

# Norma de reacció de la taxa metabòlica a la temperatura. Comparació intraespecífica i interespecífica en dos tritons del clade monofilètic *Calotriton*: *C. arnoldi* i *C. asper*

MARTÍ PIÑERO FERNÁNDEZ, JOAN GOMÀ MARTÍNEZ i JOAN LLUÍS PRETUS REAL

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals (BEECA). Departament de Biologia Vegetal, Animal i Ecologia (BABVE). Universitat de Barcelona

## Resum

L'adaptació metabòlica a la temperatura és un factor important en l'ajustament fisiològic animal que pot conduir a canvis evolutius. En aquest treball utilitzem dades metabòliques per estudiar diferències fisiològiques entre les dues espècies de tritó del gènere *Calotriton*, i analitzem l'efecte del sexe i la població. S'obtenen mostres de diferents localitzacions, totes pertanyen al mateix nínxol ecològic. Aplicant el mètode experimental del jardí comú, col·leccionem dades de respiració a diferents temperatures que aporten la informació per desenvolupar aquesta investigació. Arran d'aquest estudi, proporcionem evidències de les diferències significatives entre les espècies i alguns grups intraespecífics. Finalment, proposem una hipòtesi de treball basada en les limitacions geogràfiques que van obstaculitzar l'adaptació d'una de les dues espècies de tritó.

## Paraules clau

Norma de reacció, *Calotriton*, temperatura, adaptació metabòlica

## Resumen

**Norma de reacció de la tasa metabólica a la temperatura. Comparación intraespecífica y interespecífica en dos tritones del clade monofilético *Calotriton*: *C. arnoldi* y *C. asper***

La adaptació metabòlica a la temperatura es un factor importante en el ajuste fisiològic animal que puede conducir a cambios evolutivos. En este trabajo utilizamos datos metabólicos para estudiar diferencias fisiológicas entre dos especies de tritón del género *Calotriton*, y analizamos el efecto del sexo y su población. Se obtienen muestras de diferentes localizaciones, todas pertenecientes al mismo nicho ecológico. Aplicando el método experimental del jardín común, obtenemos datos de respiración a diferentes temperaturas que aportan la información para desarrollar esta investigación. A raíz de este estudio, proporcionamos evidencias de diferencias metabólicas entre las especies y algunos grupos intraespecíficos. Finalmente, proponemos una hipótesis de trabajo basada en las limitaciones geográficas que obstaculizaron la adaptación de una de las especies de tritón.

## Palabras clave

Norma de reacció, *Calotriton*, temperatura, adaptació metabòlica

## Abstract

**Norm of Metabolic Rate Response to Temperature. Intraspecific and Interspecific Comparison in Two Newts of the *Calotriton* Monophyletic Clade: *C. arnoldi* and *C. asper***

Metabolic adaptation to temperature is a key factor in animal physiological adjustment which can lead to evolutionary changes. In this paper we use metabolic data to study physiological differences between two newt species of the genus *Calotriton* and we analyse the effect of sex and population. We obtained samples from several locations, all within the same ecological niche. By applying the experimental common garden method, we derived respiration data at various temperatures which provided the information needed to undertake this research. This study enables us to furnish evidence of metabolic differences between species and some intraspecific groups. Finally, we propose a working hypothesis based on the geographical constraints which hindered the adaptation of one of the newt species.

## Key words

Norm of reaction, *Calotriton*, temperature, metabolic adaptation

## Introducció

El metabolisme és una propietat conservativa en el camp evolutiu que esdevé clau per al disseny biològic dels organismes vius. És, doncs, un tret fisiològic que connecta processos a escales diferents: individual, poblacional, comunitats i ecosistemes (BROWN, 2004).

### **Causes de variació intraespecífica de la taxa metabòlica**

Les diferències individuals del cost energètic d'automanteniment són el centre d'una àrea de recerca emergent. S'ha demostrat que diferents factors com el genotip, els efectes maternals, les condicions de desenvolupament inicials i les diferències de la personalitat contribueixen en la variació de la taxa metabòlica en repòs (TMR). La vinculació de la TMR amb l'aptitud s'ha observat a través de correlacions amb creixement i supervivència, i aquestes interaccions estan modulades per l'ambient (BURTON, 2011).

Les definicions de les diverses taxes varien lleugerament. La taxa metabòlica estàndard (TME) és la taxa més baixa, a una temperatura determinada, en un ectoterm inactiu i postabsortiu, que respon a la quantitat energètica requerida per mantenir els processos fonamentals del cos (NORIN; METCALFE, 2019; GUILLAUME, 2020). La taxa metabòlica basal (TMB) es mesura en endoterms, i inclou el cost de l'endotèrmia. La taxa metabòlica en repòs (TMR) també assumeix aquests paràmetres, i s'aplica tant a ectoterms com a endoterms, i estableix també nivells baixos d'activitat espontània. Atès que les tres taxes representen el nivell mínim de metabolisme en estat d'inactivitat es poden agrupar totes sota el terme TMR (HOSKEN, 2003), cal remarcar que al llarg d'aquest treball s'utilitza aquesta taxa per a animals ectoterms en repòs.

### **La TMR afecta l'aptitud?**

És difícil predir la relació entre TMR i aptitud, ja que es poden presentar, tant arguments a favor, com la hipòtesi de la compensació, o en contra, pel que fa a la hipòtesi de la ingesta (CHAPPEL, 2007; BIRO i STAMPS, 2010). Tot i que també s'assumeix la relació del metabolisme amb la producció de radicals lliures, cal remarcar que és molt simplista, ja que més TMR no implica més espècies reactives de l'oxigen (ROS) o una esperança de vida menor, és a dir, una reducció de la vida útil (BRAND, 2000).

S'ha de tenir en compte que els experiments de selecció requereixen temps i només es poden dur a terme en condicions controlades on no hi hagi altres forces selectives. En aquestes circumstàncies, es podria predir que la TMR seria més variable en aquells organismes provinents d'entorns més estocàstics.

S'ha destacat, doncs, el valor dels estudis longitudinals en què es mesura repetidament la TMR i els caràcters relacionats, ja que poden revelar informació que

no s'observi a curt termini sobre la força i direcció de la selecció sobre la TMR. Alguns autors suggereixen la importància d'aquest tipus d'estudi per revelar correlacions (BURTON, 2011).

### **Common Garden Experiments**

Un tipus de disseny experimental longitudinal és l'anomenat *Common Garden Experiment*. Aquest mètode implica la comparació d'haplotips, famílies o poblacions diferents en condicions ambientals idèntiques, protocols utilitzats sovint per desarticlar els efectes de la variació ambiental sobre el fenotip i destacar-ne només la variabilitat genètica (LJUNGFELDT, 2014).

De fet, descobrir l'evidència de l'adaptació genètica gairebé sempre es veu obstaculitzada pels efectes de fenòmens evolutius com la deriva genètica, la plasticitat fenotípica, la complexa història demogràfica i la complexa arquitectura genètica. En el cas particular de l'adaptació local, els biòlegs evolutius han desenvolupat eines eficients per superar aquests reptes i el Common Garden Experiment o jardí comú n'és una (DE VILLEMEREUIL, 2016).

Com que permet revelar la base genètica dels fenotips complexos a través de diverses poblacions sense els efectes de confusió de l'entorn corresponent, l'experiment del jardí comú s'utilitza per provar el senyal d'adaptació local en trets d'interès com els de la «Life History», la fenologia i les relacions al·lomètriques.

Els experiments de jardí comú també es poden utilitzar per estudiar les interaccions genotip-ambient mitjançant l'aplicació del mateix disseny en diferents entorns. Tot i que fer la rèplica d'aquests experiments és logísticament difícil, els resultats són altament gratificants, ja que els efectes de la interacció del genotip per l'ambient són probablement freqüents i molt importants en la naturalesa (DE VILLEMEREUIL, 2016).

### **Plasticitat fenotípica, adaptació i normes de reacció**

La plasticitat fenotípica, definida com un canvi en el fenotip d'un individu en resposta a un canvi de l'ambient, és una font de variabilitat en les poblacions naturals (MARTIN, 2011). És el fenomen pel qual un genotip produeix diferents fenotips en resposta a diferents condicions ambientals i és un aspecte omnipresent en els organismes. Aquesta propietat d'un genotip pot ser adaptativa, maladaptativa o neutra pel que fa a l'aptitud d'un individu (GHALAMBOR, 2007). La forma particular en què el fenotip d'un individu (o genotip) varia a través dels entorns s'acostuma a conceptualitzar i mesurar mitjançant unes normes de reacció: funcions que relacionen fenotips individuals amb variables ambientals (GHALAMBOR, 2007; MARTIN, 2011). Les normes de reacció pels trets de distribució contínua, com trets fisiològics, morfològics i de la Life History, se solen visualitzar amb una línia o corba en un gràfic del valor ambiental respecte del valor fenotípic (GHALAMBOR, 2007).

Quan s'estudien els trets plàstics de les poblacions naturals, la importància rau en si trobem o no variació fenotípica i, si fos així, quins són els factors ambientals o els gens que provoquen aquest canvi, per això es referencien les respostes fenotípiques amb les variables ambientals (MARTIN, 2011).

## **Relació entre TM i temperatura**

L'evolució de la taxa metabòlica (TM) és de vital importància per a l'ecologia i la fisiologia (BROWN *et al.*, 2004). S'ha determinat que hi ha diversos factors que afecten la TM, dels quals els més acceptats són la mida, l'activitat i la temperatura ambient (TERBLANCHE, 2009).

Es creu que la TM varia adaptativament de dues maneres possibles. En primer lloc, la reducció de la taxa metabòlica pot evolucionar com a resposta a ambients xèrics i funciona com un mecanisme de conservació de l'aigua a través de la reducció de la pèrdua d'aigua per respiració. En segon lloc, les poblacions de clima fred (de gran latitud o gran altitud) poden mostrar taxes metabòliques elevades en relació amb les poblacions de clima més càlid quan es proven temperatures semblants, cosa que es coneix com a *compensació de temperatura* o *adaptació metabòlica al fred (MCA)*. D'aquesta manera, la MCA prediu que les poblacions d'ambients més freds tindran una TM superior a una temperatura comuna, o relacions MR-T més pronunciades, i indiquen més sensibilitat del metabolisme respiratori a la temperatura.

La dependència de la taxa metabòlica envers la temperatura (o normes de reacció MR-T) també respon a altres fonts de variació ambiental, i la resposta del metabolisme a la temperatura pot diferir entre poblacions i espècies. En el camp intraespecífic, hi pot haver una forta evidència de MCA si es pot trobar variació entre poblacions al llarg d'una clina de temperatura, i si la genètica de la població dona suport a la hipòtesi de l'adaptació local de les relacions MR-T.

En conseqüència, i atès que els estudis de MCA poden proporcionar informació de la vida (per exemple, entre la mida del cos i la taxa de creixement), hi ha molt interès en explorar la variació de la taxa metabòlica intraespecífica, en particular en les relacions MR-T, és a dir, les normes de reacció a la temperatura (TERBLANCHE, 2009).

## **Objectius**

El treball té com a fita principal l'elaboració d'una anàlisi exploratòria de la taxa metabòlica en repòs (TMR) de les dues espècies de tritó, *Calotriton arnoldi* i *Calotriton asper*, a través de la norma de reacció a la temperatura. La tria d'aquestes dues espècies radica en conèixer la biologia d'espècies endèmiques, la seva proximitat filogenètica i la facilitat d'accés a aquesta fauna, a més de l'interès per aug-

mentar el coneixement de la biologia d'espècies en perill d'extinció –cas de *Calotriton arnoldi*– amb l'objectiu de desenvolupar projectes de conservació enfront dels futurs escenaris de canvi climàtic i destrucció possible de l'hàbitat.

Per intentar respondre aquest objectiu, centrem la nostra anàlisi només en un paràmetre ambiental, la temperatura. La selecció d'aquesta variable s'explica per les diferents posicions geogràfiques de cada espècie, i és més meridional la distribució de *Calotriton arnoldi*, que suggereix un règim tèrmic diferent al pirinenc, espai de les poblacions de *Calotriton asper*.

Per acotar el marc de l'objectiu general, establim tres objectius específics que venen determinats per la comparativa de grups i ens permeten identificar atributs més concrets que potencialment generin variància.

En primer lloc, evidenciem l'existència de diferències en la TMR entre les dues espècies de tritó (objectiu 1). En segon lloc, posem de manifest les diferències possibles en la TMR entre poblacions, tan interespecíficament com intraespecíficament (objectiu 2). Finalment, pretenem determinar si el sexe esdevé un factor diferencial en la variància de TMR (objectiu 3).

## Materials i mètodes

### Organismes

De l'espècie *Calotriton arnoldi*, es van seleccionar 10 individus juvenils, 10 mascles adults i 10 femelles adultes de cadascuna de les dues poblacions, haplotips oriental i occidental (60 individus en total).

De l'espècie *Calotriton asper*, es van mostrejar 10 mascles adults i 10 femelles de cadascuna de les poblacions obtingudes, poblacions de Coll de Pal a Bagà (a uns 1.250 metres d'altitud) i la Garrotxa (a altituds entre 350 i 550 metres), 40 individus en total. La manca de mostres d'individus juvenils de l'espècie pirinenca es deu a la gran dificultat a l'hora de trobar organismes d'aquesta edat i mida en la natura.

La tria de poblacions d'aquesta espècie s'ha fet considerant la màxima diferència possible en les condicions tèrmiques de l'espai que ocupen, i s'ha capturat una població d'altitud a Coll de Pal i una de baixa altitud a la Garrotxa.

### Disseny d'obtenció de dades

Es va estimar la taxa metabòlica en repòs (TMR) de cada animal a partir del consum d'oxigen durant 15 minuts en pots Winkler de 115 ml tancats amb tap esmerilat. Tots els pots es mantenien submergits parcialment en un bany maria per minimitzar l'oscil·lació de la temperatura de l'aigua.

La TMR es mesurava en un gradient de temperatura entre 7 °C i 17 °C amb un interval de 2 °C, amb una setmana d'aclimatació (com a mínim). Per a cada circuit d'aigua diferent es va prendre una mesura control de variació de concentració d'oxigen a l'aigua: 5 pots Winkler només amb aigua. Per calcular la taxa metabòlica dels tritons, el consum d'oxigen de les mostres control se sostreïa al consum dels animals.

Les mesures d'oxigen i temperatura es van prendre amb un oxímetre model Hach HQd Multi. També es van prendre dades de pes i volum de cada individu, per a cada presa de dades.

### **Restriccions de les dades**

Per obtenir les dades es van establir una sèrie de restriccions prèvies al mostreig, així com estratègies per reduir l'estrès dels animals durant el procés.

Tenint en compte que les dades que s'han de capturar són metabòliques i la dieta influeix en la taxa metabòlica instantània, per reduir l'esforç metabòlic i l'excés de respiració possible dels exemplars es mantenia un interval mínim de 48 h sense alimentar-los abans d'obtenir les dades respiratòries, i se'ls proporcionava menjar un cop practicat el mostreig. D'aquesta manera es reduïa la possibilitat que el metabolisme de l'aliment pogués condicionar el consum mesurat.

Prèviament a les mesures de consum, es duïa a terme una anàlisi química de l'aigua amb la mesura dels nivells de  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NO}_2^-$ . Si els nivells de  $\text{NO}_2^-$  eren superiors a 0,1 mg/l i/o els de  $\text{NH}_4^+$  superaven 0 mg/l, no es prenen les mesures. Aquests límits s'estableixen a causa de la toxicitat provocada per aquestes substàncies, cosa que comporta complicacions metabòliques com la metahemoglobinèmia, patologia que generaria un gran biaix en les dades de respiració (MARCO, 2002). Tot i que els límits recomanats siguin superiors (WRIGHT *et al.*, 2001), es van determinar d'aquesta manera per assegurar que no poguessin desviar les dades.

Finalment, amb la finalitat de reduir l'estrès dels animals durant el procés de mostreig, els pots Winkler on restaven els exemplars durant el procés de mesura es van embolicar amb cinta aïllant per reduir-ne l'estímul visual i lumínic. També es van apagar dos dels tres llums de la cambra de control de temperatura, cosa que en va fer reduir encara més la llum.

### **Anàlisi estadística**

Com explica la teoria metabòlica de l'ecologia (BROWN, 2004), la relació de la TMR amb el pes i la temperatura és al·lomètrica. Per tal de facilitar l'anàlisi i visualització de les normes de reacció, transformem les relacions al·lomètriques en lineals (SIBLY *et al.*, 2012):

$$TMR = \alpha \times M^{3/4} \times e^{-\frac{E_a}{K_b \times T_{abs}}}$$

$$\ln TMR = \frac{\alpha' \times 3 \times \log(pes)}{4} - \frac{E_a}{K_b \times T_{abs}} = -\frac{3 \times \alpha' \times \log(pes)}{4} - \frac{C}{Temp}$$

$$\ln(TMR) + \ln(e^{\frac{C}{Temp}}) = -\frac{3 \times \alpha' \times \log(pes)}{4}$$

$$TMR \times e^{Arr} = -\frac{3 \times \alpha' \times \log(pes)}{4}$$

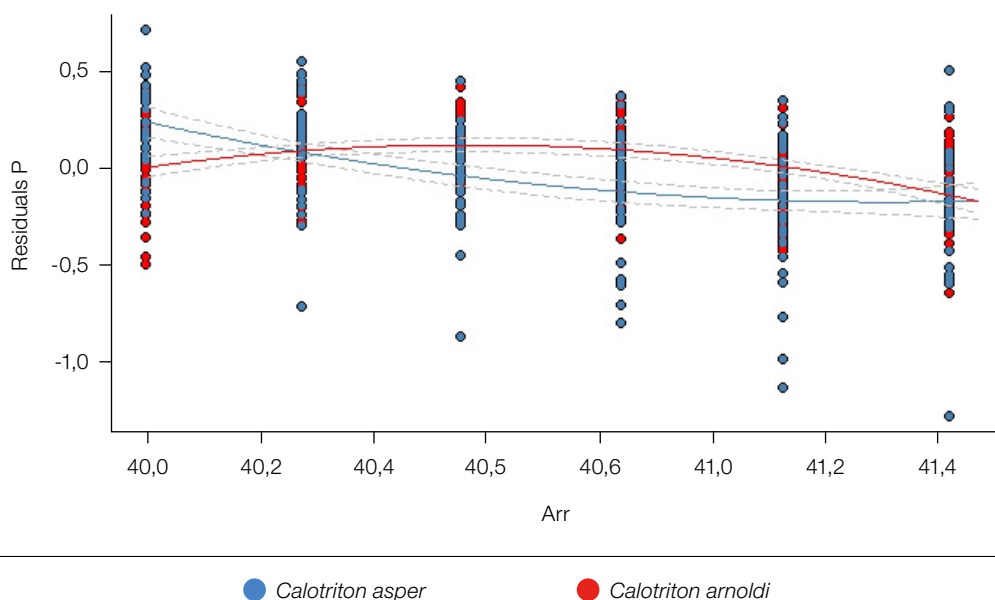
TMR: Taxa metabòlica en repòs (W);  $\alpha$ : Constant metabòlica independent de T i la massa (W/Kg); M: Massa (kg);  $E_a$ : Energia d'activació (J);  $K_b$ : Constant de Boltzmann  $\approx 1.38 \times 10^{-23}$ (J/K);  $T_{abs}$ : Temperatura absoluta (K)

A l'hora de determinar l'ús de models per test LME (*Linear Mixed-Effects Models*) per mesures repetides sobre la diferència dels *intercepts* (valors de les ordenades a l'origen) de cada cas, es van determinar un model additiu i un de multiplicatiu, o bé polinòmic, per a cada grup, i es va triar l'ús de l'un o l'altre a partir del resultat d'un test AIC (*Akaike Information Criterion*).

## Resultats

Objectiu 1: Comparació entre adults de les dues espècies del gènere *Calotriton*

**Gràfic 1. Comparació interespecífica de les normes de reacció de *Calotriton asper* (blau) i *Calotriton arnoldi* (vermell) que mostren diferències significatives**

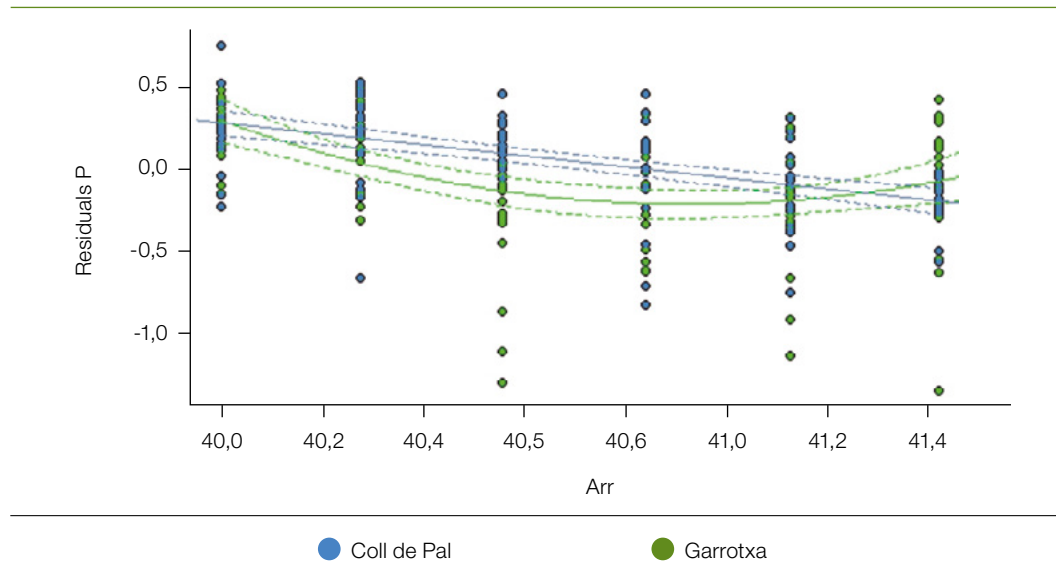


A través de l'anàlisi comparativa dels models quadràtics per a les dades estandaritzades de cada espècie, observem diferències significatives, i podem afirmar que presenten taxes metabòliques diferents per a condicions iguals.

Apreciem una TM generalment superior per a *Calotriton arnoldi* que per a *Calotriton asper*, espècie amb més dispersió i heterogeneïtat d'ambients.

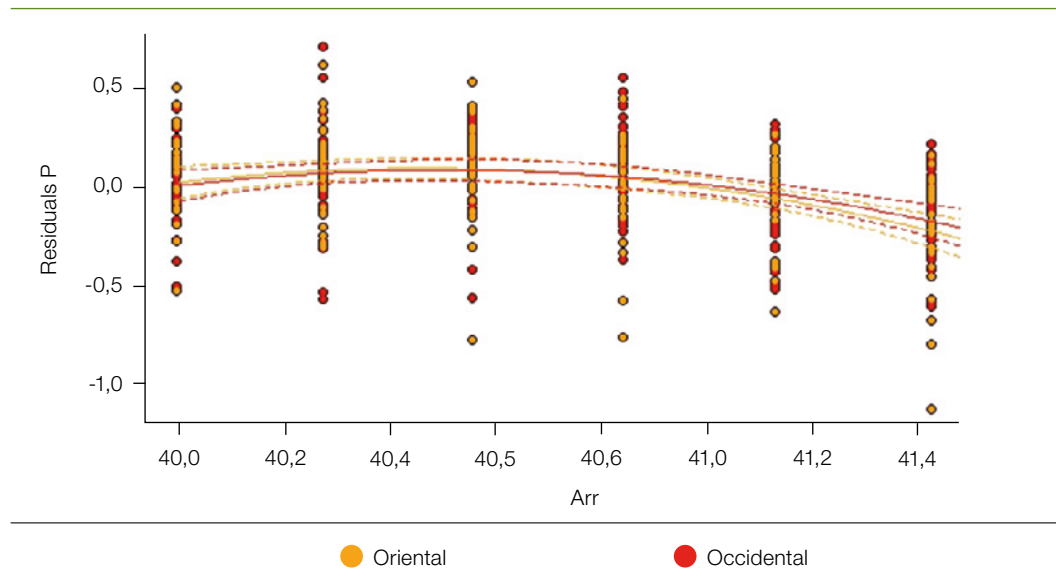
Objectiu 2: Comparació entre haplotips intraespecífics de cada espècie

**Gràfic 2. Comparació intraespecífica de les normes de reacció de les dues poblacions *Calotriton asper*, Coll de Pal (blau) i Garrotxa (verd), presenten diferències marginalment significatives**



Hi ha diferències significatives entre les dues poblacions de *Calotriton asper*. La població de més altitud de Coll de Pal sembla que té un metabolisme més gran que la de menys altitud de la Garrotxa.

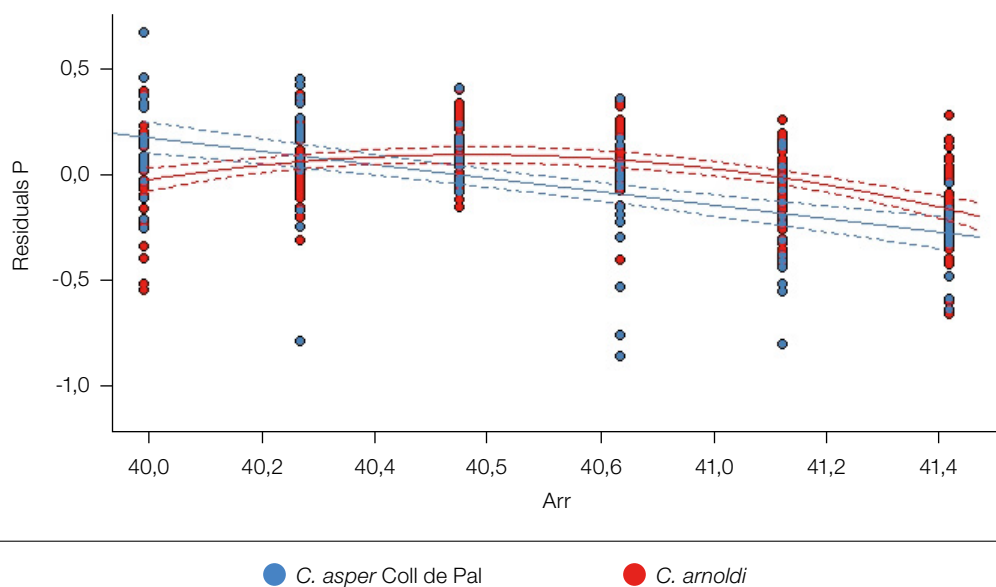
**Gràfic 3. Comparació intraespecífica de les normes de reacció de les dues poblacions de *Calotriton arnoldi*, oriental (groc) i occidental (vermell), on no s'aprecien diferències significatives**



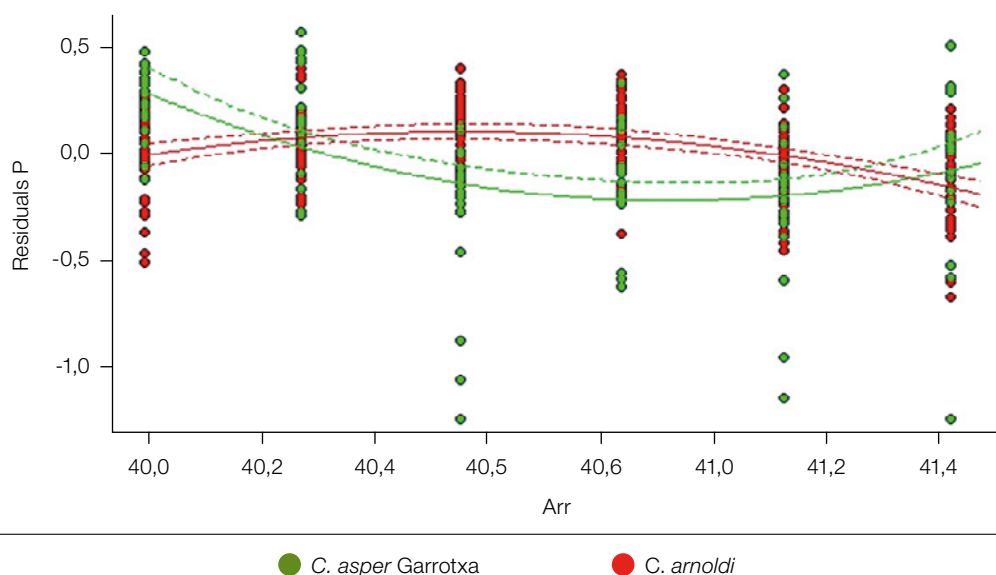


Apreciant que no hi ha diferències significatives entre les dues poblacions genètiques de *Calotriton arnoldi*, les tractarem pel que fa a l'espècie a l'hora de comparar-la amb els altres dos grups poblacionals.

**Gràfic 4. Comparació interespecífica de les normes de reacció de l'espècie *Calotriton arnoldi* (vermell) amb la població de Coll de Pal de *Calotriton asper* (blau)**



**Gràfic 5. Comparació interespecífica de les normes de reacció de l'espècie *Calotriton arnoldi* (vermell) amb la població de la Garrotxa de *Calotriton asper* (verd)**



Hi ha diferències significatives entre el conjunt de *Calotriton arnoldi* i cadascun dels *Calotriton asper* per separat, amb més diferència amb el tritó de la Garrotxa que amb el de Coll de Pal.

Analitzats i comparats els diferents models, podem dir que l'estudi de la norma de reacció entre les dues espècies mostra diferències significatives de la TMR pel que fa als canvis de temperatura en l'ambient, i presenta més respiració el *Calotriton arnoldi*.

Objectiu 3: Efecte del sexe sobre la taxa metabòlica

**Taula 1. Valors de significació estadística del model per l'efecte del sexe**

Model	Residuals ~ Espècie + Sexe	p-value
	Espècie	0,0220
	Sexe	0,7289

Per a  $\alpha = 0,05$ , efecte significatiu quan p-valor  $\leq \alpha$ .

Per als dos models, tant el que utilitza les dades primàries com el que fa ús dels residus, l'efecte del sexe no resultava significatiu. Així doncs, podríem afirmar que el sexe dels individus no sembla que influènciï la diferència de TMR en cap de les dues espècies d'urodels del gènere *Calotriton*.

## Discussió

Malgrat les moltes semblances biològiques, no hi ha proves de flux genètic entre aquestes dues espècies. Això és especialment rellevant tenint en compte la curta distància geogràfica entre les poblacions més pròximes de cada espècie (menys de 25 km), la similitud general de l'hàbitat i les seves condicions climàtiques, i el mateix comportament d'aparellament, basat en atrapar les femelles amb la cua (amplexus). Aquesta diferenciació suggereix que les espècies de *Calotriton* no han estat en contacte durant molt de temps (des del moment de l'especiació, que va passar durant el Plistocè) al voltant d'1,1-2 Ma. Aquestes espècies germanes es van originar de manera al·lopàtrica durant les glaciacions agudes del Plistocè, i van trobar refugis a la cadena pirinenca o al massís del Montseny, cada taxó en un espai diferent (VALBUENA, 2013). A més, estudis recents suggereixen que *Calotriton asper* probablement va recolonitzar els Pirineus des de diferents refugis glacials (LUCATI, 2020; GUILLAUME, 2020).

Tot i que mostra una distribució un miler de vegades menor que *Calotriton asper*, el tritó del Montseny presenta un nivell semblant de variabilitat en el mtDNA i un nivell superior de variabilitat en el nDNA. Una de les possibles explicacions d'aquestes diferències genètiques entre les dues espècies és que *Calotriton asper* té més capacitat dispersiva. Els juvenils de l'espècie pirinenca presenten un fase juvenil terrestre de fins a dos anys. Durant aquest període es poden moure

fora del torrent d'origen i augmenten el flux genètic entre poblacions i homogeneïtzen les característiques genètiques. Al contrari que *Calotriton asper*, el tritó del Montseny és estrictament aquàtic durant tot el cicle vital, i en limita la dispersió (VALBUENA, 2013). A més, la variabilitat genètica baixa de *Calotriton asper* es pot explicar, climàticament, per la idoneïtat superior durant l'últim màxim glacial que va permetre la connexió de poblacions i homogeneïtzació genètica, a més de la recolonització posterior.

Aquesta característica diferencial pot contribuir a entendre per què un taxó pot estar més adaptat que l'altre a una temperatura més alta. L'homogeneïtzació genètica a causa de la capacitat de dispersió en la fase juvenil del tritó pirinenc pot haver promogut l'adaptació a la temperatura gràcies al flux genètic entre diferents poblacions d'aquesta espècie.

Pel que fa a l'estudi intraespecífic de l'espècie pirinenca, la població de Coll de Pal (de més altitud) sembla tenir, tot i que marginalment, valors significativament diferents respecte de la població de la Garrotxa (d'altitud baixa), i presenta un metabolisme superior la població de Coll de Pal. Aquest fet pot ser esperable per afinitat amb els resultats dels experiments de jardí comú en què les poblacions de llocs més freds creixen més ràpid per a una mateixa temperatura. Atès que estan adaptades a temperatures fredes: aquestes poblacions compensen la temperatura baixa amb una resposta fisiològica superior.

Comparant les normes de reacció de l'espècie del Montseny, s'observa clarament que no es diferencien la resposta metabòlica davant la variació de la temperatura. Aquest fet genera una mica de contrarietat ja que, genèticament, són dues poblacions ben definides (CARRANZA; AMAT, 2005; VALBUENA, 2013) i això pot suggerir una possible diferència adaptativa.

Com hem observat a través de les dades obtingudes en l'estudi intraespecífic de cada espècie, i comparant també pel que fa a la població de manera interespecífica, la diferència de l'espècie del Montseny amb la població de més altitud del tritó pirinenc (Coll de Pal) és menor que amb la d'altitud baixa (Garrotxa). Això ens porta al plantejament adaptatiu per a la temperatura. A través dels nostres resultats, es pot pensar que la població d'alçada de *Calotriton asper* ha requerit menys adaptació a altes temperatures que en poblacions d'ambients més càlids, perquè està exposada a un règim tèrmic relativament més fred que la població d'altitud baixa.

La semblança fenotípica més gran, per a la TMR segons la temperatura, de la població de Coll de Pal amb *Calotriton arnoldi*, i les diferències amb la població de la Garrotxa, es pot entendre tenint en compte que els espais ocupats al llarg de la història evolutiva del gènere *Calotriton* van generar oportunitats per a l'ajustament fisiològic. Aquest conjunt d'esdeveniments ens porta a una nova hipòtesi: la maladaptació aparent de l'espècie *Calotriton arnoldi*, observada en les diferències de taxa metabòlica de l'estudi, podria ser conseqüència de la limitació poblacional a l'hora de reconquerir espais en l'època postglacial. En canvi, *Calotriton*

*asper* va desenvolupar amb èxit la reocupació d'espais tenint en compte que ho va fer des de punts geogràfics més diversos que *Calotriton arnoldi*, espècie confinada en una àrea molt petita.

Pel que fa a l'aspecte més global, del que ens informen els resultats obtinguts és que hem de plantejar la futura gestió ambiental de la fauna amfíbia estudiada. Els futurs esdeveniments causats pel canvi climàtic, i sobretot pel que fa a l'augment de la temperatura, generaran un ambient deteriorat, en l'hàbitat, i amb unes condicions tèrmiques que només podran resistir aquells organismes adaptats a aigües calentes. És per això que, partint dels nostres resultats, podem plantejar la hipòtesi de més dificultat de supervivència de l'espècie del Montseny i les poblacions de més altitud de *Calotriton asper*. Aquest fet fa que ens haguem d'enfocar en la mitigació d'aquests canvis per a la conservació d'espècies autòctones i amb funció ecològica important dels nostres ecosistemes.

Així doncs, el treball futur hauria d'estar dirigit a provar aquesta hipòtesi basada en les dades d'aquest estudi, ja que és una via d'investigació continuada al voltant de l'ecologia evolutiva dels taxons estudiats. Talment, futurs experiments haurien d'anar més enllà de les limitacions metodològiques i logístiques d'aquest estudi, dissenys que permetran afinar en aspectes més determinants de la genètica i la fiabilitat de les dades.

## Bibliografia

- BIRO, P. A.; STAMPS, J. A. (2010): «Do consistent individual differences in metabolic rate promote consistent individual differences in behavior?». *Trends Ecol. Evol.*, núm. 25; p. 653-659.
- BOSCH, J.; GABOR, C. R.; DAVIS, D. R.; FRIES, J. N. (2013): «A non-invasive waterborne hormone assay for amphibians». *Amphibia Reptilia*, núm. 34(2); p. 151-162.
- BRAND, M. D. (2000): «Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing». *Exp. Gerontol.*, núm. 35; p. 811-820.
- BROWN, J. H.; GILLOOLY, J. F.; ALLEN, A. P.; SAVAGE, V. M.; WEST, G. B. (2004): «Toward a metabolic theory of ecology». *Ecology*, núm. 85(7); p. 1771-1789.
- BURTON, T.; KILLEN, S. S.; ARMSTRONG, J. D.; METCALFE, N. B. (2011): «What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences?». *Proc. R. Soc. B.*, núm. 278; p. 3465-3473.
- CARRANZA, S.; AMAT, F. (2005): «Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae)». *Zoological Journal of the Linnean Society*, núm. 145(4); p. 555-582.
- CHAPPELL, M. A.; GARLAND, T.; ROBERTSON, G. F.; SALTZMAN, W. (2007): «Relationships among running performance, aerobic physiology and organ mass in male Mongolian gerbils». *J. Exp. Biol.*, núm. 210; p. 4179-4197.

- DE VILLEMEREUIL, P., GAGGIOTTI, O. E.; MOUTERDE, M.; TILL-BOTTRAUD, I. (2016): «Common garden experiments in the genomic era: New perspectives and opportunities». *Heredity*, núm. 116(3); p. 249-254.
- GABOR, C. R.; FISHER, M. C.; BOSCH, J. (2013): «A Non-Invasive Stress Assay Shows That Tadpole Populations Infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* Have Elevated Corticosterone Levels». *PLoS ONE*, núm. 8(2); p. 1-5.
- GHALAMBOR, C. K.; MCKAY, J. K.; CARROLL, S. P.; REZNICK, D. N. (2007): «Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments». *Functional Ecology*, núm. 21(3); p. 394-407.
- GUILLAUME, O.; DELUEN, M.; RAFFARD, A.; CALVEZ, O.; TROCHET, A. (2020): «Reduction in the metabolic levels due to phenotypic plasticity in the Pyrenean newt, *Calotriton asper*, during cave colonization». *Ecology and Evolution*, núm. 10(23); p. 12983-12989.
- HOSKEN, D. J. (2003): *The Physiological Ecology of Vertebrates: A View from Energetics*. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. 576 p.
- LJUNGFELDT, L. E. R.; ESPEDAL, P. G.; NILSEN, F.; SKERN-MAURITZEN, M.; GLOVER, K. A. (2014): «A common-garden experiment to quantify evolutionary processes in copepods: The case of emamectin benzoate resistance in the parasitic sea louse *Lepeophtheirus salmonis*». *BMC Evolutionary Biology*, núm. 14(1).
- LUCATI, F.; POIGNET, M.; MIRÓ, A. *et al.* (2020): «Multiple glacial refugia and contemporary dispersal shape the genetic structure of an endemic amphibian from the Pyrenees». *Molecular Ecology*, núm. 29(15), p. 2904-2921.
- MARCO, A. (2002): «Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios». *Revista Española de Herpetología*, núm. 16(5), p. 17.
- MARTIN, J. G. A.; NUSSEY, D. H.; WILSON, A. J.; RÉALE, D. (2011): «Measuring individual differences in reaction norms in field and experimental studies: A power analysis of random regression models». *Methods in Ecology and Evolution*, núm. 2(4); p. 362-374.
- NORIN, T.; METCALFE, N. B. (2019): «Ecological and evolutionary consequences of metabolic rate plasticity in response to environmental change». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, núm. 374(1768).
- PARSONS P. A. (1990): «The metabolic cost of multiple environmental stresses». *Trends Ecol Evol.*, núm. 5(9); p. 315-317.
- PIGLIUCCI, M. (2001): *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. JHU Press. 328 p.
- TERBLANCHE, J. S.; CLUSELLA-TRULLAS, S.; DEERE, J. A.; VUUREN, B. J. VAN; CHOWN, S. L. (2009): «Directional Evolution of the Slope of the Metabolic Rate - Temperature Relationship Is Correlated with Climate». *Physiological and Biochemical Zoology*, núm. 82(5); p. 495-503.

VALBUENA-UREÑA, E.; AMAT, F.; CARRANZA, S. (2013): «Integrative Phylogeography of *Calotriton* Newts (Amphibia, Salamandridae), with Special Remarks on the Conservation of the Endangered Montseny Brook Newt (*Calotriton arnoldi*)». *PLoS ONE*, núm. 8(6).