de aclimatación mayor TC_{min}. Se conoce que existe una relación entre ambas temperaturas críticas y se maneja la hipótesis que plantea que mantener una TC_{min} baja puede ser costoso para organismos que presentan una TC_{Máx} alta y viceversa (Layne & Claussen, 1982; Vo & Gridi-Papp, 2017). Esto podría explicar el hecho de que *C. arnoldi* presente una buena tolerancia al frío pero que su TC_{Máx} no sea tan elevada como la de otros organismos tropicales, los cuales pueden presentar TC_{Máx} mayores a 40°C (Katzenberger, 2009). No obstante, como este estudio no utilizó temperaturas de aclimatación, se sugiere que en un futuro se realice una medición de la TC_{Máx} y TC_{min} tomando en cuenta este factor para saber si existen variaciones.

4.2 Rango de Temperatura corporal preferida (Tp) del Tritón del Montseny en el laboratorio

Se sabe que los individuos de *Calotriton arnoldi* habitan en torrentes de agua fría no mayor a 15°C y con pronunciadas pendientes (Montori & Campeny, 1991), a una altura de 600 a 1200 m.s.n.m. (Carranza & Amat, 2005). Sin embargo, el rango de temperatura corporal preferido de la especie había sido desconocido hasta la actualidad. La temperatura corporal preferida o termopreferendum (Tp), es definida como la temperatura corporal mantenida por un ectotermo bajo condiciones en las cuales no existen limitaciones bióticas o abióticas

(Hertz *et al.*, 1993). Bajo estas condiciones, los organismos son capaces de escoger un rango de temperatura ambiental que maximice su fitness reproductivo. Debido a que son organismos ectotermos, estos son capaces de igualar su temperatura corporal con la temperatura exterior rápidamente (Magnuson *et al.*, 1979; Spotila, 1972)

En este estudio se pudo determinar que esta especie presenta un rango de termopreferendum amplio (en condiciones de laboratorio), que incluye desde temperaturas frías de 11,7°C hasta temperaturas medias de 21,6°C. Algo que no era esperado en este estudio, puesto que se pensaba que la especie preferiría las temperaturas frías. Pese a que el rango de T_p presentada por esta especie parece alto, es menor al rango de T_p de la especie *Calotriton asper*, la cual presentaba un rango de temperaturas que van desde 11,10°C hasta 32°C dependiendo la altura a la que se encontraban los individuos. En ese estudio se pudo observar que los individuos de *C. asper* que se encontraban en alturas elevadas presentaban un rango de T_p mayor que los individuos que se encontraban a menor altura (Trochet *et al.*, 2018). Esto demuestra que esta especie no seguía lo postulado en la “hipótesis local óptima”, la cual dice que los individuos de menor altura tendrán una mayor T_p que los individuos de mayor altura (Levinton, 1983). Por el contrario, se ajustaban a la “hipótesis de contragrado”, la cual postula que los organismos de media y alta elevación buscan temperaturas preferidas más cálidas para compensar la pequeña oportunidad que tienen de estar en temperaturas favorables (Fangue *et al.*, 2009) y de esta manera cumplir funciones vitales para su ciclo de vida (locomoción, reproducción, digestión) (Trochet *et al.*, 2018). Esto podría explicar en cierta medida porque los individuos de *C. arnoldi* presentan un termopreferendum con temperaturas que sobrepasan en muchos casos los 15°C o la temperatura a la cual se encuentran aclimatados.

Por otro lado, es importante recalcar que dentro de la especie existen diferencias en el termopreferendum de los distintos grupos (machos, hembras y juveniles), tanto de la población occidental como de la población oriental. Estas diferencias principalmente radican en el hecho de que los machos dentro del canal de termopreferendum eligen temperaturas más frías que las hembras y que los juveniles. Además de que los juveniles podrían ser capaces de ocupar rangos de T_p mayores que los adultos, e incluso ubicarse en temperaturas más elevadas que los otros dos grupos. Estas diferencias podrían deberse a que en la naturaleza los machos se encuentran en aguas más frías y oxigenadas, mientras que las hembras y juveniles suelen estar en aguas más cálidas y escondidas en el torrente (Observación personal: Montori, 2019).

Un dato importante a considerar a futuro es que el termopreferendum podría incrementar o disminuir debido a diversos factores tales como: la gravidez de las hembras o la digestión

(Gvoždík, 2005; Gvoždík & Kristín, 2017). Se ha podido observar también que en ciertas especies de ectotermos como el tritón alpino (*Icthyosaura alpestris*) ésta temperatura preferida puede variar con la estacionalidad y la aclimatación de los individuos debido a que los organismos termorregulan en base a sus necesidades a diferentes temperaturas del agua. Pero esta termorregulación no es muy elevada ni significativa (Hadamová & Gvoždík, 2011). Esto se asemeja a lo observado en otras especies de zonas templadas en las que la aclimatación de los individuos no influyó en su elección de rango de T_p (Šamajová & Gvoždík, 2009; Spotila, 1972). Por el contrario, hay especies de zonas tropicales las cuales se ha podido determinar que presentan plasticidad del T_p debido a que son especies que no se encuentran en hábitats con estaciones marcadas y es necesario una plasticidad en este carácter para poder lidiar con los cambios de temperatura externa (Gvozdik, 2012; Goodman & Walguarnery, 2007). Por tal motivo, dado el desconocimiento que existe aún sobre *C. arnoldi* es necesario realizar un estudio en el que se involucren más factores como la estacionalidad, digestión, gravidez, entre otros, para determinar si en esta especie hay este aumento o disminución del T_p a lo largo del año.

4.3 Implicaciones ecológicas y medidas de gestión

Después de analizar los datos obtenidos en este estudio se puede observar la gran influencia que tiene la temperatura sobre la especie *C. arnoldi*, lo cual es fundamental para conocer un poco más sobre su biología y ecología. Conocer los patrones que conducen a la fisiología térmica de una especie es importante para poder comprender las respuestas evolutivas que pueden presentar los distintos organismos ante las variaciones climáticas y de esa manera poder predecir de mejor manera su futuro y sus respuestas ante el cambio climático (Ledesma *et al.*, 2019)

Una de las últimas mediciones de temperatura que se realizó en el Montseny determinó que la temperatura ambiental está incrementando rápidamente, en promedio $0,3^{\circ}\text{C}$ por década desde la segunda mitad del siglo XX (Peñuelas & Boada, 2003), esto sumado a la deforestación que sufrió el hábitat de los tritones (Amat & Roig, 2004) y la expansión del bosque de encinar en lugares donde debería haber hayedos, han provocado que haya periodos de sequía prolongados que amenazan la supervivencia de la especie en estado natural (Ledesma *et al.*, 2019).

Si bien es verdad que hay una baja probabilidad de que en un futuro cercano las temperaturas en los torrentes llegasen a aumentar, hasta alcanzar la $T_{C\text{Máx}}$ de la especie. Hay una alta probabilidad de que los torrentes puedan secarse o aumentar su temperatura hasta una temperatura poco óptima, debido al incremento de temperatura en el macizo y en especial a la falta de cobertura vegetal ya que la radiación directa afecta significativamente a

la temperatura del agua (Amat & Roig, 2004). Esta temperatura poco óptima para la especie podría ser la descrita en este estudio en la cual los individuos empezaron a vomitar (26°C). Alcanzar esta temperatura o tener periodos de sequía traerían varias implicaciones para la especie. Por un lado podría cambiar su rango de distribución (Enriquez-Urzelai *et al.*, 2019; Moreno-Rueda *et al.*, 2012), tal y como ocurrió con su especie hermana *C. asper*, en la cual el cambio climático redujo su rango y debido a su reducida capacidad de dispersión se pudo haber dado una pérdida genética (de Pous *et al.*, 2016). Esto podría pasar igualmente con el tritón del Montseny que para encontrar nichos donde la temperatura del torrente este en su temperatura preferida o su temperatura óptima, tendría que migrar durante periodos de sequía y de no encontrar sitios adecuados se perderían individuos y diversidad genética lo cual podría conducir a la extinción de la especie (Ledesma *et al.*, 2019).

Este escenario no es el único posible puesto que existen otras respuestas que podrían darse en la especie frente al cambio climático. Una de ellas podría ser la disminución en el tamaño corporal de los individuos que traería consigo cambios fisiológicos como los observados en varias especies de salamandras (Caruso *et al.*, 2014). O una respuesta evolutiva de la especie que le permita tener una plasticidad en su termorregulación, esto favorecería a un incremento de su termopreferendum y así poder lidiar con los cambios de temperatura provocados por el cambio climático. Sin embargo, un cambio así necesitaría de una escala temporal grande (Gvozdik, 2012). No obstante, estos dos mecanismos serían útiles si sólo se tratara del aumento de temperatura del torrente, pero no para la desecación puesto que *C. arnoldi* al igual que *C. asper* necesitan agua durante todo el año dado el largo periodo larvario de la especie (Ledesma *et al.*, 2019).

Es por este motivo que una de las medidas de gestión que se podrían plantear para la conservación de esta especie sería mantener la cobertura vegetal de los torrentes, en los que se encuentran los tritones, para evitar el aumento de temperatura de los mismos. Además de una regulación, por parte de las autoridades, de la extracción de agua de los torrentes del Montseny ya sea tanto para usos agrícolas como comerciales, puesto que la excesiva explotación de ese recurso, el cual es indispensable para el tritón, traería consigo la pérdida o la destrucción del hábitat de esta especie. Al poner en práctica las medidas antes planteadas se podrían proporcionar hábitats seguros para el desarrollo de las poblaciones ya existentes y de las poblaciones que se planeen reintroducir. Al conocer los rangos de temperatura preferida que tiene la especie se debe procurar mantener hasta ese límite la temperatura, intentando mitigar los efectos del cambio climático, mediante campañas de reforestación de bosques de hayedos y otros árboles que ofrezcan cobertura vegetal, que se ha visto que es un factor importante para la presencia de esta especie

(Velalcázar *et al.*, 2019), pero evitando la progresión de los bosques de encinas los cuales podrían favorecer la sequía de los torrentes (Ledesma *et al.*, 2019).

5. Conclusiones:

- *Calotriton arnoldi* presenta una TCM_{máx} que supera los 31°C en todos los grupos. Siendo las larvas de la población occidental las únicas que presentan una TCM_{máx} superior a los 32°C, lo cual podría deberse a una heterogeneidad del hábitat en el que se encuentran y su etapa del desarrollo. Por otro lado, los machos, hembras y juveniles no presentaron diferencias entre ambas poblaciones.
- El rango de temperatura que va desde los 24,5°C hasta los 27°C parece ser importante para los individuos de *C. arnoldi*, puesto que podría ser un límite de conformidad el cual debería ser estudiado más a profundidad.
- El tritón del Montseny es una especie que se encuentra en zonas elevadas y en torrentes de agua fría por lo tanto presenta una tolerancia al frío bastante buena en todos los grupos de ambas poblaciones, razón por la cual su temperatura crítica mínima sería menor a 1°C.
- El rango de termopreferendum de *C. arnoldi* va desde los 11,7°C hasta los 21,6°C, es un rango amplio. Pero es menor al rango de temperatura reportado para su especie hermana *C. asper* (11,10 – 32°C). No obstante, es un rango de temperatura que tiende a presentar temperaturas más cálidas de lo que se esperaba. Esto podría ser explicado por la “hipótesis del contragrado”
- No existe diferencias en el rango de termopreferendum de ambas poblaciones. Ambas (en la occidental más que en la oriental) presentan un patrón en el cual los machos escogieron temperaturas más frías que las hembras y los juveniles. Esto podría deberse a diferencias en la ecología de la especie.
- Es recomendable realizar experimentación de TCM_{máx}, TC_{min} y Termopreferendum del tritón del Montseny tomando en cuenta diferentes temperaturas de aclimatación o en las diferentes estaciones del año, con el objetivo de observar si la especie incrementa o disminuye su tolerancia térmica y rango de temperatura preferida con la estacionalidad.
- Los resultados presentados en este estudio son un avance en el conocimiento de la fisiología térmica de esta especie y respalda la importancia que tiene la temperatura del torrente sobre la supervivencia de *C. arnoldi*. Conocer sus límites térmicos y su rango de temperatura preferida ayudarán a plantear medidas de gestión que promuevan la conservación de los torrentes del Montseny y la cobertura vegetal para mitigar el incremento de temperatura por el cambio climático.

6. Agradecimientos:

Primero quiero agradecer a todo el equipo del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre Torreferrusa, especialmente a Francesc Carbonell y a Raquel Larios, quienes estuvieron presentes en cada paso de los experimentos. Gracias a Albert Montori y a Joan Goma, mis tutores, quienes no sólo dirigieron, encaminaron y corrigieron este trabajo, sino que también prestaron los materiales y su ayuda en cada experimento realizado.

7. Bibliografía:

- Allen, M. R., Dube, O. B., Solecki, W., Aragón-Durand, F., Cramer, W., Humphreys, S., Kainuma, M., Kala, J., Mahowald, N., Mulugetta, Y., Perez, R., Wairiu, M., Zickfeld, K. (2018). Framing and Context. In: Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response. *In Press*, 51–59.
- Amat, F., & Roig, J. M. (2004). Amfibis al límit, conservació de Rana temporaria i Euproctus asper al límit meridional de la seva distribució, al Parc Natural del Montseny. Simposi Sobre del Declivi de les Poblacions d'Amfibis. Lleida, marzo de 2004.
- Amat, F. (2005). Estat de conservació del tritó pirinenc Euproctus asper a la Reserva de la Biosfera i Parc Natural del Montseny. VI Trobada d'estudiosos del Montseny. Breda, noviembre de 2004.
- Balogová, M., & Gvoždík, L. (2015). Can newts cope with the heat? Disparate thermoregulatory strategies of two sympatric species in water. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128155>
- Bury, R. B. (2008). Low thermal tolerances of stream amphibians in the Pacific Northwest: Implications for riparian and forest management. *Applied Herpetology*, *5*, 63–74.
- Carranza, S., & Amat, F. (2005). Taxonomy, biogeography and evolution of Euproctus (Amphibia: Salamandridae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, *145*(4), 555–582. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2005.00197.x>
- Carranza, S., Martínez-Solano, I. (2011). Calotriton arnoldi. En: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>.
- Caruso, N. M., Sears, M. W., Adams, D. C., & Lips, K. R. (2014). Widespread rapid reductions in body size of adult salamanders in response to climate change. *Global*

Change Biology, 20(6), 1751–1759. <https://doi.org/10.1111/gcb.12550>

- Cowles, R. B., & Bogert, C. M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bull. Amer. Mus. Natur. Hist.* 83:265-296.
- Cupp, P. V. (1980). Thermal Tolerance of Five Salientian Amphibians during Development and Metamorphosis. *Herpetologica*, 36(3), 234–244.
- de Pous, P., Montori, A., Amat, F., & Sanuy, D. (2016). Range contraction and loss of genetic variation of the Pyrenean endemic newt *Calotriton asper* due to climate change. *Regional Environmental Change*, 16(4), 995–1009. <https://doi.org/10.1007/s10113-015-0804-3>
- Dillon, M. E., Wang, G., & Huey, R. B. (2010). Global metabolic impacts of recent climate warming. *Nature*, 467(7316), 704–706. <https://doi.org/10.1038/nature09407>
- Enriquez-Urzelai, U., Bernardo, N., Moreno-Rueda, G., Montori, A., & Llorente, G. (2019). Are amphibians tracking their climatic niches in response to climate warming? A test with Iberian amphibians. *Climatic Change*, 154(1–2), 289–301. <https://doi.org/10.1007/s10584-019-02422-9>
- Fangue, N.A., Podrabsky, J.E., Crawshaw, L.I., Schulte, P.M. (2009). Countergradient variation in temperature preference in populations of killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Physiol. Biochem. Zool.* 82, 776–786.
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- Giraudoux, P. (2018). *pgirmess: Spatial Analysis and Data Mining for Field Ecologists*. R package version 1.6.9. <https://CRAN.R-project.org/package=pgirmess>
- Goodman, R. M. & Walguarnery, J. W. (2007). Incubation temperature modifies neonatal thermoregulation in the lizard *Anolis carolinensis*. *J. Exp. Zool.* 307, 439–448.
- Gvozdik, L. (2012). Plasticity of preferred body temperatures as means of coping with climate change?. *Biology Letters*, 8(2), 262–265. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0960>
- Gvoždík, L. (2005). Does reproduction influence temperature preferences in newts? *Canadian Journal of Zoology*, 83(8), 1038–1044. <https://doi.org/10.1139/z05-096>
- Gvoždík, L. (2015). Mismatch Between Ectotherm Thermal Preference and Optima for Swimming: A Test of the Evolutionary Pace Hypothesis. *Evolutionary Biology*, 42(2), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s11692-015-9305-z>

- Gvoždík, L., & Kristín, P. (2017). Economic thermoregulatory response explains mismatch between thermal physiology and behaviour in newts. *The Journal of Experimental Biology*, 220(6), 1106–1111. <https://doi.org/10.1242/jeb.145573>
- Hadamová, M., & Gvoždík, L. (2011). Seasonal Acclimation of Preferred Body Temperatures Improves the Opportunity for Thermoregulation in Newts. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84(2), 166–174. <https://doi.org/10.1086/658202>
- Hertz, P. E., Huey, R. B., & Stevenson, R. D. (1993). Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: The fallacy of the inappropriate question. *American Naturalist*, 142, 796–818
- Hochachka, P. W., Somero, G. N. (2002). *Biochemical adaptation*. Princeton University Press, Princeton.
- Hutchison, V.H. (1961). Critical thermal maximum in salamanders. *Physiol. Zool*, 34: 92 - 125.
- IUCN. (2009). *Calotriton arnoldi*. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2009: e.T136131A4246722. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T136131A4246722.en>. Consultado: 01 agosto 2019.
- Katzenberger, M. J. 2009. Thermal Tolerance and Sensitivity of Amphibian Larvae from Palearctic and Neotropical communities. Trabajo de Fin de Master. Universidad de Lisboa.
- Layne, J. R. J., & Claussen, D. (1982). The time courses of CTMax and CTmin acclimation in the salamander *desmognathus fuscus*. *Journal of Thermal Biology*, 7, 139–141.
- Ledesma, J. L. J., Montori, A., Altava-Ortiz, V., Barrera-Escoda, A., Cunillera, J., & Àvila, A. (2019). Future hydrological constraints of the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) under changing climate and vegetation cover. *Ecology and Evolution*, (July), ece3.5506. <https://doi.org/10.1002/ece3.5506>
- Levinton, J.S. (1983). The latitudinal compensation hypothesis: growth data and a model of latitudinal growth differentiation based upon energy budgets. I. Interspecific comparison of *Ophryotrocha* (Polychaeta: dorvilleidae). *Biol. Bull.* 165, 686–698
- Lowe, C. H., Jr., & Vance, J. V. (1955). Acclimation of the critical thermal maximum of the reptile *Urosaurus ornatus*. *Science*, 122:73-74.
- Lutterschmidt, W. I., & Hutchison, V. H. (1997). the Onset of Spasms As the Definitive End Point. *The Canadian Journal of Zoology*, 75, 1553–1560.

- Magnuson, J. J., Crowder, L. B., & Medvick, P. A. (1979). Temperature as an ecological resource. *Am. Zool.* 19, 331-343.
- Mearns, L. O., Hulme, M., Carter, T. R., Leemans, R., Lal, M., & Whetton, P. (2001). *Climate Scenario Development (Chapter 13)*. In *Climate Change 2001: The Scientific Basis, Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the IPCC*. 583–638. <https://doi.org/10.1111/j.1749-8198.2011.00426.x>
- Montori, A., & Campeny, R. (1991). Situación actual de las poblaciones de tritón pirenaico, *Euproctus asper*, en el macizo del Montseny. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 2, 10-12.
- Moreno-Rueda, G., Pleguezuelos, J. M., Pizarro, M., & Montori, A. (2012). Northward Shifts of the Distributions of Spanish Reptiles in Association with Climate Change. *Conservation Biology*, 26(2), 278–283. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01793.x>
- Parmesan, C., & Yohe, G. (2003). *A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems*. *Nature*, 37–42. <https://doi.org/10.1038/nature01286>
- Peñuelas, J., & Boada, M. (2003). A global change-induced biome shift in the Montseny mountains (NE Spain). *Global Change Biology*, 9(2), 131–140. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2003.00566.x>
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.
- RStudio Team (2018). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Šamajová, P., & Gvoždík, L. (2009). The influence of temperature on diving behaviour in the alpine newt, *Triturus alpestris*. *Journal of Thermal Biology*, 34(8), 401–405. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.09.001>
- Sanabria, E. A., Rodríguez, C. Y., Vergara, C., Ontivero, E., Banchig, M., Navas, A. L., Herrera-Morata, M., & Quiroga, L. B. (2015). Thermal ecology of the post-metamorphic Andean toad (*Rhinella spinulosa*) at elevation in the monte desert, Argentina. *Journal of Thermal Biology*, 52, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.05.006>
- Schneider, S. H. & Root, T. L. (1998). Status and Trends of the Nation's Biological Resources Part 1 (eds Mac, M. J., Opler, P. A., Puckett Haecker, N. & Doran, P. D.) 89–116 (US Geological Survey, Reston, Virginia).

- Spotila, J. R. (1972). Role of Temperature and Water in the Ecology of Lungless Salamanders. *Ecological Monographs*, 42(1), 95–125.
- Sunday, J. M., Bates, A. E., Dulvy, N. K. (2011). Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proc R Soc B*, 278,1823– 1830
- Teixeira, J., & Arntzen, J. (2002). Potential impact of climate warming on the distribution of the Golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*, on the Iberian Peninsula. *Biodiversity and conservation*, 11, 2167 - 2176.
- Trochet, A., Dupoué, A., Souchet, J., Bertrand, R., Deluen, M., Murarasu, S., Calvez, O., Martinez-Silvestre, A., Verdaguer-Foz, I., Darnet, E., Chevalier, H., Mossoll-Torres, M., Guillaume, O., Aubret, F. (2018). Variation of preferred body temperatures along an altitudinal gradient: A multi-species study. *Journal of Thermal Biology*, 77(April), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.002>
- Valbuena-Ureña, E., Amat, F., & Carranza, S. (2013). Integrative Phylogeography of Calotriton Newts (Amphibia, Salamandridae), with Special Remarks on the Conservation of the Endangered Montseny Brook Newt (*Calotriton arnoldi*). *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062542>
- Velalcázar, F., Gomà, J., Montori, A. 2019. Tamaño de población, caracterización del hábitat, desplazamiento longitudinal, de una población oriental de *Calotriton arnoldi* en el parque Natural del Montseny. Trabajo de Fin de Master, Universitat de Barcelona.
- Vo, P., & Gridi-Papp, M. (2017). Low temperature tolerance, cold hardening and acclimation in tadpoles of the neotropical túngara frog (*Engystomops pustulosus*). *Journal of Thermal Biology*, 66(March), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.03.012>
- Young, V. K. H., & Gifford, M. E. (2013). Limited capacity for acclimation of thermal physiology in a salamander, *Desmognathus brimleyorum*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 183(3), 409–418. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0717-0>

