

El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios

Miguel Tejado¹, Helder Duarte¹, Luis M. Gutiérrez-Pesquera¹, Juan Francisco Beltrán², Marco Katzenberger¹, Federico Marangoni³, Carlos A. Navas⁴, Alfredo G. Nicieza⁵, Rick A. Relyea⁶, Enrico L. Rezende⁷, Alex Richter-Boix⁸, Mauro Santos⁷, Monique Simon⁴ & Mirco Solé⁹

¹ Departamento de Ecología Evolutiva. Estación Biológica de Doñana. CSIC. Avda. Américo Vespucio s/n. 41092 Sevilla. España. C.e.: tejedo@ebd.csic.es

² Departamento de Zoología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla. España.

³ Laboratorio de Genética Evolutiva, FCEQyN-UNaM y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Cl. Félix de Azara 1552. 6° Piso. 3300 Posadas. Misiones. Argentina.

⁴ Departamento de Fisiología. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. Rua do Matão, Travessa 14, 321. 05508-900 São Paulo. SP. Brasil.

⁵ Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo. Catedrático Rodrigo Uría s/n. 33006 Asturias. España.

⁶ Department of Biological Sciences. University of Pittsburgh. 101 Clapp Hall. Pittsburgh. Pennsylvania 15260. Estados Unidos.

⁷ Department of Genética i de Microbiologia. Grup de Biologia Evolutiva (GBE). Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona. España.

⁸ Department of Population Biology and Conservation Biology. Evolutionary Biology Centre (EBC). Uppsala University. Norbyvägen 18 D. SE-752 36 Uppsala. Suecia.

⁹ Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16. 45662-900 Ilhéus. BA. Brasil.

Fecha de aceptación: 15 de noviembre de 2012.

Key words: amphibians, thermal tolerance limits, CT_{max} , CT_{min} , global warming, Janzen hypothesis.

LEONATO: *You will never run mad, niece.*

BEATRICE: *No, not till a hot January.*

W. Shakespeare *Much ado about nothing* 1.1.88-89

La temperatura afecta de manera decisiva a las reacciones químicas que condicionan todos los procesos fisiológicos (Hochachka & Somero, 2002), determinando los patrones de distribución y abundancia de los organismos, así como numerosas interacciones ecológicas (Andrewartha & Birch, 1954; Dunson & Travis, 1991). Podemos, por tanto, afirmar que la temperatura, como componente abiótico fundamental, representa un factor selectivo de primer orden al influir en la supervivencia, crecimiento y dispersión de los organismos (Angilletta, 2009). El estudio de los rangos de tolerancia fisiológicos, especialmente los rangos térmicos, resulta imprescindible para comprender numerosos aspectos de la biología de los organismos, ya que representan las con-

diciones que limitan su nicho fundamental y, por tanto, su presencia y evolución en un determinado hábitat y área geográfica (Hutchinson, 1981; Kearney & Porter, 2009; Soberón & Nakamura, 2009; Townsend *et al.*, 2011; Seebacher & Franklin, 2012). Se espera que las condiciones térmicas locales dirijan la evolución de los límites de tolerancia térmica, de su potencial plástico de aclimatación y en definitiva deriven en adaptaciones térmicas (Angilletta, 2009; Bozinovic *et al.*, 2011). El interés por el estudio de la evolución y funcionalidad de estos límites térmicos es fuente de numerosas hipótesis biogeográficas y representa un elemento crucial en la determinación de la vulnerabilidad de las especies a los impactos del cambio climático (Figura 1).

LOS LÍMITES DE TOLERANCIA TÉRMICA Y SU IMPORTANCIA EN EL EXAMEN DE HIPÓTESIS BIOGEOGRÁFICAS

Tradicionalmente, la base funcional de los límites de tolerancia térmica ha sido examinada desde la perspectiva de la fisiología comparada, mediante estudios intra- o inter-específicos basados en una o pocas especies (Feder, 1999; Feder & Hofmann, 1999; Rinehart *et al.*, 2000; Hochachka & Somero, 2002; Podrabsky & Somero, 2004; Buckley & Somero, 2009). Sin embargo, más recientemente, se está produciendo un renovado interés por la fisiología térmica y sus límites de tolerancia pero, en este caso, la perspectiva de análisis ha cambiado, incorporando grandes escalas geográficas y comparaciones macroespecíficas. En particular, el examen de hipótesis macroecológicas y reglas ecogeográficas incluye, implícita o explícitamente, dentro de sus predicciones el análisis de los rangos térmicos y su plasticidad (Vernberg, 1962; Janzen, 1967; Brattstrom, 1968, 1970; Rapoport, 1975; Stevens, 1992; Lomolino *et al.*, 2006). Todo esto está estimulando los estudios fisiológicos comparados a gran escala, en lo que se ha denominado macrofisiología o estudio de la variación en los caracteres fisiológicos a lo largo de macro escalas geográficas y temporales y las implicaciones ecológicas de esta variación (Chown *et al.*, 2004; Gaston *et al.*, 2009). Sin embargo, todas estas predicciones no han sido analizadas en profundidad en sus fundamentos fisiológicos (Stevens, 1989; Gaston *et al.*, 1998; Chown & Gaston, 1999; Clarke & Gaston, 2006; Ghaleb *et al.*, 2006; Millien *et al.*, 2006; Kearney & Porter, 2009). Como ejemplo podemos tomar el patrón de variación latitudinal en la riqueza de especies. La mayor biodiversidad de los trópicos en rela-

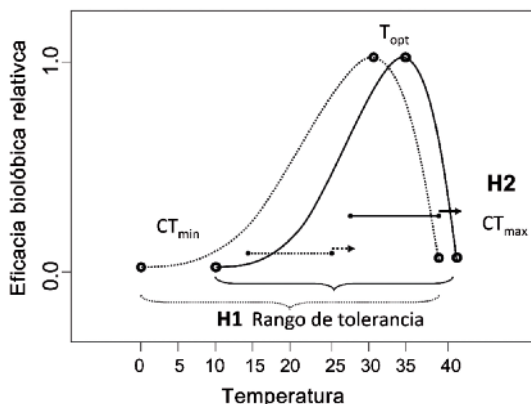


Figura 1. Curvas de eficacia biológica relativa en relación a la temperatura, para dos especies de organismos ectotérmicos hipotéticos, una tropical (línea continua) y otra templada (línea punteada), con los parámetros descriptivos esenciales: la temperatura en la cual la eficacia es máxima, T_{opt} , los límites de temperatura crítica, CT_{min} y CT_{max} , que una vez sobrepasados, implicaría la muerte del organismo. Podemos afirmar, por tanto, que el rango de tolerancia ($CT_{max} - CT_{min}$) definiría su nicho térmico fundamental. Los límites de tolerancia térmica permiten examinar hipótesis biogeográficas, (H1) hipótesis de Janzen (1967), que predice que los rangos de tolerancia térmica serán más estrechos en especies tropicales, con menor variabilidad térmica, que las especies templadas. Del mismo modo, estos límites pueden permitir examinar hipótesis en fisiología de la conservación, (H2) el calentamiento global tendrá un mayor impacto en las especies tropicales que en las templadas al estar viviendo ya más cerca de sus T_{opt} y CT_{max} . El incremento previsto por los modelos en las temperaturas ambientales (flechas hacia la derecha) implicaría que muchas especies tropicales pueden sobrepasar sus valores de CT_{max} , mientras que las especies templadas estarían bastante más alejadas de sus límites críticos, resultando incluso beneficiadas al acercarse a sus temperaturas óptimas.

ción a las zonas templadas se ha explicado, en parte, por la hipótesis de variabilidad climática de Janzen (1967), por la cual los organismos tropicales, expuestos a una menor variabilidad climática estacional, presentarían un menor rango de tolerancia térmica, una mayor especialización y, asociada a esta estenotermia, un menor potencial de dispersión y mayor nivel de aislamiento geográfico. De esta manera, los trópicos tendrían una mayor posibilidad de especiación que

los ambientes templados. Este mayor nivel de especiación puede producirse por dos mecanismos: a) conservadurismo del nicho térmico, por el cual las especies de un mismo clado o linaje mantienen su similitud climática con el transcurso del tiempo, y la formación de barreras climáticas da lugar a una especiación por alopatría (Moritz *et al.*, 2000; Wiens & Donoghue, 2004; Wiens & Graham, 2005; Graham *et al.*, 2009); y b) evolución o divergencia del nicho térmico, por el cual las especies hermanas presentan una diferenciación fisiológica ante un gradiente climático y una especiación por divergencia parapátrica (Moritz *et al.*, 2000). Aunque esta hipótesis del gradiente latitudinal en biodiversidad se fundamenta en determinantes fisiológicos, los distintos estudios que han intentado examinar la relación (Kozak & Wiens, 2007; Hua & Wiens, 2010; Cooper *et al.*, 2011; Cadena *et al.*, 2012) no han medido directamente los rangos de tolerancia fisiológicos de las especies examinadas, sino que simplemente han comparado, mediante modelos de distribución de especies, GIS y bases de datos como WorldClim, los rangos climáticos y altitudinales de las mismas. Esta aproximación, inevitablemente, confunde el nicho térmico fundamental con el nicho realizado u ocupado (véase Figura 1 en Sillero *et al.*, 2010) y, por tanto, infravalora la distribución potencial de las especies. Como afirman los autores de uno de estos estudios citados más arriba: "...This work, we hope, will inspire more detailed examination of the physiological mechanisms that might underlie the patterns we document here" [*sic*] (Cadena *et al.*, 2012). Se hace necesario, por tanto, un mayor impulso de los estudios fisiológicos para examinar estas hipótesis macroecológicas.

LOS LÍMITES DE TOLERANCIA TÉRMICA Y SU IMPORTANCIA PARA ESTIMAR LA VULNERABILIDAD DE LAS ESPECIES AL CAMBIO CLIMÁTICO

En segundo lugar, el análisis de las tolerancias térmicas tiene una especial relevancia bajo el escenario actual de crisis climática, con un calentamiento planetario de origen antropogénico que reviste unas características únicas, como la rápida tasa de calentamiento, sin precedentes en la historia del planeta (Mann & Jones, 2003; Pachauri & Reissinger, 2007). Se estima que el rápido calentamiento global tendrá muy probablemente efectos drásticos sobre la biodiversidad. Recientes evidencias empíricas muestran que el calentamiento experimentado durante el siglo XX, de 0,6°C en promedio, ha causado cambios significativos en el patrón de distribución, fenología de numerosas especies y en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Root *et al.*, 2003; Parmesan, 2006). El incremento en la tasa de calentamiento en las próximas décadas, que se espera que sea unas cinco veces superior a la experimentada durante el siglo XX (Meehl *et al.*, 2007), así como un incremento en el número de eventos climáticos extremos, como olas de calor (Schär *et al.*, 2004; Diffenbaugh & Ashfaq, 2010), pueden ser causa de extinción de poblaciones (e.g., Sinervo *et al.*, 2010). Tratar de predecir, remediar, y tal vez mejorar estos efectos, es un reto importante y urgente que actualmente afrontan los biólogos (Schwenk *et al.*, 2009).

La susceptibilidad de una población, especie o comunidad de recibir un impacto negativo debido al cambio climático dependerá de la combinación de dos factores: en primer lugar, la sensibilidad de los organismos, controlada por factores intrínsecos como pueden ser los límites de tolerancia térmica (CT_{max} y CT_{min} , Figura 1); y en segundo lugar, la canti-

dad y variación en la exposición a factores ambientales extrínsecos potencialmente estresantes, como pueden ser las temperaturas extremas (Williams *et al.*, 2008). Las inferencias más recientes en cuanto a los impactos que el calentamiento global tendrá sobre la biodiversidad se han enfocado mayormente sobre los factores extrínsecos que potencialmente determinan la distribución de las especies, ante distintos escenarios de cambio climático (e.g., modelos de distribución de especies basados en modelos de nicho ecológico). Estos modelos usan una aproximación correlativa basada en la distribución actual de las especies, que busca establecer una correspondencia entre los registros de presencia, presencia / ausencia, o abundancia, con distintas capas ambientales, principalmente temperatura y precipitación. La correspondencia estadística entre la distribución actual y el clima presente pueden potencialmente ser empleados para proyectar distribuciones futuras ante distintos escenarios (Austin, 2007; Pearman *et al.*, 2008; Thuiller *et al.*, 2008; Austin *et al.*, 2009; Sillero *et al.*, 2010). Sin embargo, estos modelos presentan deficiencias desde el momento que estas proyecciones se basan sólo en la distribución presente de la especie (que puede, por otra parte, ser incompleta) y, en el mejor de los casos, reflejaría únicamente el nicho realizado de la especie, y no la distribución que podría ser, es decir, su distribución potencial. Para modelar la distribución potencial de las especies y obtener información sobre su nicho fundamental, tendríamos que analizar las propiedades intrínsecas de las mismas, como, por ejemplo, sus rangos de tolerancia fisiológicos. Esto supone un enorme esfuerzo experimental para determinar estos parámetros fisiológicos en un elevado número de especies. Por tanto, estas aproximaciones mecanicistas, a diferencia de los

modelos correlativos, son muy escasas. Sin embargo, su enorme ventaja es que incorporan la información sobre el nicho fundamental y, en consecuencia, pueden mapear la distribución potencial de la especie que se encuentre dentro de sus límites de tolerancia, y, de esta manera, proyectar la distribución futura ante distintos escenarios de cambio climático. Estos modelos mecanicistas pueden así hacer predicciones más precisas sobre las consecuencias del calentamiento global en las próximas décadas (Pörtner & Knust, 2007; Deutsch *et al.*, 2008; Kearney *et al.*, 2009; Kolbe *et al.*, 2010; Diamond *et al.*, 2012a).

Podemos concluir que el análisis de las tolerancias térmicas y la magnitud de su respuesta plástica se convierte en una información crucial tanto para el examen de numerosas hipótesis biogeográficas, como para evaluar de manera más precisa el riesgo de las especies de sufrir estrés térmico y, por tanto, realizar estimas de su vulnerabilidad ante el calentamiento global en las próximas décadas.

EL EXAMEN DE LAS TOLERANCIAS TÉRMICAS EN ANFIBIOS. SISTEMA MODELO PARA EVALUAR HIPÓTESIS BIOGEOGRÁFICAS Y VULNERABILIDAD AL CALENTAMIENTO GLOBAL

Los anfibios son considerados la clase de vertebrados más amenazados, con alrededor del 41% de sus especies clasificadas como en peligro por la IUCN (Hoffmann *et al.*, 2010). Además de la presión directa de las actividades humanas (degradación del hábitat, contaminación), se han sugerido como causas del declive otros factores indirectos, asociados o reforzados por el calentamiento global, como las enfermedades infecciosas emergentes y los cambios en el contenido de humedad de los ambientes terrestres (Pounds *et al.*,

2006). Sin embargo, el efecto directo de estrés térmico asociado al aumento de las temperaturas máximas no se ha considerado como un factor causal directo del declive de los anfibios (Collins & Crump, 2009). La actividad nocturna y cavadora de la mayoría de las especies durante su etapa terrestre los hacen aparentemente menos susceptibles de sufrir golpes de calor. Sin embargo, durante su etapa larvaria, los renacuajos viven frecuentemente en charcas temporales poco profundas donde la temperatura del agua, si las charcas se encuentran en zonas abiertas y soleadas, puede alcanzar valores muy altos, oscilando entre 35°C - 43°C, especialmente en áreas tropicales o subtropicales donde el ángulo de inclinación del Sol alcanza su cenit (Williams, 1985; Abe & Neto, 1991; Watson *et al.*, 1995). Estas altas temperaturas pueden representar una fuente sustancial de estrés fisiológico sobre los renacuajos y posiblemente constituyan una presión de selección importante que ha favorecido la evolución adaptativa en sus tolerancias térmicas máximas.

Durante los pasados cuatro años hemos venido realizando una serie de estudios sobre la ecología térmica en distintas comunidades de larvas de anfibios situadas a lo largo de gradientes latitudinales, desde zonas templadas (Europa y NE de Estados Unidos) a subtropicales (N de Argentina) y tropicales (estado de Bahía, Brasil), donde hemos examinado distintos aspectos e hipótesis que citamos a continuación:

I. Variación latitudinal en el rango de tolerancias térmicas. Hipótesis de Janzen.

II. La medición de los límites de tolerancia térmica. Realismo en las medidas, efecto de las tasas de calentamiento.

III. Vulnerabilidad fisiológica de los anfibios ante el calentamiento global:

a) Variaciones latitudinales en la respuesta plástica de aclimatación en las tolerancias térmicas máximas.

b) Variación de las tolerancias térmicas máximas. Efectos en la comunidad.

c) Variaciones latitudinales y microambientales en los valores de tolerancias térmicas máximas y vulnerabilidad al calentamiento global ¿Están en peligro los anfibios tropicales por el calentamiento global?

I. Variación latitudinal en el rango de tolerancias térmicas en anfibios. Hipótesis de Janzen.

Una de las hipótesis macroecológicas más destacadas por sus connotaciones en distintas predicciones biogeográficas, es la hipótesis de variabilidad climática de Janzen (Janzen, 1967; Ghalambor *et al.*, 2006). Esta hipótesis predice que la variación estacional en la temperatura tiene unas implicaciones en la evolución adaptativa de los límites fisiológicos de tolerancia térmica, especialmente en organismos ectotérmicos que habitan distintas latitudes y altitudes. Las especies ectotérmicas de latitudes templadas, sometidas a variaciones estacionales en la temperatura y obligadas a soportar mayores extremos térmicos, presentarán rangos de tolerancia más amplios que los organismos ectotérmicos tropicales que serían especialistas térmicos, adaptados a un rango ambiental de temperaturas más estrecho. La hipótesis de un incremento en los rangos de tolerancia térmica con la latitud ha sido examinada en una síntesis global, incluyendo biomas terrestres y marinos, por Sunday *et al.* (2010). Igualmente, se ha examinado particularmente para distintos grupos taxonómicos: insectos (Addo-Bediako *et al.*, 2000; Kimura, 2004; Calosi *et al.*, 2010; Overgaard *et al.*, 2011), lagartos (van Berkum, 1988; Huey *et al.*, 2009; Clusella-Trullas *et al.*, 2011; Huey *et al.*, 2012) y anfibios adultos (Snyder & Weathers,

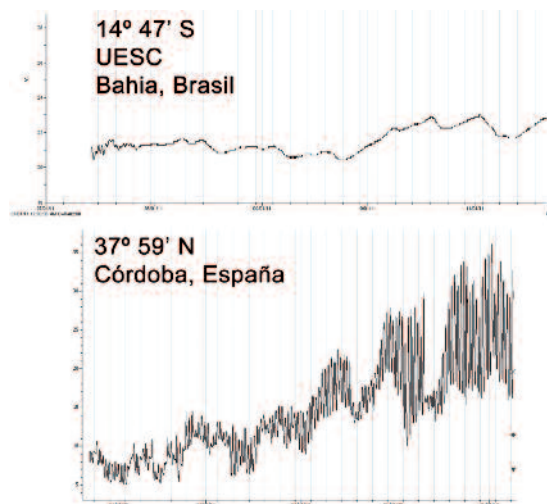


Figura 2. Perfil térmico de una charca en un ambiente tropical, localizada dentro del bosque de la Mata Atlántica, Bahía, Brasil, y una charca temporal soleada situada en Córdoba, España. Se puede apreciar la escasa variación diaria y la casi nula variación estacional en la temperatura de la charca de ambiente tropical, comparada con la charca de ambiente templado.

1975, reanalizando los datos originales de Brattstrom, 1968). Todos estos estudios sugieren que el incremento en el rango de tolerancia de los organismos ectotérmicos no tropicales se debe básicamente a la reducción más extrema con la latitud en el CT_{min} que en el CT_{max} (Snyder & Weathers, 1975; van Berkum, 1988; Addo-Bediako *et al.*, 2000; Huey *et al.*, 2009; Sunday *et al.*, 2010; Clusella-Trullas *et al.*, 2011; Overgaard *et al.*, 2011). Probablemente este resultado general obedece a que las temperaturas mínimas ambientales disminuyen rápidamente con la latitud, mientras que las temperaturas máximas son relativamente independientes de la misma, con excepción de las latitudes extremas donde las temperaturas máximas descienden abruptamente (Gaston & Chown, 1999; Bradshaw & Holzapfel, 2006; Ghalambor *et al.*, 2006; Clusella-Trullas *et al.*, 2011). Debido a los numerosos factores que alteran la determinación de los límites de tolerancia (véase apartado II), estos estudios comparados pueden adolecer de numerosos sesgos como señalan Sunday *et al.* (2010), como pueden

ser diferencias sustanciales entre estudios en las tasas de calentamiento, en el punto final subletal seleccionado, y en el nivel de aclimatación. Estas disparidades metodológicas pueden incrementar la variabilidad y el error en las comparaciones (Terblanche *et al.*, 2011; Rezende & Santos, 2012).

Examen de los rangos de tolerancia en comunidades de anfibios templadas y tropicales. Hipótesis de Janzen.

En este trabajo (L.M. Gutiérrez-Pesquera, M. Tejedo, H. Duarte, M. Solé, A.G. Nicieza, datos no publicados) se han determinado los rangos de tolerancia térmica en larvas de anfibios pertenecientes a dos comunidades, una tropical, situada en el estado de Bahía en Brasil, y una comunidad templada, en la Península Ibérica, que presentan temperaturas ambientales muy divergentes (Figura 2). Para ello, se colectaron larvas de distintas especies directamente en las charcas, siendo trasladadas a los laboratorios de referencia en la Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC, Ilhéus, Bahía, Brasil y en la EBD-CSIC, Sevilla, España. Las larvas de todas las especies fueron aclimatadas durante tres días a una temperatura uniforme de 20°C, fotoperíodo 12 L: 12 O y comida *ad libitum*. Los rangos de tolerancia térmica de cada especie se obtuvieron mediante las estimas, tanto de CT_{max} como de CT_{min} , mediante el método dinámico de Hutchison (Hutchison, 1961; Lutterschmidt & Hutchison, 1997). Cada individuo era colocado en un recipiente plástico (0,1 L), a su vez introducido en un baño Huber K15-cc-NR, que producía un calentamiento / enfriamiento gradual a una tasa constante (0,25°C min⁻¹), hasta que se alcanzaba un punto final previo a la muerte, que consistía en la total inmovilidad del renacuajo y su incapacidad de responder a 10 estímulo

los táctiles consecutivos. Una vez que el individuo alcanzaba este punto final, la temperatura del agua circundante era tomada con un termómetro de lectura rápida (Miller & Weber, Inc) con una precisión de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, tras lo cual el renacuajo era sumergido en agua a 20°C , para facilitar su reanimación, midiendo su peso húmedo y estimando su estadio de desarrollo (Gosner, 1960). Los renacuajos que no conseguían reanimarse eran descartados del análisis. Los resultados confirman la hipótesis de Janzen (1967): el rango de tolerancia muestra una correlación positiva con la latitud, una vez corregida la regresión por la filogenia. Las especies tropicales situadas a baja latitud tienen un menor rango de tolerancia térmica que las especies templadas (Figura 3). Esta diferenciación en los rangos térmicos se debe, principalmente, a que las especies de anfibios de latitudes altas disminuyen sus valores de CT_{min} con respecto a las especies tropicales, en una proporción mayor que el cambio producido en los valores de CT_{max} . Esto se demuestra estadísticamente por la heterogeneidad de pendientes entre la latitud y los dos límites de tolerancia (ANCOVA: $\text{CTM} [\text{min} / \text{max}] \times \text{Latitud}$, $P < 0,01$).

II. Medición de los límites de tolerancia térmica. Realismo en las medidas. Efecto de las tasas de calentamiento

El estudio de los fundamentos fisiológicos e implicaciones ecológicas de los límites de tolerancia son aspectos cruciales, tanto en biología evolutiva para conocer la evolución adaptativa de los mismos, como en biología de la conservación, o como se ha definido recientemente, fisiología de la conservación, para que estas estimas de tolerancia sean lo suficientemente realistas y permitan estable-

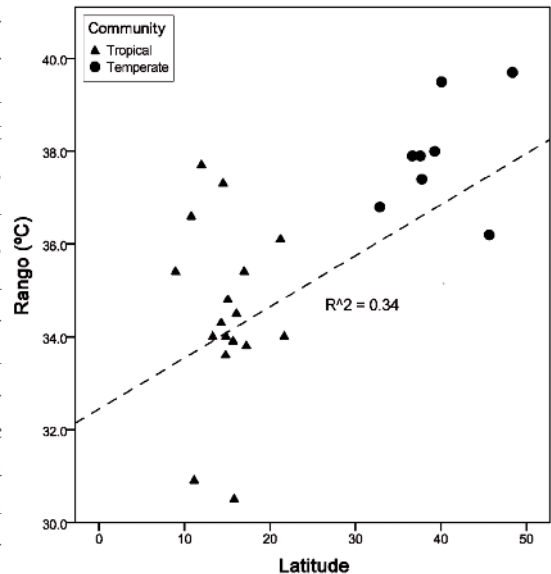


Figura 3. Examen de la hipótesis de Janzen (1967) en comunidades de larvas de anfibios tropicales (Bahía, Brasil, triángulos) y templadas (España, círculos). Los rangos de tolerancia térmica en especies templadas, con mayor variabilidad en las temperaturas ambientales, son mayores que los rangos observados en especies tropicales.

cer una valoración de vulnerabilidad ecológica frente a los impactos del cambio climático (Seebacher & Franklin, 2012 y demás contribuciones en *Conservation physiology: integrating physiological mechanisms with ecology and evolution to predict responses of organisms to environmental change*, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367 (1596), 2012).

La mayor parte de los organismos ectotérmicos están sujetos a fluctuaciones diarias en la temperatura que se producen de manera gradual en su ambiente natural (Sinclair, 2001). Sin embargo, muchos estudios de fisiología comparada, cuyo objetivo pasa por buscar patrones y mecanismos subyacentes en la respuesta fisiológica y su evolución, tradicionalmente han venido empleando metodologías muy estandarizadas pero que adolecen de un bajo nivel de realismo. Los métodos más empleados son dos: (1) cambios abruptos

desde la temperatura de aclimatación en la que se encuentra el organismo, a la temperatura de estrés experimental, que se mantiene constante, midiéndose el tiempo hasta la muerte o manteniendo esta temperatura constante en un rango de tiempos crecientes (LT_{50}) (método estático), o (2) incrementando / descendiendo experimentalmente esta temperatura hasta que se alcanza un punto final, como inmovilidad, pérdida de equilibrio o aparición de espasmos musculares (el método dinámico, CT_{max} ó CT_{min} , Lutterschmidt & Hutchison, 1997). Este valor de CT_{max} (y por analogía CT_{min}) fue definido operativamente por Cowles & Bogert (1944) como la temperatura en la cual el organismo presenta una actividad locomotora desorganizada perdiendo la habilidad de escapar de esta situación, que en condiciones naturales le llevaría inmediatamente a la muerte (Figura 1). Por otro lado, la tasa experimental de cambio en la temperatura en el método dinámico, se suele ajustar en valores muy rápidos (e.g., $1^{\circ}C\ min^{-1}$) que, en cierto sentido, se justifican para evitar introducir sesgos en las estimas con procesos compensatorios de aclimatación rápida (“hardening”) que produzcan valores de CT_{max} ó CT_{min} sobre- o sub- estimados, respectivamente (Lutterschmidt & Hutchison, 1997). El empleo de tasas de calentamiento lentas (por motivos de brevedad, de aquí en adelante, sólo trataremos el proceso de calentamiento que resulta equivalente en argumentación al proceso de enfriamiento) tiene la ventaja de que puede simular un escenario natural de incremento diario de temperatura y, por tanto, estas estimas experimentales podrían ser generalizadas en un contexto más ecológico (Terblanche *et al.*, 2011). Sin embargo, este método no resulta ajeno a dificultades de interpretación. Un calentamiento lento lleva asociado, ineludiblemente, una

mayor duración de estos ensayos, lo que puede provocar efectos colaterales que inducirían respuestas muy heterogéneas en las estimas de tolerancia. En primer lugar, exposiciones más prolongadas al calor pueden acumular estrés térmico directo y otros elementos de estrés indirectos, como un aumento en la deshidratación y una disminución en el nivel de recursos, que simultáneamente pueden reducir el CT_{max} y, por tanto, la respuesta de tolerancia sería una subestima del CT_{max} verdadero. En segundo lugar, un experimento de calentamiento largo puede, al mismo tiempo, inducir en el organismo respuestas compensatorias de aclimatación rápida que, contrariamente al proceso anterior, implicarían un aumento en la tolerancia (Rezende *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011; Overgaard *et al.*, 2012). Estos dos procesos concurrentes y de efectos contrapuestos podrían explicar el rango de plasticidades en las estimas de termo-tolerancia que se ha observado en diferentes estudios. Calentamientos lentos, y ecológicamente más realistas, determinan una depresión en los valores de tolerancia en algunas especies de peces (Becker & Genoway, 1979), insectos, (Terblanche *et al.*, 2007; Chown *et al.*, 2009; Mitchell & Hoffmann, 2010; Allen *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012), e invertebrados marinos, tanto tropicales (Nguyen *et al.*, 2011) como antárticos (Peck *et al.*, 2009); mientras que una respuesta contraria, de aclimatación beneficiosa, incrementa el valor de CT_{max} en algunas especies de peces tropicales (Chung, 1997; Mora & Maya, 2006) e insectos (Nyamukondiwa & Terblanche, 2010; Chidawanyika & Terblanche, 2011; Allen *et al.*, 2012). Si esta heterogeneidad en la respuesta de tolerancia responde a variaciones adaptativas, los estudios interespecíficos de las tolerancias deben de considerar este aspecto y, según la cuestión que nos interese, se debe decidir por

un protocolo de tasas de calentamiento rápido, que evite estos efectos distorsionadores, más idóneo en análisis comparativos (Lutterschmidt & Hutchison, 1997; Mora & Maya, 2006) o, por el contrario, nos puede interesar emplear una tasa realista que incorpore estos efectos con el fin de realizar inferencias sobre el efecto real del calentamiento global sobre los organismos.

Por otro lado, la posibilidad de cruzar métodos y aproximaciones entre distintos estudios y poder, de este modo, comparar especies o tratamientos sometidos a protocolos independientes, requiere cuantificar la precisión de las medidas de tolerancia térmica, tanto en sus componentes de validez, es decir, que protocolos independientes midan el mismo carácter (Hoffmann *et al.*, 1997; Loeschcke & Hoffmann, 2007; Sgrò *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011; Terblanche *et al.*, 2011; Rezende & Santos, 2012), y como de fiabilidad, o error de medida asociado a una repetibilidad o correlación intra-clase < 1 (Rezende & Santos, 2012; Castañeda *et al.*, 2012). Estos argumentos representan un importante motivo de preocupación que hasta la fecha ha sido prácticamente obviado (Terblanche *et al.*, 2011; Rezende & Santos, 2012). Parece necesario que las estimas de tolerancia térmica se hagan, por tanto, lo más estandarizadas posibles, empleando el mismo protocolo de aclimatación previa (Brattstrom, 1968), idénticas temperaturas iniciales y de tasas de calentamiento (Terblanche *et al.*, 2007; Rezende *et al.*, 2011), idéntico punto final en la estima (Lutterschmidt & Hutchison, 1997), similares estadios de desarrollo (Sherman, 1980), e incluso fotoperíodo y hora del día (Mahoney & Hutchison, 1969), factores que se ha demostrado que pueden producir alteraciones en las estimas de tolerancias térmicas máximas y por extensión a las estimas de temperaturas de tolerancias mínimas (Terblanche *et al.*, 2007).

Experimentos de tolerancia térmica en anfibios a distintas tasas de calentamiento.

En el primer experimento (M. Tejado, H. Duarte, M. Simon, M. Katzenberger, C.A. Navas, datos no publicados) examinamos el potencial de plasticidad en los valores de CT_{max} en renacuajos de *Hyla meridionalis*. Elegimos la fase larvaria acuática por varias razones: el medio acuático es más fácil de controlar de manera experimental, por el alto calor específico y mayor conductividad del agua, lo que determina una mayor homogeneidad en su variación térmica. Esta variabilidad puede ser fácilmente medida, tanto en laboratorio como en campo, mediante el uso de registradores continuos ("dataloggers"). Por otro lado, los anfibios durante su fase larvaria se reproducen principalmente en charcas temporales que pueden alcanzar temperaturas elevadas o incluso, a veces, sufrir congelación parcial o total, lo cual supone que las larvas han de enfrentarse a condiciones extremas que la fase terrestre adulta puede, en cierto modo, evitar, mediante la selección activa de micro-hábitats, hábitos nocturnos o incluso permanecer inactivos durante estos periodos de estrés térmico.

Las larvas fueron colectadas directamente en el campo, siendo trasladadas al laboratorio de cámaras climáticas de la EBD-CSIC y mantenidas en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo 12 L: 12 O y comida *ad libitum*. Los valores de CT_{max} fueron estimados mediante el método dinámico de Hutchison (véase apartado I). El diseño del experimento fue de doble vía con dos factores: a) Tasa de calentamiento, con tres niveles: $1,0^{\circ}\text{C min}^{-1}$, $0,05^{\circ}\text{C min}^{-1}$, y $0,03^{\circ}\text{C min}^{-1}$; y temperatura inicial del experimento a 20°C . La primera tasa corresponde a un calentamiento rápido, donde el CT_{max} se alcanzaría en menos de 20

min. Los dos últimos niveles correspondían a tasas de calentamiento naturales de las charcas donde habita esta especie, seleccionados en los 15 días últimos antes de la desecación de la charca, momento en el que se alcanzan las mayores temperaturas (véase Figura 6, panel inferior derecho). La duración del calentamiento a esta tasa lenta sería mucho más larga, alrededor de 6 - 7 h. Este factor, por tanto, examina el efecto de la variación de las tasas de calentamiento y, por extensión, la variación en la duración de la exposición al calor, sobre la tolerancia térmica máxima, donde predeciríamos una disminución en los valores de CT_{max} a una tasa lenta con respecto a la tasa rápida, suponiendo una mayor acumulación de estrés térmico en un proceso de calentamiento prolongado; b) Temperatura de aclimatación, 15°C, 20°C y 25°C, factor que examina, por un lado, la predicción de una mayor tolerancia térmica cuando las temperaturas de aclimatación son más altas (aclimatación beneficiosa; Leroi *et al.*, 1994), y, por otro, su posible interacción con la tasa de calentamiento. Los resultados mostraron, en primer lugar, que la tasa de calentamiento reduce el CT_{max} cuando este calentamiento se produce a tasas lentas, lo cual se ajusta a la predicción de una mayor acumulación de estrés térmico bajo tasas de calentamiento naturales. En segundo lugar, este efecto de la reducción de la tolerancia sólo se da a temperaturas de aclimatación bajas, desapareciendo a las temperaturas de aclimatación más altas (20°C y 25°C), (Figura 4).

En el segundo experimento (M. Tejedo, H. Duarte, M. Katzenberger, F. Marangoni, E.L. Rezende, M. Santos, datos no publicados) examinamos la plasticidad en el CT_{max} a dos tasas de calentamiento: rápida 1,0°C min⁻¹, y lenta 0,05°C min⁻¹, en 12 especies de anfibios durante su etapa larvaria. Seleccionamos

seis especies que se desarrollan en ambientes cálidos, tropicales y subtropicales de Sudamérica: *Dermatonotus muelleri*, *Hypsiboas faber*, *Pleurodema borellii*, *Rhinella schneideri* y *Scinax fuscovarius*, y SW de Norteamérica (*Scaphiopus couchii*). Asimismo, se analizaron cinco especies de zona templada de la Península Ibérica que se reproducen en charcas con temperaturas frescas: *Bufo calamita*, *H. meridionalis*, *Pelobates cultripes*, *Pleurodeles waltl*, *Pelodytes ibericus* (dos poblaciones) y *Rana iberica*. Las larvas fueron colectadas directamente en el campo, siendo trasladadas a los laboratorios respectivos en cada área de estudio (Argentina, FCEQyN-UNaM, Posadas; España, EBD-CSIC, Sevilla); las larvas de *S. couchii* fueron obtenidas mediante cría en cautividad, (Kulkarni, D. & Gómez-Mestre, I.). El procedimiento experimental implicó el mantenimiento de las larvas de todas las especies al menos cuatro días de aclimatación a una temperatura de 20°C, siguiéndose posteriormente el mismo protocolo descrito para los experimentos anteriores (véase más arriba). Los resultados mostraron que el CT_{max} presentaba una interacción significativa entre Especie x Tasa de calentamiento, lo que sugería que el efecto de las tasas de calentamiento no era equivalente entre especies (Especie x Tasa de calentamiento, $F_{12,301} = 27,011$, $P < 0,000001$, Figura 5). En concreto, las especies que presentan tolerancias más bajas tienden a reducir su CT_{max} cuando se calientan a tasas lentas naturales, mientras que las especies con tolerancias más altas tienden a incrementar su CT_{max} ante calentamientos lentos y prolongados. Las especies con valores intermedios en tolerancia no presentan cambios en CT_{max} . Aunque desconocemos los mecanismos subyacentes de esta divergencia en la respuesta plástica, lo

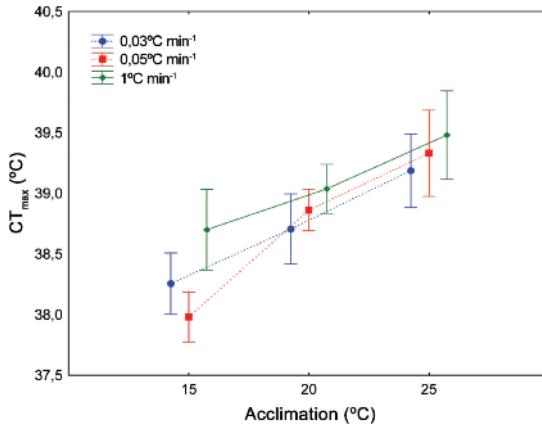


Figura 4. Valores de CT_{max} en renacuajos de ranita meridional, *H. meridionalis*, mediante el método dinámico de Hutchison. Se compararon una tasa de calentamiento rápido ($1^{\circ}C\ min^{-1}$) frente a dos tasas de calentamiento lento ($0,05^{\circ}C\ min^{-1}$, y $0,03^{\circ}C\ min^{-1}$) que simulan el calentamiento natural que sufren los renacuajos en sus charcas. Se compararon estas tasas a tres temperaturas de aclimatación.

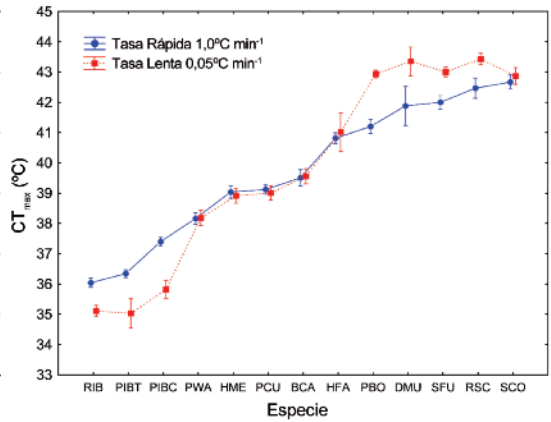


Figura 5. Efecto de las tasas de calentamiento sobre los valores de CT_{max} para 13 especies/poblaciones de anfibios templados (TEM) y subtropicales (TRO). Se puede observar una interacción entre Especie x Tasa de calentamiento, lo que implica que las especies con mayores CT_{max} incrementaron sus tolerancias térmicas cuando se producía un calentamiento lento y gradual, que simulaba un calentamiento natural, mientras que un efecto contrario de reducción en CT_{max} se producía en especies menos tolerantes.

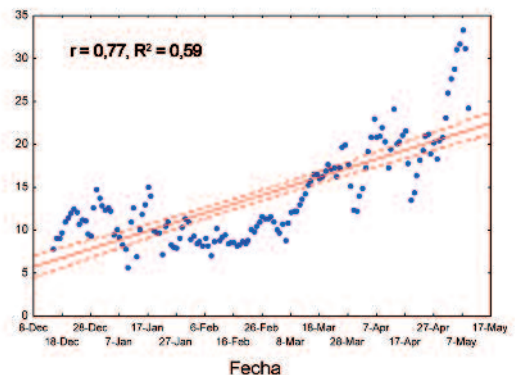
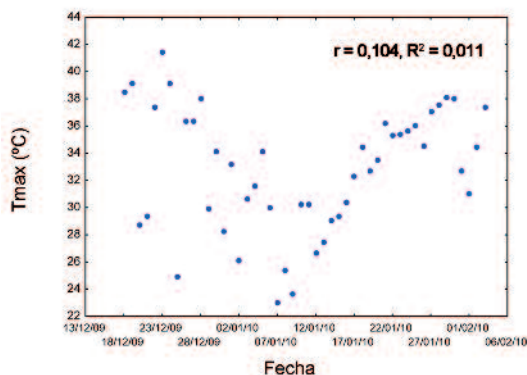
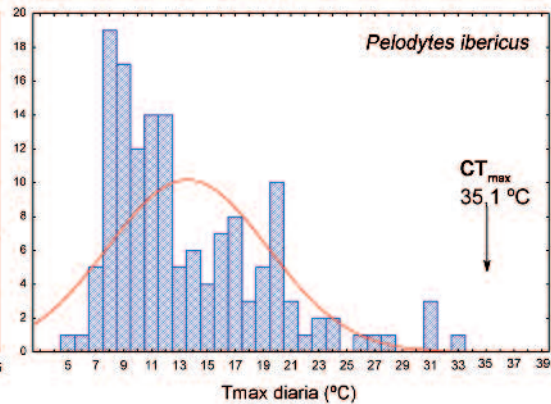
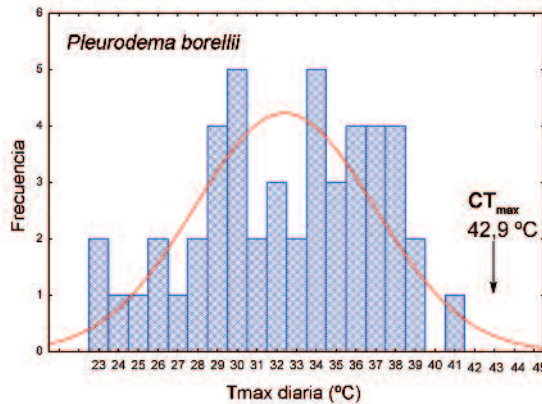


Figura 6. Distribución de las temperaturas máximas diarias, valores de CT_{max} y variación estacional en las temperaturas máximas diarias de las charcas para *P. borellii*, especie subtropical de ambiente cálido, y *P. ibericus*, especie templada de ambiente fresco.

que si parece probable es que las especies de anfibios tropicales y subtropicales que ocupan charcas cálidas, serían capaces de presentar mecanismos de aclimatación rápida que le permitan una compensación en cuanto a su respuesta de tolerancia. En la Figura 6 aparece representada la distribución de las temperaturas máximas y su variación estacional en dos especies representativas, tanto de ambiente cálido (*P. borellii*) como de ambiente fresco (*P. ibericus*), que presentan unos valores de plasticidad a tasas lentas de magnitud similar pero contrapuestas en su signo. Podemos observar dos diferencias notables. En primer lugar, la distribución de temperaturas máximas diarias con respecto a los valores de tolerancia críticos está mucho más próxima en *P. borellii* que en *P. ibericus*. En segundo lugar, las temperaturas máximas de las charcas no están correlacionadas con la fecha en *P. borellii* pero sí en *P. ibericus*. Estas diferencias se traducen en que la aparición de eventos de altas temperaturas, días con temperaturas máximas próximas ($< 5^{\circ}\text{C}$) a los valores de CT_{max} , aparecen erráticamente durante todo el desarrollo larvario en *P. borellii*, lo que determina que, en cualquier momento, se pueden producir días donde el estrés térmico es intenso. Sin embargo, estos episodios de estrés térmico aparecerían sólo al final de la estación en *P. ibericus*, cuando la mayor parte de la población larvaria ya ha metamorfoseado y abandonado el agua. Podemos sugerir la hipótesis de que las especies tropicales y subtropicales, con un mayor riesgo de sufrir calentamiento intenso y una mayor impredecibilidad en la ocurrencia de estos picos de calor, han podido evolucionar mecanismos fisiológicos de “hardening” a corto plazo, mientras que esta posibilidad no ocurre en las especies templadas. Una explicación similar ha sido sugerida

recientemente en poblaciones de *Drosophila melanogaster* y en un conjunto de especies pertenecientes al género *Drosophila* a lo largo de un gradiente latitudinal en Australia, donde las poblaciones / especies tropicales tienen un mayor potencial de repuesta rápida de “hardening” que las situadas en ambientes templados (Sgrò *et al.*, 2010; Overgaard *et al.*, 2011). Si este patrón observado de divergencia entre especies tropicales y templadas en su nivel de respuesta rápida de “hardening” está mediado por un mecanismo fisiológico subyacente, sería interesante examinar en distintas especies que difieren en su patrón de plasticidad las diferencias en la producción de Hsp70, tanto en su forma constitutiva (Hsc70) como en su forma inducible (Hsp70) a lo largo de un calentamiento experimental, empleando tasas rápidas y lentas (Tomanek, 2010; Madeira *et al.*, 2012 a, b).

III. Vulnerabilidad fisiológica de los anfibios ante el calentamiento global:

a) Variaciones latitudinales y micro-ambientales en la respuesta plástica de aclimatación en las tolerancias térmicas máximas.

Dentro de las posibilidades fisiológicas de atenuar los efectos del calentamiento global estaría la expresión de respuestas compensatorias, como la aclimatación tanto a corto (“hardening”) como a largo plazo (Bowler, 2005; Loeschcke & Sorensen, 2005). Este tipo de respuesta de aclimatación a corto plazo ha sido ya sugerida en el apartado anterior, donde describíamos la respuesta compensatoria en CT_{max} de especies de ambientes cálidos tropicales y subtropicales bajo calentamientos que siguen tasas lentas naturales. Igualmente, la respuesta de aclimatación puede basarse en una respuesta a más largo plazo (días o semanas) que produzca respuestas tam-

bién beneficiosas y que permitan el mantenimiento y resistencia de poblaciones y especies al calentamiento global (Stillman, 2002). Este mecanismo sería especialmente relevante para aquellas especies de anfibios tropicales y subtropicales de micro ambientes cálidos, que pueden ser firmes candidatos a sufrir estrés térmico agudo en las próximas décadas (véase apartado IIIc). Por otro lado, se predice que los organismos que ocupan ambientes térmicamente variables presentarán un mayor grado de plasticidad fenotípica, debido a que las señales ambientales son fiables y predecibles, mientras que en ambientes estables esta plasticidad sería más limitada o incluso se perdería ya que puede incurrir en costes (Levins, 1968; DeWitt *et al.*, 1998).

Varias aproximaciones parecen mostrar la capacidad limitada para incrementar el nivel superior de tolerancias térmicas en invertebrados (Cavicchi *et al.*, 1995; Kellermann *et al.*, 2009) e incluso la existencia de un compromiso entre el nivel de tolerancia máximo y su potencial plástico de aclimatación, observado en cangrejos mareales pertenecientes al género *Petrolisthes* (Stillman & Somero, 2000; Stillman, 2002, 2003), (véase, no obstante, un patrón contrario en escarabajos acuáticos del género *Deronectes*, donde las especies más termo-tolerantes presentan un mayor potencial de aclimatación; Calosi *et al.*, 2008).

Examen del potencial plástico de aclimatación en CT_{max} de comunidades de distintas latitudes y microhábitats.

En este trabajo (H. Duarte, M. Tejedo, J. F. Beltrán, J. Hammond, M. Katzenberger, F. Marangoni, R.A. Relyea, datos no publicados) se ha determinado en distintas comunidades de larvas de anfibios el potencial plástico del CT_{max} ante distintas temperaturas de aclimatación. Se estudiaron las diferencias latitudinales en la plasticidad de la tolerancia

máxima en dos comunidades templadas (Península Ibérica y NE de Estados Unidos) y dos subtropicales (N de Argentina). Las dos comunidades subtropicales corresponden a dos biomas térmicamente bien diferenciados: el Gran Chaco, bioma de bosque abierto con charcas de temperatura muy alta y variable a lo largo del día; y el bosque atlántico de Misiones, bioma de bosque tropical con charcas y arroyos con temperaturas diarias muy poco variables, aunque presentando cierta variabilidad estacional.

Todas las especies analizadas fueron aclimatadas a temperaturas constantes durante un mínimo de cuatro días. La respuesta plástica se examinó en un rango de 10°C, aunque los límites de este rango variaron para cada comunidad: 15°C - 25°C, para las comunidades templadas y 20°C - 30°C para las comunidades subtropicales. Estos límites variables fueron seleccionados con el propósito de evitar que las temperaturas experimentales de aclimatación resultasen estresantes y, para ello, se examinaron tanto los perfiles térmicos de las charcas, así como los valores de CT_{max} obtenidos para cada comunidad (véase apartado IIIc). Los valores de CT_{max} , para cada temperatura de aclimatación, se obtuvieron mediante el método dinámico de Hutchison a una tasa de calentamiento de 1°C min⁻¹. Los resultados (Figura 7) mostraron, por una parte, que las temperaturas crecientes de aclimatación aumentaban el valor de CT_{max} ; y, en segundo lugar, el potencial de aclimatación no variaba con la comunidad, siendo la interacción Aclimatación x Comunidad no significativa. Todas las comunidades aumentaron su CT_{max} entre 1,0°C y 1,5°C, incluyendo la comunidad de charcas de temperaturas máximas muy altas del Gran Chaco, con valores basales ya de por sí muy altos. Este resultado contrasta con la limitación en el potencial plástico observado en comunidades de cangre-

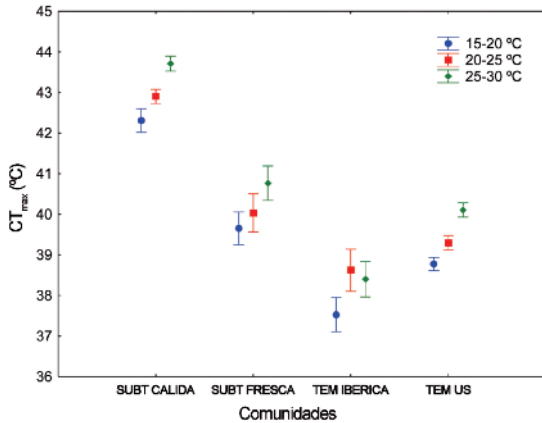


Figura 7. Respuesta plástica de CT_{max} para distintas comunidades de larvas de anfibios: dos subtropicales de ambientes cálidos y frescos, Gran Chaco y bosque Atlántico, respectivamente, y dos comunidades templadas de la Península Ibérica y NE de Estados Unidos.

jos mareales de ambientes muy cálidos (Stillman, 2003). Por otro lado, la comunidad subtropical del bosque atlántico, con temperaturas ambientales muy estables, presentó un incremento significativo en el CT_{max} , mostrado incluso por las especies estrictamente ligadas al interior del bosque como *Crossodactylus schmidtii*, *Hypsiboas curupi* y *Limnomedusa macroglossa*. Este incremento fue de similar magnitud al mostrado por la comunidad del Gran Chaco donde las temperaturas presentan una fuerte oscilación diaria (véase Figura 10). Quizás este potencial plástico pueda reflejar la posible variación térmica estacional, común en estas dos comunidades subtropicales.

b) Variación de las tolerancias térmicas. Efectos en la comunidad.

Las interacciones interespecíficas en las comunidades pueden ser afectadas por el cambio climático, lo que puede inducir alteraciones fenológicas en los ciclos de vida, promoviendo desajustes temporales entre un consumidor y la disponibilidad de sus recursos nutritivos (Beaugrand *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2003;

Durant *et al.*, 2007), así como cambios vinculados a la frecuencia de aparición de taxones especialistas y generalistas en la comunidad y su grado de dispersión (Gilman *et al.*, 2010). Por otro lado, y desde una perspectiva ecofisiológica, las posibles diferencias interespecíficas en la sensibilidad y tolerancias térmicas, principalmente en especies consideradas relevantes en las interacciones tróficas (depredadores o competidores), pueden ser decisivas en el mantenimiento de las comunidades ante escenarios de cambio climático (Sanford, 1999; Pincebourde *et al.*, 2008; Peck *et al.*, 2009). Las charcas temporales que ocupan los anfibios durante su etapa larvaria pueden ser un buen modelo para examinar estos efectos ya que son comunidades relativamente simples, de pequeña escala y no presentan estratificación de la temperatura, con lo cual, la existencia de microambientes térmicos queda muy reducida. Por otro lado, estas comunidades de charcas temporales, pueden ser simuladas y replicadas, mediante mesocosmos, en diseños experimentales con un importante poder estadístico (e.g., Tejedo & Reques, 1994; De Meester *et al.*, 2011). Nuestro interés dentro del contexto de la ecología térmica pasaría por conocer los parámetros térmicos fisiológicos, en particular los límites de tolerancia máximos (CT_{max}), de la comunidad de larvas de anfibios, de sus competidores (zooplankton) y de sus depredadores.

Análisis de las tolerancias térmicas máximas en una comunidad de charcas temporales.

En este estudio (H. Duarte, M. Tejedo, J. Hammond, M. Katzenberger, R.A. Relyea, datos no publicados), se examinó el CT_{max} de una comunidad de anfibios y sus competidores (zooplankton) y depredadores del NE de Estados Unidos (Estación Biológica Pymatuning, NW Pennsylvania, Universidad

de Pittsburgh). Los valores de CT_{max} se obtuvieron para todos los taxones mediante el método dinámico de Hutchison a una tasa de calentamiento de $1^{\circ}C \text{ min}^{-1}$. Los resultados (Figura 8) mostraron que, tanto las 11 especies de anfibios como sus potenciales competidores (*Daphnia magna* y tres especies de anfípodos), tenían tolerancias fisiológicas similares. Sin embargo, las cuatro especies de insectos predadores más frecuentes (pertenecientes a los géneros *Anax*, *Enallagma*, *Lethocerus* y *Notonecta*) expresaron un valor de CT_{max} promedio mucho más alto ($+\Delta 5,5^{\circ}C$). Esta diferencia tan notable puede ser relevante en un contexto de cambio climático. Pensamos que la comunidad de larvas de anfibios posiblemente no sufrirá estrés térmico agudo, ya que las charcas de esta región de Norteamérica difícilmente llegarán a alcanzar valores próximos a sus CT_{max} . Sin embargo, no podemos descartar que se alcancen valores que determinen exposiciones crónicas de estrés térmico que reduzcan las tasas de crecimiento y desarrollo de los renacuajos, como también la velocidad de escape de estos ante sus depredadores. Estos últimos, muy posiblemente presenten T_{opt} más elevadas, desde el momento que las T_{opt} en ectotermos suelen estar fuertemente correlacionadas con sus valores de CT_{max} (Huey & Bennett, 1987; Huey & Kingsolver, 1993; Huey *et al.*, 2009, 2012; Clusella-Trullas *et al.*, 2011). Esto podría acarrear un incremento en las tasas de depredación alterando probablemente la estructura de la comunidad de estas charcas. Sería interesante profundizar en la variación de los parámetros térmicos (CT_{max} , CT_{min} , T_{opt} , y depresión metabólica) en distintos biomas y nichos tróficos y valorar las posibles consecuencias a nivel de comunidad.

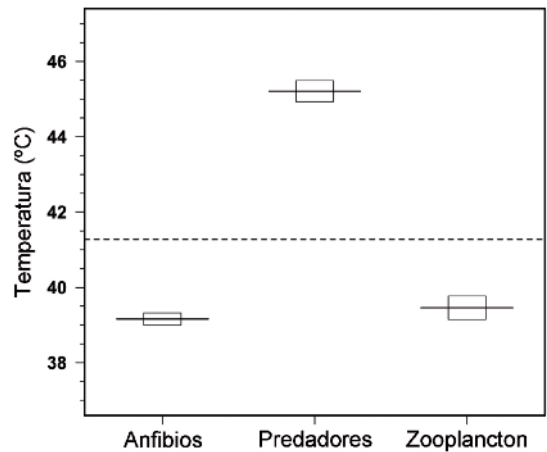


Figura 8. Valores de CT_{max} (media e intervalos de confianza 95%) para distintos grupos tróficos de una comunidad de charcas temporales del NE de Estados Unidos: anfibios (11 especies), zooplancton (competidores de anfibios, cuatro especies) y depredadores (cuatro especies).

c) Variaciones latitudinales y micro-ambientales en los valores de tolerancia térmica máxima y vulnerabilidad al calentamiento global ¿Están en peligro los anfibios tropicales por calentamiento global?

En el contexto alarmante de crisis climática, con impactos potenciales sobre la biodiversidad global, es absolutamente prioritario, siendo un imperativo sobre la comunidad científica (Schwenk *et al.*, 2009), identificar las comunidades y especies que están actualmente viviendo a unas temperaturas ambientales próximas a sus límites de tolerancia. Se ha demostrado, en distintos taxones, una correlación filogenética entre los límites de tolerancia (CT_{max}) y las temperaturas máximas ambientales (T_{max}) (Tomanek & Somero, 1999; Stillman & Somero, 2000; Hochachka & Somero, 2002; Compton *et al.*, 2007; Sinervo *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2012). En todos los casos, la pendiente de la regresión entre CT_{max} y T_{max} es menor que 1, (β : 0,51, cangrejos *Petrolisthes* [Stillman & Somero, 2000]; 0,50, varios invertebrados y peces [Hochachka & Somero, 2002];

0,70, bivalvos [Compton *et al.*, 2007]; 0,51, lagartos Phrynosomatidae [Sinervo *et al.*, 2010]; 0,18, larvas de anfibios [Duarte *et al.*, 2012]; véase Figura 9). La interpretación de estos resultados puede resumirse de este modo: una subida en la temperatura ambiental de 1,0°C supondría un incremento en el CT_{max} de sólo 0,5°C en promedio entre taxones. Esto implica una limitación en la evolución fisiológica de las tolerancias que presenta una tasa de evolución media de sólo un 50% con respecto al incremento en la T_{max} ambiental. En el caso de los anfibios durante su etapa acuática, este desfase evolutivo es aún mucho más drástico (sólo un 20% del incremento en T_{max}). Como consecuencia, podríamos generalizar que dentro de las especies y comunidades de organismos ectotérmicos que, *a priori*, podrían sufrir mayores impactos por el calentamiento, estarían, entre otras,

las especies que habitan en este momento micro-hábitats cálidos, ya que muy probablemente sus valores de tolerancia máxima fisiológica no estarán muy por encima de las temperaturas máximas de sus hábitats. Sin embargo, dada la enorme diversidad de micro-hábitats térmicos y las capacidades compensatorias de los organismos, como la aclimatación y la inercia comportamental (Bogert, 1949; Huey *et al.*, 2003), el poder de esta generalización puede quedar reducido. Es por ello, que creemos necesario hacer una estimación exhaustiva tanto de los valores de CT_{max} como de las T_{max} , en grupos taxonómicos sensibles como en sus microambientes térmicos.

Hasta la fecha existe muy poca información que aúne las informaciones fisiológicas de los organismos con las temperaturas reales a las que estos se ven expuestos. En la mayoría de ocasiones, la información ambiental se infiere de modo indirecto a partir de bases de datos climáticas como WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005) que no recogen la información micro-climática. A pesar de estas deficiencias, los resultados están confirmando que las comunidades más vulnerables se sitúan en ambientes tropicales. Es el caso para varios grupos de ectotermos terrestres: insectos pertenecientes a diversos órdenes (Deutsch *et al.*, 2008), hormigas (Diamond *et al.*, 2012b) y lagartos de bosques tropicales (Huey *et al.*, 2009). Sin embargo, otros análisis en reptiles parecen mostrar mayor vulnerabilidad en comunidades situadas en latitudes medias (Clusella-Trullas *et al.*, 2011). En organismos ectotérmicos marinos, las comunidades con mayor riesgo de sufrir choques térmicos son, igualmente, las comunidades tropicales, tanto en cangrejos mareales del género *Petrolisthes* (Stillman & Somero, 2000) como en moluscos bivalvos (Compton *et al.*, 2007).

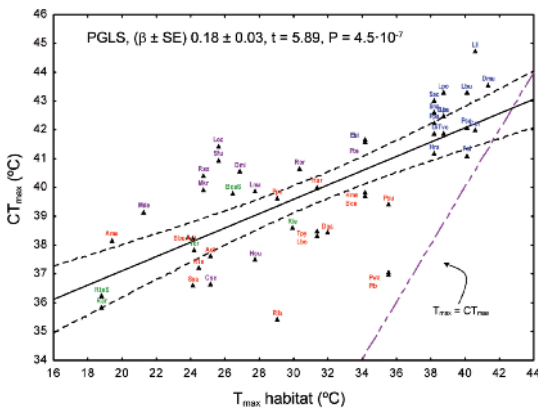


Figura 9. Relación entre la tolerancia térmica (CT_{max}) y la temperatura máxima (T_{max}) de las charcas de reproducción para 47 especies de larvas de anfibios, pertenecientes a comunidades subtropicales de ambiente cálido de Gran Chaco (rótulos azules) y frescos de bosque Atlántico (morados), y comunidades templadas de la Península Ibérica (rojos) y Suecia (verdes). La regresión filogenética (PGLS) muestra una relación significativa, con una pendiente de 0,18. La línea de igualdad ($T_{max} = CT_{max}$) representa un umbral letal, la proximidad de cada especie a esta línea permite estimar su riesgo de muerte por causa de estrés térmico agudo, bajo las condiciones contemporáneas de su hábitat (modificado de Duarte *et al.*, 2012).

Vulnerabilidad al estrés térmico en comunidades de larvas de anfibios subtropicales y templados. Efecto del microambiente (Duarte et al., 2012).

La predicción fundamental de este estudio es que las especies subtropicales serían más susceptibles a sufrir estrés térmico agudo y, por tanto, a la extinción inducida por el calentamiento global, que las especies templadas, ya que sus valores de CT_{max} serían sólo ligeramente superiores a los valores de T_{max} de las charcas que habitan. Por otro lado, las variaciones térmicas micro-ambientales podrían ser decisivas en la determinación del nivel de vulnerabilidad.

El examen de estas predicciones se realizó en 47 especies de anfibios, durante su etapa larvaria, pertenecientes a tres comunidades: dos comunidades subtropicales del norte de Argentina, con ambientes térmicos muy con-

trastados (Figura 10): la comunidad del Gran Chaco, donde los ambientes larvarios son charcas temporales de bosque abierto y muy soleadas, con temperaturas diarias muy variables y T_{max} muy altas que oscilan entre 34,2°C y 41,4°C, y la comunidad del bosque Atlántico de la provincia de Misiones, que se reproducen en charcas y arroyos dentro del bosque, con pocas oscilaciones diarias y temperaturas máximas que oscilan entre 21,3°C y 30,4°C. Igualmente, se examinó una comunidad templada en Europa (Península Ibérica y Suecia) que incluía especies con reproducción invernal, (sur de la Península Ibérica), y especies con reproducción a principios de verano, (Suecia y montañas ibéricas). Los rangos de temperatura máxima oscilan entre 18,8°C y 35,5°C. Los valores de CT_{max} se

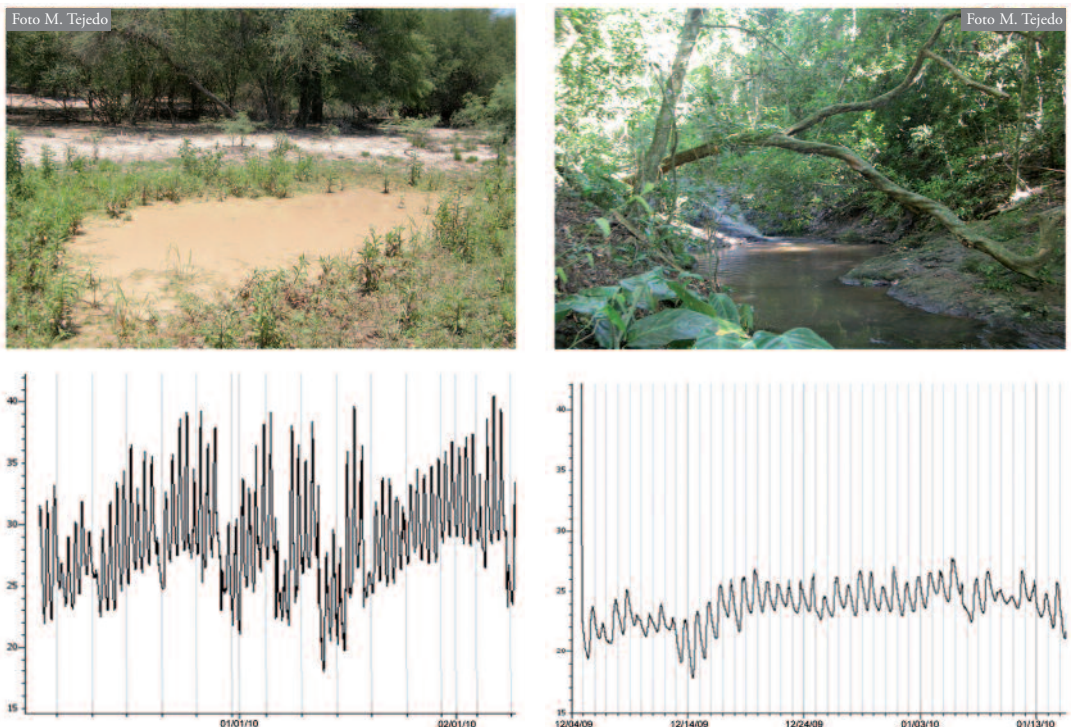


Figura 10. Perfiles térmicos de dos micro-ambientes acuáticos del norte de Argentina. Paneles a la izquierda, bosque abierto del Gran Chaco (Teniente Fraga, provincia de Formosa, 23°45'36.33"S / 62°08'6.62"W; 28 Nov 2009 - 10 Feb 2010), y del bosque Atlántico (paneles a la derecha), charcas del bosque Atlántico (Cuña Pirú, provincia de Misiones: 27°03'37.94"S / 54° 49' 39.82" W; 6 Dic 2009 - 15 Ene 2010).

obtuvieron, para todas las especies de las distintas comunidades, siguiendo el método dinámico de Hutchison, a una tasa de calentamiento de 1°C min⁻¹ y cuatro días de aclimatación a 20°C, en los distintos laboratorios de referencia (Argentina, CECOAL - CONICET, Corrientes 2009, FCEQyN - UNaM, Posadas, 2010; España, EBD-CSIC, Sevilla 2009; Suecia, EBC, Universidad de Uppsala, 2009). Al mismo tiempo, se consiguieron los perfiles térmicos y las T_{max} de un total de 34 charcas y arroyos.

Los resultados revelaron que los valores de CT_{max} de las especies de la comunidad de charcas de elevada temperatura del Gran Chaco fueron claramente superiores, tanto a los de la comunidad templada, como a los de la comunidad subtropical de bosque atlántico

(Figura 9). Paradójicamente, esta comunidad mostró la menor tolerancia al calentamiento (TC) (TC = CT_{max} - T_{max}, *sensu* Deutsch *et al.* [2008]; Figura 11). Este resultado sugiere que la subida esperada en las T_{max} de las charcas del Gran Chaco pronto superarán los valores de CT_{max} de las especies de esta comunidad y, por tanto, estas especies serán más susceptibles de sufrir futuras extinciones locales debido al incremento en el nivel de exposición a episodios de estrés térmico agudo. Las especies del bosque atlántico presentan mayores TCs, al estar protegidas por el dosel forestal, y, por tanto, estarían relativamente protegidas ante el calentamiento global. Finalmente, las especies templadas estarían relativamente seguras de los impactos térmicos, excepto aquellas especies poco tolerantes

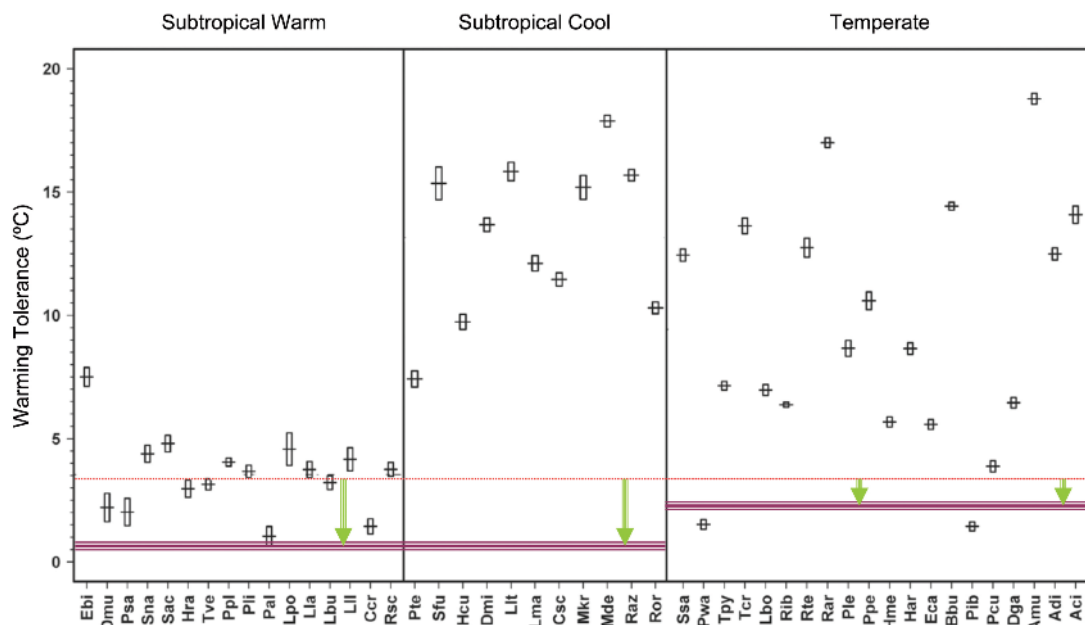


Figura 11. Valores de tolerancia al calentamiento (“Warning Tolerance” = CT_{max} - T_{max}, *sensu* Deutsch *et al.* [2008]) para 47 especies de larvas de anfibios pertenecientes a dos comunidades subtropicales de ambiente cálido de Gran Chaco (“Subtropical Warm”) y frescos de bosque Atlántico (“Subtropical Cool”), y una comunidad templada de Europa (“Temperate”). La línea roja muestra los valores de tolerancia al calentamiento, si suponemos un incremento de 3,0°C por el calentamiento global. Aquellas especies que queden por debajo de la línea sufrirían extinciones por estrés térmico intenso. Las flechas verdes y las dobles líneas moradas, indican el nivel de riesgo corregido una vez que se incluyen mecanismos fisiológicos de mitigación como aclimatación a corto y medio plazo (ver apartados II y IIIa) (modificado de Duarte *et al.*, 2012).

y de reproducción tardía (e.g., *P. ibericus*, *P. waltl*, *P. cultripes*) que pueden sufrir estrés térmico en las décadas venideras.

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de que las comunidades de organismos ectotérmicos que están sometidas a altas temperaturas ambientales son más susceptibles de recibir impactos por el calentamiento global. Por extensión, podríamos considerar que otras comunidades de anfibios tropicales y subtropicales, que se reproducen en verano, en charcas soleadas y en biomas no forestales (e.g., formaciones de Cerrado, Caatinga y Llanos en Sudamérica, sabanas tropicales y subtropicales de Australia, sabanas tropicales del centro, sur y oeste de África e India), podrían sufrir niveles similares de estrés térmico. Por otro lado, se confirma la predicción de que la variación en el micro-hábitat térmico resulta determinante en la vulnerabilidad a sufrir estrés por el calentamiento en comunidades geográficamente próximas.

Este último resultado es destacable desde el momento en el que el 72% de todas las especies de anfibios conocidas viven en bosques tropicales, tanto montanos como de llanura (Chanson *et al.*, 2008). El dosel forestal protege térmicamente los ambientes acuáticos donde se desarrollan las larvas y posiblemente también los huevos y embriones terrestres de especies con desarrollo directo. La deforestación intensa de los bosques tropicales puede determinar la pérdida de esta protección con la consiguiente disminución de humedad relativa y subida de temperaturas en charcas, arroyos y suelo del bosque (Ernst & Rödel, 2005; Meegaskumbura *et al.*, 2012), lo que puede promover extinciones locales de aquellas especies con menor tolerancia térmica. Nuestros análisis en el bosque atlántico de Misiones muestran que las temperaturas de charcas y arroyos deforestados sufren un incremento notable, tanto en la variabilidad diaria, como en

los valores máximos de sus temperaturas, que llegan a sobrepasar los límites de tolerancia de dos especies ligadas al bosque (*C. schmidti* e *H. curupi*, Figura 12). Estos cambios en las temperaturas, por causa directa de la deforestación de origen antrópico, podrían ser una de las causas de la disminución observada en la riqueza de especies con reproducción acuática en fragmentos de Mata Atlántica del SE de Brasil (Becker *et al.*, 2007, 2009).

El valor promedio de TC para la comunidad del Gran Chaco (3,5°C), es claramente insuficiente para evitar el riesgo de extinción de muchas de las poblaciones de esta comunidad de anfibios, ya que no supera el incremento en las temperaturas medias y la intensificación de olas de calor esperado en esta área geográfica (Burgos & Fuenzalida-Ponce, 1991; IPCC, 2007; Battisti & Naylor, 2009). Sin embargo, existen mecanismos biológicos de remediación que pueden minimizar la vulnerabilidad extrema de esta comunidad. Si tenemos en cuenta que los anfibios presentan un escaso nivel de movilidad y dispersión (véase no obstante, Funk *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2006), los mecanismos que probablemente pueden compensar los efectos del calentamiento global variarán según la intensidad y la temporalidad de este calentamiento (véase Figura 7 en Huey *et al.*, 2012). En las etapas iniciales del proceso, cuando el nivel de calentamiento es bajo, la compensación a través de mecanismos de termorregulación, (el efecto Bogert de inercia comportamental; Bogert, 1949; Huey *et al.*, 2003; Marais & Chown, 2008) y la aclimatación fisiológica serían la respuestas más rápidas. Los renacuajos, aunque pueden termorregular de manera efectiva (Hutchison & Dupré, 1992), difícilmente pueden hacerlo cuando las temperaturas de las charcas alcanzan temperaturas elevadas, al no existir apenas estratificación, sobre todo en charcas temporales de poca profundidad y expuestas al sol. Si la temperatura

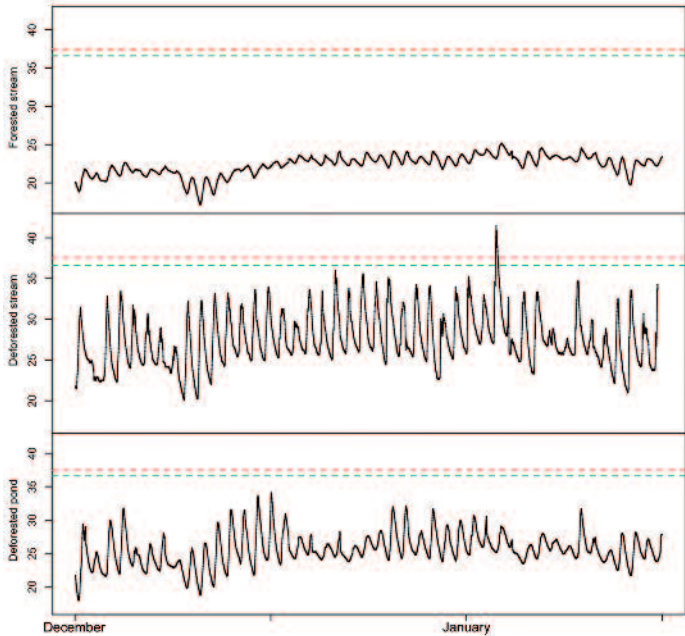


Figura 12. Comparación de los perfiles térmicos de charcas y arroyos del bosque Atlántico de la provincia de Misiones, NE de Argentina. En el panel superior aparece un arroyo con la cubierta forestal intacta, mientras que en los paneles central e inferior aparecen los perfiles de temperatura para un arroyo y charca deforestados, respectivamente. Las líneas discontinuas son los valores de CT_{max} para dos especies de la comunidad, *C. schmidthii* e *H. curupi*. Se puede apreciar que las temperaturas de los dos micro-ambientes deforestados sufren un incremento notable, tanto en la variabilidad diaria como en los valores máximos, con respecto al arroyo intacto, llegando incluso a superar los valores de tolerancia de estas especies.

ambiental sigue aumentando y se superan los límites que permiten estos mecanismos plásticos, la compensación se tiene que sustentar en una respuesta evolutiva mediante cambios genéticos compensatorios. Las pruebas empíricas parecen mostrar dificultades en las poblaciones naturales para adaptarse rápidamente al cambio climático, debido a una baja heredabilidad en las tolerancias (Kellerman *et al.*, 2009), interacciones genéticas entre caracteres y, finalmente, a variaciones en la dirección de la selección (Hoffmann & Sgrò, 2011). Además, los anfibios son organismos con un tiempo de generación relativamente largo, con lo cual las respuestas evolutivas rápidas, como mecanismo compensatorio al cambio climático, pueden ser poco eficaces. Un mecanismo compensatorio alternativo sería un cambio fenológico en la reproducción que eludiera

los episodios de calentamiento intenso. Los cambios en las fechas de reproducción son factibles en anfibios (Beebe, 1995) y serían una posibilidad de evitar estrés térmico en aquellas especies templadas que sufren temperaturas altas sólo al final de la estación, pero no así en las especies tropicales y subtropicales como las del Gran Chaco donde los picos de altas temperaturas pueden ocurrir de manera errática y no predecible (apartado II, Figura 6). En resumen, pensamos que el mecanismo de mitigación real más efectivo para esta comunidad sería el de aclimatación fisiológica descrito previamente (apartados II y IIIa). En este caso, las especies vulnerables de la comunidad del Gran Chaco pueden tener una ligera respuesta compensatoria, tanto por aclimatación a medio plazo (días) como a corto plazo (horas), que puede incrementar su CT_{max} como máximo

unos 2 - 3°C (ver apartados II y IIIa, Fig. 5 y 7). Por tanto, estas especies podrían tener cierto nivel de seguridad aumentando su tolerancia al calentamiento (Figura 11), aunque no podemos descartar un riesgo significativo de sufrir estrés térmico agudo, especialmente ante episodios extremos de olas de calor. En el caso de las especies templadas esta subida global en CT_{max} sería inferior ya que los valores de CT_{max} estimados a tasa rápida están sobrevalorados entre 0°C y 1,4°C (Fig. 4 y 5) lo cual determina una compensación inferior a las especies tropicales, lo cual puede determinar que algunas especies templadas poco tolerantes puedan sufrir igualmente estrés térmico en las próximas décadas.

CONCLUSIONES

El análisis de parámetros fisiológicos como las tolerancias térmicas resulta fundamental tanto para el examen de numerosas hipótesis biogeográficas como para conseguir estimas realistas de la vulnerabilidad de los organismos ectotérmicos al calentamiento global. En este estudio hemos examinado, en primer lugar, la hipótesis de Janzen aplicada a larvas de anfibios, demostrando que en una comunidad tropical los rangos de tolerancia son más estrechos que en una comunidad templada, gravitando estas diferencias en una mayor tolerancia a temperaturas bajas de las especies de climas templados, cuyas temperaturas mínimas ambientales varían de manera estacional. En segundo lugar, hemos examinado la hipótesis de una mayor vulnerabilidad de los anfibios tropicales a sufrir los efectos del calentamiento global. Nuestros resultados sugieren que las comunidades de larvas de anfibios subtropicales que se reproducen en ambientes de altas temperaturas, presentan, como predice la hipótesis, una mayor vulnerabilidad a sufrir estrés térmico agudo, a pesar de presentar mayo-

res valores de tolerancia térmica, y un mayor nivel de compensación por aclimatación rápida. Igualmente, descubrimos que la variación en los micro-ambientes térmicos son fundamentales en estas estimas de vulnerabilidad, que, asimismo, pueden alterarse por acción directa del hombre (e.g., deforestación de los bosques tropicales). Proponemos un mayor estímulo en los estudios de fisiología térmica en dos áreas principales. Primero, en el ámbito de la biología de la conservación para promover tanto modelos bioclimáticos mecanicistas, que proporcionen estimas de vulnerabilidad más realistas, como un conocimiento más profundo de los impactos globales sobre la comunidad e implicaciones asociadas a sinergias con contaminantes como, por ejemplo, la disminución observada en la tolerancia térmica (CT_{max}) en renacuajos de *Bufo calamita* tratados con el pesticida glifosato, (C. Cabido, I. Garin, X. Rubio, M. Tejado, datos no publicados). Un segundo ámbito de impulso sería en los estudios biogeográficos, en particular en el análisis de los fundamentos fisiológicos del origen y mantenimiento de la extraordinaria biodiversidad existente en las montañas tropicales.

AGRADECIMIENTOS: Numerosas personas han ayudado de manera decisiva en este proyecto, tanto en el trabajo de campo como en el soporte logístico. Mostramos un especial reconocimiento a: J.L. Acosta, D. Baldo, R. Cajade, M. Duré, M. García, A.I. Kehr, D. Martí, Lety Monzón, J.J. Neiff, N. Oromí, R. Reques y E. Shaefer en CECOAL-CONICET, UNNE y FCEQyN-UNaM//CONICET (Argentina); D. Álvarez, M. Benítez, J. Bosch, C. Cabido, M. Chiroso, J. Díaz, D. Donaire, A. Egea, I. Garin, I. Gómez-Mestre, D. Kulkarni, C. Maldonado, R. Reques, X. Rubio, S. Tripodi y E. Valdés (España); A. Laurila, G. Orizaola y B. Rogell (EBC, Uppsala University, Suecia); W. Brogan, J. Hammond, J. Hua y A. Stoler (PLE, University Pittsburgh); I. Ribeiro, A. Santiago y E. Valdés (UESC, Ilhéus, Brasil). Gracias en especial a Z.P. Sousa do Amaral

por introducirnos en el análisis de CT_{max} en larvas de anfibios, y a E. Martín-Lorente por el diseño y fabricación del instrumental. Todas las especies fueron muestreadas y analizadas experimentalmente con los permisos del Ministerio de Ecología de la provincia de Misiones (Argentina); Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y Consejería de Medio Ambiente del Principado de Asturias (España); Länsstyrelsen Uppsala Län (Suecia); "Use of Laboratory Animals in Research and Education, University of Pittsburgh (Estados Unidos). Este proyecto ha sido financiado por la Agencia Española de Cooperación y Desarrollo

(AECID), ayudas A/016892/08, A/023032/09, AP/038788/11 y por el proyecto CGL2009-12767-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación a MT y CGL2008-04814-C02-02 a JFB. ARB fue financiado por una beca postdoctoral del Ministerio de Educación y Cultura de España (MEC2007-0944), LMGP fue financiado por una beca FPI BES-2010-032912 del Ministerio de Economía y Competitividad y MK por una beca de la Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), SFRH/BD/60271/2009. Agradecemos finalmente las sugerencias y comentarios sobre el ms del editor, un revisor y M. Piñero.

REFERENCIAS

- Abe, A.S. & Neto, J.R. 1991. Tolerance to high temperatures in tadpoles of *Leptodactylus fuscus* and *Hyla fuscovaria* in temporary ponds (Amphibia, Leptodactylidae, Hylidae). *Zoologischer Anzeiger*, 226: 280-284.
- Addo-Bediako, A., Chown, S.L. & Gaston, K.J. 2000. Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proceedings of the Royal Society, London B*, 267: 739-745.
- Allen, J.L., Clusella-Trullas, S. & Chown, S.L. 2012. The effects of acclimation and rates of temperature change on critical thermal limits in *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) and *Cyrtobagous salviniae* (Curculionidae). *Journal of Insect Physiology*, 58: 669-678.
- Andrewartha, H.G. & Birch, L.C. 1954. *The distribution and abundance of animals*. University of Chicago Press. Chicago.
- Angilletta, M.J., Jr. 2009. *Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis*. Oxford University Press. Oxford.
- Austin, M. 2007. Species distribution models and ecological theory: A critical assessment and some possible new approaches. *Ecological Modelling*, 200: 1-19.
- Austin, M.P., Smith, T.M., Van Niel, K.P. & Wellington, A.B. 2009. Physiological responses and statistical models of the environmental niche: a comparative study of two co-occurring *Eucalyptus* species. *Journal of Ecology*, 97: 496-507.
- Battisti, D.S. & Naylor, R.L. 2009. Historical warnings of future food security with unprecedented seasonal heat. *Science*, 323: 240-244.
- Beaugrand, G., Brander, K., Lindley, J.A., Souissi, S. & Reid P.C. 2003. Plankton effect on cod recruitment in the North Sea. *Nature*, 426: 661-664.
- Becker, C.D. & Genoway, R.G. 1979. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes*, 4: 245-256.
- Becker, C.G., Fonseca, C.R., Haddad, C.F.B., Batista, R.F. & Prado, P.I. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*, 318: 1775-1777.
- Becker, C.G., Fonseca, C.R., Haddad, C.F.B. & Prado, P.I. 2009. Habitat split as a mechanism for local population declines of amphibians with aquatic larvae. *Conservation Biology*, 24: 287-294.
- Beebe, T.J.C. 1995. Amphibian breeding and climate. *Nature*, 374: 219-220.
- Bogert, C.M. 1949. Thermoregulation in reptiles, a factor in evolution. *Evolution*, 3: 195-211.
- Bowler, K. 2005. Acclimation, heat shock and hardening. *Journal of Thermal Biology*, 30: 125-130.
- Bozinovic, F., Calosi, P. & Spicer, J.I. 2011. Physiological correlates of geographic range in animals. *Annual review of Ecology, Evolution and Systematics*, 42: 155-179.
- Bradshaw, W.E. & Holzapfel, C.M. 2006. Evolutionary response to rapid climate change. *Science*, 312: 1477-1478.
- Brattstrom, B.H. 1968. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comparative and Biochemical Physiology*, 24: 93-111.
- Brattstrom, B.H. 1970. Thermal acclimation in Australian amphibians. *Comparative and Biochemical Physiology*, 35: 69-103.
- Buckley, B.A. & Somero, G.N. 2009. cDNA microarray analysis reveals the capacity of the cold-adapted Antarctic fish *Trematomus bernacchii* to alter gene expression in response to heat stress. *Polar Biology*, 32: 403-415.
- Burgos, J.J. & Fuenzalida-Ponce, H. 1991. Climate change predictions for South America. *Climatic Change*, 18: 223-239.
- Cadena, C.D., Kozak, K.H., Gomez, J.P., Parra, J.L., McCain, C.M., Bowie, R.C.K., Carnaval, A.C., Moritz, C., Rahbek, C., Roberts, T.E., Sanders, N.J., Schneider, C.J., VanDerWal, J., Zamudio, K.R. & Graham, C.H. 2012. Latitude, elevational climatic zonation and speciation in New World vertebrates. *Proceedings of the Royal Society B*, 279: 194-201.
- Calosi, P., Bilton, D.T. & Spicer, J.I. 2008. Thermal tolerance, acclimatory capacity and vulnerability to global climate change. *Biology Letters*, 4: 99-102.
- Calosi, P., Bilton, D.T., Spicer, J.I., Votier, S.C. & Atfield, A. 2010. What determines a species' geographical range? Thermal biology and latitudinal range size relationships in European diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae). *Journal of Animal Ecology*, 79: 194-204.
- Castañeda, L.E., Calabria, G., Betancourt, L.A., Rezende, E.L. & Santos, M. 2012. Measurement error in heat tolerance assays. *Journal of Thermal Biology*, 37: 432-437.

- Cavicchi, S., Guerra, D., La Torre, V. & Huey, R.B. 1995. Chromosomal analysis of heatshock tolerance in *Drosophila melanogaster* evolving at different temperatures in the laboratory. *Evolution*, 49: 676–684.
- Chanson, J.S., Hoffmann, M., Cox, N.A. & Stuart, S.N. 2008. The state of the world's amphibians. 33–44. In: Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P & Young, B.E. (eds.), *Threatened amphibians of the world*. Lynx editions. Barcelona.
- Chidawanyika, F. & Terblanche, J.S. 2011. Rapid thermal responses and thermal tolerance in adult codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Physiology*, 57: 108–117.
- Chown, S.L. & Gaston, K.J. 1999. Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. *Biological Reviews*, 74: 7–120.
- Chown, S.L., Gaston, K.J. & Robinson, D. 2004. Macrophysiology: large-scale patterns in physiological traits and their ecological implications. *Functional Ecology*, 18: 159–167.
- Chown, S.L., Jumbam, K.R., Sørensen, J.G. & Terblanche, J.S. 2009. Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. *Functional Ecology*, 23: 133–140.
- Chung, K.S. 1997. Thermic tolerance of the tropical fish *Cyprinodon dearborni* (Atheriniformes: Cyprinodontidae) under several heating and salinity rates. *Revista de Biología Tropical*, 45: 1541–1545.
- Clarke, A., & Gaston, K.J. 2006. Climate, energy and diversity. *Proceedings of the Royal Society B*, 273: 2257–2266.
- Clusella-Trullas, S., Blackburn, T.M. & Chown, S.L. 2011. Climatic predictors of temperature performance curve parameters in ectotherms imply complex responses to climate change. *American Naturalist*, 177: 738–751.
- Collins, J.P. & Crump, M.L. 2009. *Extinction in Our Times. Global Amphibian Decline*. Oxford University Press. Oxford.
- Compton, T.J., Rijkenberg, M.J.A., Drent, J. & Piersma, T. 2007. Thermal tolerance ranges and climate variability: a comparison between bivalves from differing climates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 352: 200–211.
- Cooper, N., Freckleton, R.P. & Jetz, W. 2011. Phylogenetic conservatism of environmental niches in mammals. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 2384–2391.
- Cowles, R.B. & Bogert, C.M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 83: 263–296.
- De Meester, L., van Doorslaer, W., Geerts, A., Orsini, L. & Stoks, R. 2011. Thermal genetic adaptation in the water flea *Daphnia* and its impact: an evolving metacommunity approach. *Integrative and Comparative Biology*, 51: 703–18.
- Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C. & Martin, P.R. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 105: 6668–6672.
- DeWitt, T.J., Sih, A. & Wilson, D.S. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 77–81.
- Diamond, S.E., Nichols, L.M., McCoy, N., Hirsch, C., Pelini, S.L., Sanders, N.J., Ellison, A.M., Gotelli, N.J. & Dunn, R.R. 2012a. A physiological trait-based approach to predicting the responses of species to experimental climate warming. *Ecology*, 93: 2305–2312.
- Diamond, S.E., Sorger, D.M., Hulcr, J., Pelini, S.L., del Toro, I., Hirsch, C., Oberg, E. & Dunn, R.R. 2012b. Who likes it hot? A global analysis of the climatic, ecological, and evolutionary determinants of warming tolerance in ants. *Global Change Biology*, 18: 448–456.
- Diffenbaugh, N.S. & Ashfaq, M. 2010. Intensification of hot extremes in the United States. *Geophysical Research Letters*, 37: L15701.
- Duarte, H., Tejado, M., Katzenberger, M., Marangoni, F., Baldo, D., Beltrán, J.F., Martí, D.A., Richter-Boix, A., Gonzalez-Voyer, A. 2012. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology*, 18: 412–421.
- Dunson, W.A. & Travis, J. 1991. The role of abiotic factors in community organization. *American Naturalist*, 138: 1067–1091.
- Durant, J.M., Hjermmann, D.Ø., Geir Ottersen, G. & Stenseth, N.C. 2007. Climate and the match or mismatch between predator requirements and resource availability. *Climate Research*, 33: 271–283.
- Ernst, E. & Rödel, M.O. 2005. Anthropogenically induced changes of predictability in tropical anuran assemblages. *Ecology*, 86: 3111–3118.
- Feder, M.E. 1999. Engineering candidate genes in studies of adaptation: the heat-shock protein HSP70 in *Drosophila melanogaster*. *American Naturalist* (Suppl.), 154: 55–66.
- Feder, M.E. & Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243–282.
- Funk, W.C., Greene, A.E., Corn, P.S. & Allendorf, F.W. 2004. High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. *Biology Letters*, 1: 13–16.
- Gaston, K.J. & Chown, S.L. 1999. Elevation and climatic tolerance: a test using dung beetles. *Oikos*, 86: 584–590.
- Gaston, K.J., Blackburn, T.M. & Spicer, J.I. 1998. Rapoport's rule: time for an epitaph? *Trends in Ecology & Evolution*, 13: 70–74.
- Gaston, K.J., Chown, S.L., Calosi, P., Bernardo, J., Bilton, D.T., Clarke, A., Clusella-Trullas, S., Ghalambor, C.K., Konarzewski, M., Peck, L.S., Porter, W.P., Portner, H.O., Rezende, E.L., Schulte, P.M., Spicer, J.I., Stillman, J.H., Terblanche, J.S. & van Kleunen, M. 2009. Macrophysiology: a conceptual reunification. *American Naturalist*, 174: 595–612.
- Ghalambor, C.K., Huey, R.B., Martin, P.R., Tewksbury, J.J. & Wang, G. 2006. Are mountain passes higher in the tropics? Janzen's hypothesis revisited. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 5–17.
- Gilman, S.E., Urban, M.C., Tewksbury, J., Gilchrist, G.W. & Holt, R.D. 2010. A framework for community interactions under climate change. *Trends in ecology and Evolution*, 25: 325–31.

- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183–190.
- Graham, C.H., Parra, J.L., Rahbek, C. & McGuire, J.A. 2009. Phylogenetic structure in tropical hummingbird communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 106: 19673–19678.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25: 1965–1978.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N. 2002. *Biochemical Adaptation*. Oxford University Press. Oxford.
- Hoffmann, A.A. & Sgro, C.M. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470: 479–485.
- Hoffmann, A.A., Dagher, H., Hercus, M. & Berrigan, D. 1997. Comparing different measures of heat resistance in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 43: 393–405.
- Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T.M., Butchart, S.H.M., Carpenter, K.E., Chanson, J., Collen, B., Cox, N.A. *et al.* 2010. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, 330: 1503–1509.
- Hua, X. & Wiens, J.J. 2010. Latitudinal variation in speciation mechanisms in frogs. *Evolution*, 64: 429–443.
- Huey, R.B., Bennett, A.F. 1987. Phylogenetic studies of coadaptation: preferred temperatures versus optimal performance temperatures of lizards. *Evolution*, 41: 1098–1115.
- Huey, R.B. & Kingsolver, J.G. 1993. Evolution of resistance to high-temperature in ectotherms. *American Naturalist*, 142: S21–S46.
- Huey, R.B., Hertz, P.E. & Sinervo, B. 2003. Behavioral drive versus behavioral inertia in evolution: a null model approach. *American Naturalist*, 161: 357–366.
- Huey, R.B., Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Vitt, L.J., Hertz, P.E. & Álvarez, H.J. 2009. Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 1939–1948.
- Huey, R.B., Kearney, M.R., Krockenberger, A., Holtum, J.A.M., Jess, M. & Williams, S.E. 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology, and adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367: 1665–1679.
- Hutchison, V.H. 1961. Critical thermal maximum in salamanders. *Physiological Zoology*, 43: 92–125.
- Hutchinson, G.E. 1981. *Introducción a la ecología de poblaciones*. Editorial Blume. Barcelona.
- Hutchison, V.H. & Dupré, R.K. 1992. Thermoregulation. 206–249. In: Feder, M.E. & Burggren, W.M. (eds.), *Environmental Physiology of the Amphibians*. The University of Chicago Press. Chicago.
- IPCC. 2007. Climate Change 2007. *The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York. New York.
- Janzen, D.H. 1967. Why mountain passes are higher in the tropics. *American Naturalist*, 101: 233–249.
- Kearney, M.R. & Porter, W. 2009. Mechanistic niche modeling: combining physiological and spatial data to predict species ranges. *Ecology Letters*, 12: 334–350.
- Kearney, M., Shine, R. & Porter, W.P. 2009. The potential for behavioural thermoregulation to buffer 'cold-blooded' animals against climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 106: 3835–3840.
- Kolbe, J.J., Kearney, M. & Shine, R. 2010. Modeling the consequences of thermal trait variation for the cane toad invasion of Australia. *Ecological Applications*, 20: 2273–2285.
- Kellermann, V., van Heerwaarden, B., Sgrò, C.M. & Hoffmann, A.A. 2009. Fundamental evolutionary limits in ecological traits drive *Drosophila* species distributions. *Science*, 325: 1244–1246.
- Kimura, M.T. 2004. Cold and heat tolerance of drosophilid flies with reference to their latitudinal distributions. *Oecologia*, 140: 442–449.
- Kozak, K.H. & Wiens, J.J. 2007. Climatic zonation drives latitudinal variation in speciation mechanisms. *Proceedings of the Royal Society B*, 274: 2995–3003.
- Leroi, A.M., Bennett, A.F. & Lenski, R.E. 1994. Temperature acclimation and competitive fitness: an experimental test of the beneficial acclimation assumption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 91: 1917–1921.
- Levins, R. 1968. *Evolution in Changing Environments*. Princeton: Princeton University Press. USA.
- Loeschcke, V. & Sørensen, J.G. 2005. Acclimation, heat shock and hardening — a response from evolutionary biology. *Journal of Thermal Biology*, 30: 255–257.
- Loeschcke, V. & Hoffmann, A.A. 2007. Consequences of heat hardening on a field fitness component in *Drosophila* depend on environmental temperature. *American Naturalist*, 169: 175–183.
- Lomolino, M.V., Riddle, B.R. & Brown, J.H. 2006. *Biogeography*. 3rd ed. Sinauer. Sunderland, MA.
- Lutterschmidt, W.I. & Hutchison, V.H. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75: 1561–1574.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M.S., Vinagre, C. 2012a. Thermal tolerance of the crab *Pachygrapsus marmoratus*: intraspecific differences at a physiological (CTMax) and molecular level (Hsp70). *Cell Stress and Chaperones*, en prensa: DOI 10.1007/s12192-012-0345-3
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N. & Vinagre, C. 2012b. Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. *Journal of Sea Research*, 73: 137–147.
- Mahoney, J.J. & Hutchison, V.H. 1969. Photoperiod acclimation and 24-h variations in the critical thermal maxima of a tropical and a temperate frog. *Oecologia*, 2: 143–161.
- Mann, M.E. & Jones, P.D. 2003. Global surface temperatures over the past two millennia. *Geophysical Research Letters*, 30: 1820–1823.

- Marais, E. & Chown, S.L. 2008. Beneficial acclimation and the Bogert effect. *Ecology Letters*, 11: 1027–1036.
- Meegaskumbura, M., Meegaskumbura, S., Gunatilleke, N., Manamendra-Arachchi, K., Bowatte, G., Gunathilaka, T. & Bandara, C. 2012. Conservation and biogeography of threatened Amphibians of Eastern Sinhara. *FrogLog*, 100: 12–14.
- Meehl, G.A., Stocker, T.F., Collins, W.D. *et al.* 2007. Global climate projections. 747–845. *In:* Solomon, S., Qin, D., Manning, M., *et al.* (eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Millien, V., Lyons, S.K., Olson, L., Smith, F.A., Wilson, A.B. & Yom-Tov, Y. 2006. Ecotypic variation in the context of global climate change: revisiting the rules. *Ecology Letters*, 9: 853–869.
- Mitchell, K. & Hoffmann, A.A. 2010. Thermal ramping rate influences evolutionary potential and species differences for upper thermal limits in *Drosophila*. *Functional Ecology*, 24: 694–700.
- Mora, C. & Maya, M.F. 2006. Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *Journal of Thermal Biology*, 31: 337–341.
- Moritz, C., Patton, J.L., Schneider, C.J. & Smith, T.B. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31: 533–563.
- Nguyen, K.D.T., Morley, S.A., Lai, C.-H., Clark, M.S., Tan, K.S., Bates, A.E. & Peck, L.S. 2011. Upper temperature limits of tropical marine ectotherms: global warming implications. *PLoS ONE*, 6: e29340.
- Nyamukondiwa, C. & Terblanche, J.S. 2010. Within-generation variation of critical thermal limits in adult Mediterranean and Natal fruit flies, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) and *Ceratitis rosa*, Karsch: thermal history affects short-term responses to temperature. *Physiological Entomology*, 35: 255–264.
- Overgaard, J., Kristensen, T.N., Mitchell, K.A. & Hoffmann, A.A. 2011. Thermal tolerance in widespread and tropical *Drosophila* species: Does phenotypic plasticity increase with latitude? *American Naturalist*, 178: S80–S96.
- Overgaard, J., Kristensen, T.N. & Sorensen, J.G. 2012. Validity of thermal ramping assays used to assess thermal tolerance in arthropods. *PLoS ONE*, 7: e32758.
- Pachauri, R.K. & Reisinger, A. 2007. *Contribution of working groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC. Geneva.
- Parmesan, C. 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37: 637–669.
- Pearman, P.B., Randin, C.F., Broennimann, O., Vittoz, P., van der Knaap, W.O., Engler, R., Le Lay, G., Zimmermann, N.E. & Guisan, A. 2008. Prediction of plant species distributions across six millennia. *Ecology Letters*, 11: 357–69.
- Peck, L.S., Clark, M.S., Morley, S.A., Massey, A. & Rossetti, H. 2009. Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. *Functional Ecology*, 23: 248–256.
- Peterson, A.T., Soberón, J., Pearson, R.G., Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E., Nakamura, M. & Araújo, M.B. 2011. *Ecological Niches and Geographic Distributions*. Princeton University Press. Princeton.
- Phillips, B.L., Brown, G.P., Webb, J.K. & Shine, R. 2006. Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature*, 439: 803.
- Pincebourde, S., Sandford, E. & Helmuth, B. 2008. Body temperature during low tide alters the feeding performance of a top intertidal predator. *Limnology and Oceanography*, 53: 1562–1573.
- Podrabsky, J.E. & Somero, G.N. 2004. Changes in gene expression associated with acclimation to constant and fluctuating daily temperatures in an annual killfish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology*, 207: 2237–2254.
- Pörtner, H.O. & Knust, R. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315: 95–97.
- Pounds, L.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A. *et al.* 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439: 161–167.
- Rapoport, E.H. 1975. *Areografía: Estrategias geográficas de las especies*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Rezende, E.L. & Santos, M. 2012. Comment on 'Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures'. *Journal of Experimental Biology*, 215: 702–703.
- Rezende, E.L., Tejedo, M. & Santos, M. 2011. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications. *Functional Ecology*, 25: 111–121.
- Ribeiro, P.L., Camacho, A. & Navas, C.A. 2012. Considerations for assessing maximum critical temperatures in small ectothermic animals: insights from leaf-cutting ants. *PLoS ONE*, 7: e32083.
- Rinehart, J.P., Yocum, G.D. & Denlinger, D.L. 2000. Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 515–521.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C. & Pounds, J.L. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421: 37–42.
- Sanford, E. 1999. Regulation of keystone predation by small changes in ocean temperature. *Science*, 283: 2095–2097.
- Santos, M., Castañeda, L.E. & Rezende, E.L. 2011. Making sense of heat tolerance estimates in ectotherms: lessons from *Drosophila*. *Functional Ecology*, 25: 1169–1180.
- Sanz, J.J., Potti, J., Moreno, J., Merino, S. & Frias, O. 2003. Climate change and fitness components of a migratory bird breeding in the Mediterranean region. *Global Change Biology*, 9: 461–472.
- Schär, C., Vidale, P.L., Lüthi, D., Frei, C., Häberli, C., Liniger, M.A. & Appenzeller, C. 2004. The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature*, 427: 332–336.
- Schwenk, K., Padilla, D.K., Bakken, G.S. & Full, R.J. 2009. Grand challenges in organismal biology. *Integrative and Comparative Biology*, 49: 7–14.

- Seebacher, F. & Franklin, C.E. 2012. Determining environmental causes of biological effects: the need for a mechanistic physiological dimension in conservation biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367: 1607–1614.
- Sgrò, C.M., Overgaard, J., Kristensen, T.N., Mitchell, K.A., Cockerell, F.E. & Hoffmann, A.A. 2010. A comprehensive assessment of geographic variation in heat tolerance and hardening capacity in populations of *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 2484–2493.
- Sherman, E. 1980. Ontogenetic change in thermal tolerance of the toad *Bufo woodhousei fowleri*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 65A: 227–230.
- Sillero, N., Márcia Barbosa, A., Martínez-Freiría, F. & Real, R. 2010. Los modelos de nicho ecológico en la herpetología ibérica: pasado, presente y futuro. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 21: 2–24.
- Sinclair, B.J. 2001. Field ecology of freeze tolerance: interannual variation in cooling rates, freeze-thaw and thermal stress in the microhabitat of the alpine cockroach *Celatoblatta quinque maculata*. *Oikos*, 93: 286–293.
- Sinervo, B., Méndez de la Cruz, F., Miles, D.B. et al. 2010. Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science*, 328: 894–899.
- Snyder, G.K. & Weathers, W.W. 1975. Temperature adaptations in amphibians. *American Naturalist*, 109: 93–101.
- Soberón, J. & Nakamura, M. 2009. Niches and distributional areas: concepts, methods and assumptions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 106(Suppl 2): 19644–19650.
- Stevens, G.C. 1989. The latitudinal gradient in geographic range: how so many species coexist in the tropics. *American Naturalist*, 133: 240–256.
- Stevens, G.C. 1992. The elevational gradient in altitudinal range: an extension of Rapoport's latitudinal rule to altitude. *American Naturalist*, 140: 893–911.
- Stillman, J.H. 2002. Causes and consequences of thermal tolerance limits in rocky intertidal porcelain crabs, genus *Petrolisthes*. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 790–96.
- Stillman, J.H. 2003. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science*, 301: 65.
- Stillman, J.H. & Somero, G.N. 2000. A comparative analysis of the upper thermal tolerance limits of eastern Pacific porcelain crabs, genus *Petrolisthes*: influences of latitude, vertical zonation, acclimation and phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73: 200–208.
- Sunday, J.M., Bates, A.E. & Dulvy, N.K. 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 1823–1830.
- Tejedo, M. & Reques, R. 1994. Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles. The effect of interaction between density and pond duration. *Oikos*, 71: 295–304.
- Terblanche, J.S., Deere, J.A., Clusella Trullas, S., Janion, C. & Chown, S.L. 2007. Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings of the Royal Society B*, 274: 2935–2942.
- Terblanche, J.S., Hoffmann, A.A., Mitchell, K.A., Rako, L., le Roux, P.C. & Chown, S.L. 2011. Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 214: 3613–3725.
- Thuiller, W., Albert, C., Araujo, M.B., Berry, P.M., Cabeza, M., Guisan, A., Hickler, T., Midgely, G.F., Paterson, J., Schurr, F.M., et al. 2008. Predicting global change impacts on plant species' distributions: future challenges. *Perspectives in Plant Ecology*, 9: 137–52.
- Tomanek, L. 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *Journal of Experimental Biology*, 213: 971–979.
- Tomanek, L. & Somero, G.N. 1999. Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *Journal of Experimental Biology*, 202: 2925–2936.
- van Berkum, F.H. 1988. Latitudinal patterns of the thermal sensitivity of sprint speed in lizards. *American Naturalist*, 132: 327–343.
- Vernberg, F.J. 1962. Comparative physiology: latitudinal effects on physiological properties of animal populations. *Annual Review of Physiology*, 24: 517–544.
- Watson, G.F., Davies, M. & Tyler, M.J. 1995. Observations on temporary waters in northwestern Australia. *Hydrobiologia*, 299: 53–73.
- Wiens, J.J. & Donoghue, M.J. 2004. Historical biogeography, ecology and species richness. *Trends in Ecology and Evolution*, 19: 639–644.
- Wiens, J.J. & Graham, C.H. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36: 519–539.
- Williams, S.E., Shoo, L.P., Isaac, J.L., Hoffmann, A.A. & Langham, G. 2008. Towards an integrated framework for assessing the vulnerability of species to climate change. *PLoS Biol*, 6: e325.
- Williams, W.D. 1985. Biotic adaptations in temporary lentic waters, with special reference to those in semi-arid and arid regions. *Hydrobiologia*, 125: 85–110.