



Tolerancia térmica y capacidad de aclimatación de *Enochrus politus*

Autor: María Botella Cruz

Institución: Universidad de Murcia

Otros autores: Andrés Millán Sánchez (Universidad de Murcia); Josefa Velasco García (Universidad de Murcia)

1. Resumen

En el escenario actual de cambio climático es importante conocer la capacidad de respuesta de los organismos, especialmente para aquellas especies de distribución restringida así como para las que habitan ambientes extremos. Las especies de coleópteros acuáticos de aguas salinas continentales se encuentran entre los organismos que pueden experimentar condiciones ambientales extremas, que pueden llegar a ser más extremas debido principalmente a los incrementos de temperatura y salinidad en sus hábitats como consecuencia del cambio climático. En este trabajo se analizó la tolerancia térmica y la capacidad de aclimatación a la temperatura y a la salinidad de una especie de coleóptero acuático, *Enochrus politus*, común en ríos salinos del sureste de la Península Ibérica, con el objetivo de estudiar su sensibilidad a cambios en las condiciones ambientales. Para ello se determinaron los límites térmicos de la especie en condiciones de laboratorio mediante un método dinámico y termografía, previa aclimatación a diferentes condiciones de temperatura y salinidad. Como límite térmico inferior se determinó el Supercooling, o temperatura previa a la congelación, y como límite térmico superior se consideró el Heat coma, o punto de parálisis anterior a la muerte. El efecto de la temperatura y salinidad de aclimatación, además del sexo, y sus interacciones sobre los límites térmicos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. Los resultados mostraron que *E. politus* tiene un amplio rango de tolerancia térmica ($-10,38 \pm 0,32$ y $57,37 \pm 0,19$), siendo mayor en condiciones óptimas de temperatura (20°C) y 12g/l de salinidad, en coincidencia con los hábitats donde frecuentemente vive la especie. Además, la especie posee cierta capacidad de aclimatación, respondiendo el límite térmico inferior a las condiciones de temperatura y salinidad mientras que el superior solo respondió a la salinidad. Por tanto, esta especie tiene la capacidad de tolerar el aumento de temperatura como consecuencia del cambio climático, aunque el aumento de salinidad puede reducir su tolerancia térmica al calor.

Palabras clave: Medios acuáticos salinos; coleóptero; límites térmicos; plasticidad fenotípica; Supercooling; Heat coma; aclimatación.

2. INTRODUCCIÓN

En la cuenca mediterránea hay gran cantidad de ecosistemas acuáticos salinos que resultan singulares por las condiciones ambientales extremas y la biota que albergan. A pesar de que estos ecosistemas son raros en Europa, son comunes en el sureste de España y presentan especies con adaptaciones fisiológicas para vivir en medios hiperosmóticos y con grandes variaciones ambientales (diarias, estacionales e interanuales). En estos ambientes, la combinación de altos niveles de salinidad y temperatura es frecuente. Estas condiciones tan extremas constituyen una barrera infranqueable para la mayoría de especies acuáticas, aunque entre los insectos, existen algunos órdenes (Dípteros, Coleópteros y Hemípteros principalmente) con un importante número de especies adaptadas a vivir en estos medios (Millán et al. 2011). En general, dichas especies salinas presentan un alto grado de endemidad y diversidad filogenética (Arribas et al. 2013).

A pesar de su elevado interés de conservación, los ecosistemas continentales de aguas salinas están globalmente amenazados. Actualmente, en muchas regiones mediterráneas sometidas a elevadas presiones agrícolas, se están produciendo cambios en la hidrología natural y en los niveles de salinidad que afectan de manera especial a su biota especialista, conllevando una pérdida de la biodiversidad global a escala regional (Velasco et al. 2006). A estos cambios hay que añadir los derivados del cambio climático. Así, todos los modelos predictivos elaborados hasta la fecha prevén que en las regiones mediterráneas se produzca un aumento de temperatura y una disminución de las precipitaciones lo que supondría un incremento en los niveles de salinidad y la consiguiente reducción de hábitats disponibles para muchas especies (Sánchez-Fernández et al. 2013).

En este contexto de cambio global, el estudio de la tolerancia fisiológica a la temperatura y a la salinidad es muy importante para entender los procesos y los mecanismos de adaptación, así como la actual distribución geográfica de los organismos (Lutterschmidt & Hutchison 1997) y su posible variación (Terblanche et al. 2011). Además de sus implicaciones ecológicas, el estudio de la tolerancia fisiológica es crucial para la comprensión de la biología y evolución de las especies (Pörtner 2002, Boussau et al. 2008) y para la toma de decisiones que mitiguen los impactos del cambio global (Chown & Gaston 2008, Williams et al. 2008, Wiens et al. 2009).

La presencia y el éxito de los organismos en el tiempo y el espacio dependen de un complejo número de factores ambientales (Odum 1959 citado por Lutterschmidt & Hutchison 1997). De entre ellos, la temperatura es uno de los más importantes, ya que afecta directamente a la energía cinética de las reacciones y por lo tanto a los procesos bioquímicos y fisiológicos de los organismos, incluyendo el comportamiento (Lutterschmidt & Hutchison 1997). Además de la temperatura, otros factores ambientales, como la salinidad, desempeñan un importante papel y pueden actuar de forma aditiva, sinérgica o incluso antagónica con ésta (Spicer & Gaston 1999, Gaston 2003). Por tanto, la tolerancia térmica de los organismos puede estar influida por otras características del ambiente, como el estrés salino que experimentan (Chown & Nicolson 2004).

Hoy día se utilizan dos métodos para determinar la tolerancia térmica en insectos: estáticos y dinámicos (Lutterschmidt & Hutchinson 1997). En el caso de los métodos estáticos, conocidos también como tests de mortalidad, los individuos se someten a una

temperatura constante prefijada y se mide el tiempo que transcurre hasta la muerte; o bien, tras ese choque térmico, se mide el porcentaje de individuos que se recuperan tras varias horas o días en condiciones de temperatura óptima. Es decir, implica evaluar la supervivencia de los individuos, que dependerá tanto de la intensidad como de la duración del estrés térmico. Temperaturas subletales pueden llegar a ser letales si el tiempo de exposición es prolongado (Chown & Nicolson 2004). El método dinámico, también llamado ‘ramping’, implica el cambio gradual de las temperaturas de ensayo hasta que se produce la muerte de los individuos (Lutterschmidt & Hutchison 1997). En este caso, la tasa de cambio de temperatura tendrá una gran influencia sobre la tolerancia térmica.

Para la determinación de los límites térmicos se pueden considerar puntos críticos letales o no letales. La escala termobiológica de Vannier (1994) muestra una serie de límites térmicos en función de las respuestas de los insectos a temperaturas potencialmente letales (**Figura 1**). Al aumentar la temperatura por encima de su óptimo se produce primero insensibilidad, estupor o espasmos del insecto, entrando a continuación en coma prolongado, y finalmente en trauma irreversible y muerte. A bajas temperaturas, los insectos muestran una variedad más amplia de respuestas, como el punto de sobreenfriamiento (*supercooling*, SCP) o punto de cristalización.

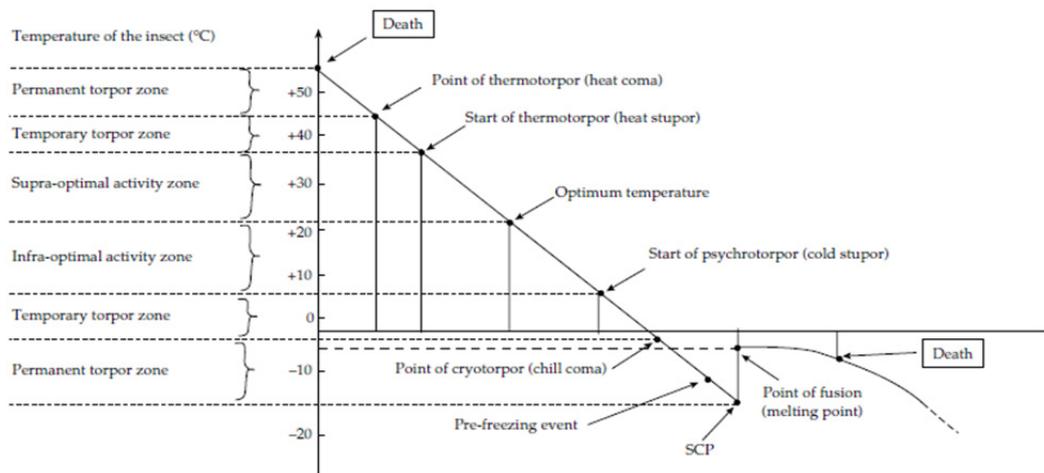


Figura 1. Escala termobiológica de Vannier (fuente: Chown & Nicolson 2004)

La tolerancia al calor está muy conservada en todos los grupos de organismos (ectotermos, endotermos y plantas), mientras que la tolerancia al frío varía entre especies y dentro de la especie (Araujo et al. 2013) con la latitud (Addo-Bediako et al. 2000). Los límites térmicos inferiores tienden a variar con la temperatura ambiental mientras que los superiores no. La tolerancia térmica a altas temperaturas muestra menos variación con la altitud que la tolerancia a bajas temperaturas, un patrón similar al encontrado con la variación latitudinal (Gaston & Chown, 1999). Por lo tanto, el rango de tolerancia térmica aumenta con un aumento de la latitud o la altitud y en ambos casos se asocia este cambio con un aumento de la variabilidad climática asociada (*Hipótesis de variabilidad climática*, Abbo-Bediako et al., 2000). En otras palabras, parece que la selección natural

modula las respuestas fisiológicas a temperaturas bajas más que a altas, existiendo límites fisiológicos extremos que acotan la posible evolución de las tolerancias de los organismos terrestres a altas temperaturas.

Esta asimetría es probablemente consecuencia de diferentes procesos fisiológicos que operan sobre los límites térmicos. La variación en los límites térmicos inferiores en animales es consecuencia de diferencias en efectos termodinámicos en las tasas de reacción, fundamentalmente para el mantenimiento de la homeostasis iónica (Hosler et al. 2000; MacMillan et al. 2012). En cambio, la baja variación en la tolerancia a elevadas temperaturas es debida fundamentalmente a la baja capacidad de los organismos para contrarrestar el efecto desestabilizante de las altas temperaturas sobre las membranas celulares y proteínas (Angiellita 2009). Mecanismos como el incremento de la producción de proteínas de estrés térmico son generalmente insuficientes para permitir a los organismos soportar temperaturas por encima de 45 °C. El límite térmico medio superior para insectos es de 41,6 °C y temperaturas por encima de 47,8 °C solo pueden ser toleradas temporalmente por algunos organismos (Araujo et al. 2013). Por ejemplo, hay hormigas del desierto que pueden tolerar temperaturas que exceden los 50 °C durante cortos periodos de tiempo (Wehner et al. 1992). Sin embargo, otros pocos y muy raros organismos son capaces de desarrollar una mayor resistencia a elevadas temperaturas (Hoffmann et al. 2013).

De este modo, las variaciones en los límites térmicos superiores son mucho menos marcadas que en los límites inferiores, tanto a escalas espaciales (latitud o altitud) como a nivel intra e interespecífico. Por lo tanto, en especies cuyas preferencias climáticas están cerca de sus límites térmicos superiores será poco probable que su tolerancia fisiológica al calor evolucione hacia una mayor tolerancia, siendo en consecuencia más proclives a los efectos negativos del calentamiento global (Araujo et al. 2013). Además, la tolerancia térmica superior está también positivamente relacionada con el tamaño del rango geográfico de las especies (Calosi et al. 2010), es decir, que las especies con mayor riesgo son las que tienen una distribución geográficamente restringida.

Por otro lado, la tolerancia térmica tiene dos componentes, un componente intrínseco o genético, y un componente adquirido o dependiente de las condiciones de *aclimatación* (condiciones en el laboratorio) o *aclimatización* (condiciones en el campo). Ambas son buenos ejemplos de plasticidad fenotípica que reflejan la maleabilidad del organismo en respuesta a las condiciones ambientales experimentadas (Chown & Nicolson, 2004). En general, se ha asumido que son ventajosas para el organismo cuando es expuesto a las condiciones a las que se ha aclimatado (*Hipótesis de aclimatación ventajosa*), aunque recientemente se ha cuestionado dicha hipótesis, ya que la aclimatación o aclimatización tienen un elevado coste fisiológico (Hoffmann 1995). Woods & Harrison (2002) argumentan que la exposición a temperaturas no óptimas puede disminuir la supervivencia en todos los ambientes (*Hipótesis de aclimatación perjudicial*). Por otra parte, Stillman (2003) propuso como hipótesis que las especies que han evolucionado a mayores tolerancias térmicas absolutas lo han hecho a costa de su capacidad de aclimatización. Sin embargo, Calosi et al (2010) han demostrado que existe una relación positiva entre la tolerancia térmica superior y la capacidad de aclimatación en escarabajos Dípteros del género *Deronectes*. Otros estudios previos de tolerancia térmica con otras especies de Dípteros, pero de medios acuáticos salinos, han mostrado una amplia tolerancia térmica de las especies, especialmente para *Enochrus bicolor* y *E. jesusarribasi*, (Arribas et al. 2011), junto con un efecto positivo de la aclimatación a

elevada salinidad y temperatura sobre la tolerancia al calor (Sánchez-Fernández et al. 2010, Arribas et al. 2011).

Los coleópteros de medios salinos continentales mediterráneos son por tanto organismos ideales para el estudio de respuestas fisiológicas y de comportamiento frente a múltiples factores de estrés. En este contexto, la investigación sobre la tolerancia térmica de los coleópteros y su capacidad de aclimatación, es un tema de gran interés para comprender los procesos de adaptación ante el cambio climático (Terblanche et al. 2011).

2.1. Objetivos y predicciones

El objetivo principal del estudio es caracterizar de manera experimental la tolerancia térmica de la especie *Enochrus politus* (Küster 1849) y determinar su capacidad de aclimatación frente a diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

En base a los trabajos e hipótesis previamente citados, se plantean las siguientes predicciones:

- *Enochrus politus* presentará una amplia tolerancia térmica al igual que otras especies del género.
- Poseerá baja capacidad de aclimatación debido a las condiciones extremas y variables en las que vive, especialmente en el límite térmico superior.
- La aclimatación a elevadas temperaturas aumentará la tolerancia al calor, del mismo modo que la aclimatación a bajas temperaturas aumentan la tolerancia al frío.
- La aclimatación a elevadas salinidades aumenta la tolerancia al frío y al calor.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Especie estudiada

El orden Coleópteros es uno de los mejor adaptados y más rico en especies de medios salinos continentales, tanto en hábitat lóticos como leníticos (Velasco et al. 2006; Millán et al., 2011). Para nuestro estudio se ha seleccionado *Enochrus politus* por ser una especie típica y dominante en ambientes de salinidad moderada o media del sureste de España.

Enochrus politus (Küster 1849)

Familia : Hydrophilidae

Identificación:

Escarabajo andador de tamaño pequeño a mediano (4,5-5,5 mm) y coloración entre pardo y negra. Muy parecido externamente a *Enchrus ater*, *E. halophilus* y *E. testaceus*, de los que se diferencia mediante el estudio de la genitalia masculina.



Figura 2 *E. politus* (Foto J.A. Carbonell)

Distribución geográfica:

Esta especie es relativamente abundante en el sur de Europa (Italia, y Portugal), en el norte de África (Argelia, Egipto, Marruecos, Túnez), y alcanza Oriente Medio (Israel, Líbano, Omán, Siria, Afganistán). También se conoce de las Islas Canarias y Madeira (Ribera et al. 1997). Muestra una amplia distribución en la mitad este de la península Ibérica.



Figura 3: Mapa de distribución de *E. politus* en la península Ibérica (fuente: Millán et al. en prensa)

Hábitat y biología:

Ocupa hábitats de corriente de arroyos de media y baja altitud con aguas de diferente grado de mineralización, a menudo sobre substratos de yesos o margas. Adultos y juveniles aparecen durante todo el año si las condiciones son favorables. Presentan alas bien desarrolladas, aunque no existe evidencia directa de su capacidad de vuelo (Ribera et al. 1997).

3.2.- Diseño experimental

Para determinar los límites térmicos de *Enochrus politus* y su capacidad de aclimatación frente a diferentes condiciones de temperatura y salinidad se realizó un diseño experimental de tipo anidado multifactorial en el que se establecieron cuatro tratamientos de salinidad (1, 12, 35 y 60 g/l) para tres temperaturas de aclimatación (15, 20 y 25°C). Teniendo en cuenta estos factores, se definieron en total 12 tratamientos diferentes con 50 individuos cada uno.

Para establecer la tolerancia térmica de la especie se utilizó un método dinámico que consistió en la subida y bajada gradual de temperatura a una tasa de 1 °C/min partiendo de la temperatura de aclimatación hasta superar los límites térmicos tanto de frío como de calor. Se consideró 70 °C y -30 °C, como temperaturas extremas, valores que superan los límites térmicos superiores (UTL) e inferiores (LTL) de otras especies similares de coleópteros acuáticos (Sánchez-Fernández et al. 2012). Se ha utilizado este tipo de método, denominado 'ramping', debido a que se cree que aporta una información más relevante que los métodos estáticos, ya que en condiciones naturales es poco probable que se produzcan cambios bruscos repentinos. Sin embargo, elevadas tasas de calentamiento o enfriamiento puede ocasionar sobrestimaciones en los límites térmicos (Terblanche et al. 2011).

3.3.-Variables respuesta

Supercooling point

El supercooling (*SPC*) también llamado punto de sobreenfriamiento, es el punto más bajo de temperatura antes de que ocurra la nucleación del hielo espontánea de los fluidos corporales en los espacios extracelulares en el que se eleva la temperatura por la liberación de energía latente (Wilson et al. 2003). Es el momento previo al cambio de estado de líquido a sólido. Este límite crítico es considerado un buen indicador de la tolerancia al frío de las especies (Chown & Nicholson, 2004). El contenido en agua, al igual que la ingestión de algunos alimentos, tienen un efecto significativo sobre el *SPC*. La ingesta de alimentos, a menudo, causa una elevación del *SPC* (Block 1996), mientras que la reducción del contenido de agua puede contribuir sustancialmente a evitar la congelación, ya que no solo reduce el *SPC* debido a un aumento en la concentración de crioprotectores, sino también reduce daños mecánicos causados por la formación de hielo (Klok & Chown 1998).

Heat coma

El *Heat coma* o punto de parálisis es el momento exacto de cese de movimiento previo a la muerte del organismo. Viene precedido por una aceleración de la actividad locomotora que provoca movimientos espasmódicos intermitentes de las patas, antenas y palpos (Chown et al. 2009, Lutterschmidt & Hutchison 1997).

3.5.- Recolección, mantenimiento y aclimatación

Los individuos de *Enochrus politus* se recolectaron en el río Chícamo, Abanilla (Murcia). Este río, de carácter hiposalino (menos de 20 g/l de sal), tiene interés de conservación al estar incluido como LIC en la Red Natura 2000. Los días de muestreo fueron el 17 de

octubre de 2013 para los experimentos de aclimatación a 20 °C, el 7 de noviembre de 2013 para los de 25 °C y el 6 de febrero de 2014 para los de 15 °C.

Se recogieron aproximadamente 200 individuos en cada ocasión, con mangas entomológicas específicas para organismos acuáticos y coladores. Los individuos recolectados fueron transportados al laboratorio en seco dentro de un recipiente con vegetación de la orilla para proporcionar humedad y en una nevera aislante para evitar altas temperaturas, a la vez que cambios bruscos de dicha temperatura durante el transporte.

En el momento de la captura de los individuos se midió la salinidad *in situ* (**Tabla I**) y se cogieron 5 l de agua y algas filamentosas (*Cladophora fracta* y *Enteromorpha instestinalis*) como alimento, para el mantenimiento de la especie en el laboratorio.

Tabla I. Salinidad de los hábitats en la fecha de recolección

Fecha	Salinidad (g/l)
17/10/2013	12,8
07/11/2013	12,6
06/02/2014	12,4

Una vez en el laboratorio, los individuos fueron repartidos en dos acuarios de 4 l de capacidad a los que se adicionó previamente agua, vegetación y piedras del lugar de recolección con el fin de simular las condiciones naturales, además de mallas de plástico que sirvieran como soporte para los organismos. En cada acuario se puso un aireador artificial y se cubrió con film de plástico para evitar que se escaparan los individuos y la evaporación el agua. En estas condiciones se mantuvieron a temperatura ambiente ($\approx 20^{\circ}\text{C}$) durante un día.

Posteriormente, para cada temperatura de aclimatación (15, 20 o 25 °C), se prepararon cuatro acuarios de 2 l de capacidad, cada uno con 1300 ml de agua marina preparada (Ocean Fish, Prodac) con una salinidad diferente (1 g/l, 12 g/l, 35 g/l y 60 g/l), con sustrato y vegetación de la zona de recolección y se introdujeron 50 individuos en cada uno. A continuación, los acuarios se cubrieron con film de plástico y se colocó un aireador artificial y se introdujeron en una cámara climática (Sanyo modelo MLR-351) a una temperatura constante (15 °C, 20 °C o 25 °C según el tratamiento de aclimatación), un fotoperiodo con régimen de luz: oscuridad de 12 h: 12 h, e intensidad de luz de una lámpara ($15\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (**Figura 4**). Se utilizó dicho régimen de luz, para que no influyera en la tolerancia térmica, debido a que largos fotoperiodos incrementan la tolerancia al calor y los cortos al frío (Lutterschmidt & Hutchison 1997). En estas condiciones los individuos fueron aclimatados durante una semana, los 5 primeros días con alimento y los dos últimos en ayunas. Para quitarles el alimento se cambió el agua del acuario completamente.

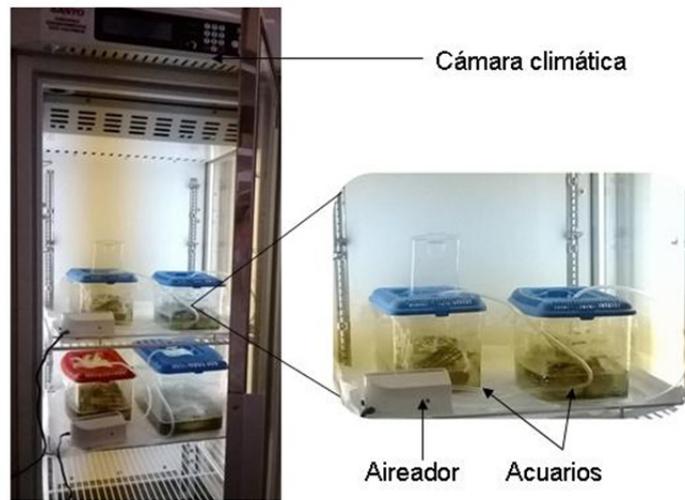


Figura 4. Individuos en acuarios bajo condiciones de aclimatación en la cámara climática.

3.6.- Procedimiento experimental y medida de los límites térmicos

Tras la semana de aclimatación de los 50 individuos para cada tratamiento, al azar, se organizaron dos subgrupos. Uno se utilizó para medir el límite térmico superior (*Heat coma*) y otro para medir el inferior (*SPC*).

Dichos individuos se lavaron con agua destilada utilizando un colador y se secaron con papel secante para eliminar la sal en la superficie del cuerpo ya que puede afectar al resultado. Posteriormente, se pusieron en una placa Petri etiquetada con el nombre del tratamiento. Después, utilizando unas pinzas blandas, se pegaron los individuos cuidadosamente por el dorso en una placa de cerámica previamente refrigerada para que tuviera una temperatura inferior y uniforme a la del organismo objeto de estudio, permitiendo así detectar a éstos más fácilmente en la imagen térmica por su mayor temperatura.

Sobre la placa de cerámica se dispusieron, aproximadamente, 40 individuos (2 individuos por celdilla) en cuatro filas, las dos superiores para un tratamiento de salinidad, y las inferiores para un segundo tratamiento. En los experimentos para medir el límite térmico superior, se incrementó el número de individuos, 3 por celdilla cuando se pudo, para tener un resultado representativo en caso de que se escapara algún de ellos (**Figura 5**).



Figura 5. Material utilizado para disponer los individuos sobre la placa de cerámica.

En la placa de cerámica se pegó también una tira de papel de aluminio arrugado al lado de los individuos para la corrección de la temperatura reflejada con el objetivo de conseguir la temperatura del organismo correcta. Luego se hizo una foto y un esquema en el cuaderno numerando cada uno de los individuos (**Figura 6**).

Para la medición de tolerancia térmica se utilizó una cámara termográfica (FLIR SC305) conectada a un ordenador con un software (ThermaCAM Researcher Professional 2.10) que permite el almacenamiento y análisis de la secuencia de imágenes térmicas de los individuos registradas por la misma durante el periodo de calentamiento o enfriamiento de los individuos en la cámara climática (Binder MK03). Además, se utilizó un sensor de temperatura situado dentro de la cámara climática para el registro continuo de la temperatura del aire durante el experimento. En el exterior de la cámara climática se instaló una cámara de video sobre un trípode enfocando los individuos a través del cristal para grabar su movimiento durante los experimentos de incremento o descenso de temperatura (**Figura 7**).



Figura 6. Placa de cerámica con el papel de aluminio y los individuos fijados.

Una vez instalado dicho equipamiento, se introdujo la placa de cerámica en la cámara climática y se seleccionó el programa de subida o bajada de temperatura ($\pm 1^\circ \text{C}/\text{min}$), comenzando por la temperatura a la que los individuos habían sido aclimatados. Simultáneamente se inició el funcionamiento de la cámara termográfica, de la cámara de

video y del sensor de la temperatura del aire de la cámara climática. Una vez finalizado el “ramping” se pasaron las imágenes de video así como los datos de temperatura al ordenador para luego poder procesarlas.



Figura 7. Equipamiento utilizado para la medida de los límites térmicos.

Al finalizar el experimento, cada uno de los individuos testados se guardó en viales (Eppendorf) con alcohol al 96 % y se etiquetaron para referirlos a dicho experimento, al objeto de determinar el sexo mediante el estudio de la genitalia bajo lupa binocular (**Figura 8**).



Figura 8. Conservación de los individuos etiquetados en viales con alcohol.

Para la determinación del *SPC* y el *Heat coma* de cada individuo se utilizó el programa citado anteriormente (ThermaCAM Researcher Professional 2.10). Para ello se identificaron los individuos en la imagen térmica por el orden establecido en la placa lo que permitió registrar la temperatura de forma individual a intervalos de 1 segundo (**Figura 9**).

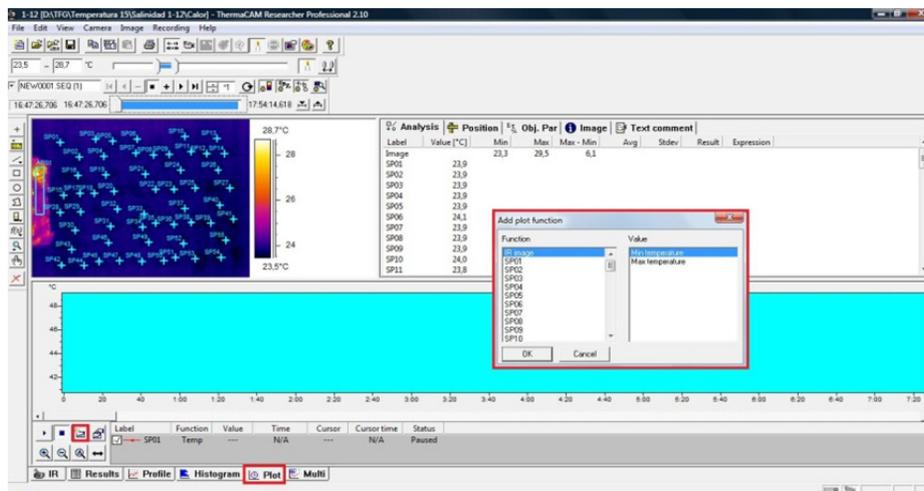


Figura 9. Marcado de los individuos en la imagen térmica y registro de su temperatura.

En los experimentos de enfriamiento, el SPC de cada individuo fue claramente detectable puesto que los individuos experimentaron una brusca subida de temperatura corporal debido a una reacción exotérmica provocada por la congelación de los fluidos corporales del animal (Wilson et al. 2003) (**Figura 10**).

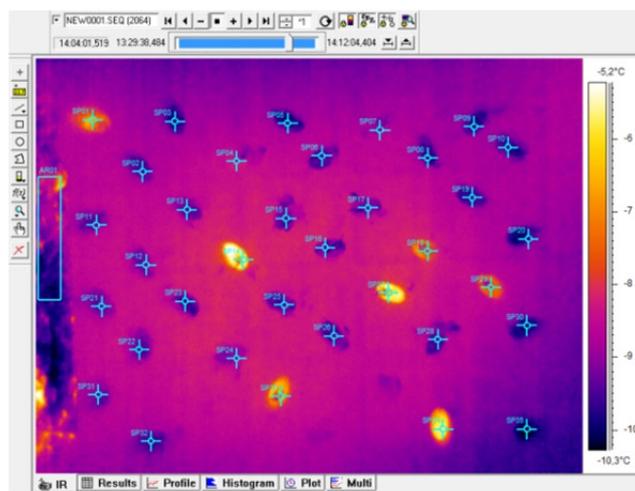


Figura 10. Detalle de la brusca subida de temperatura corporal tras el SPC.

En los experimentos de calentamiento, para detectar el *Heat coma*, previo a la muerte de los individuos, se utilizó la grabación en vídeo, determinando el tiempo en el que cada individuo cesaba de moverse, para visualizar en la imagen térmica que temperatura tenía en ese momento. Dicho cese del movimiento fue precedido por movimientos intermitentes espasmódicos de las patas, antenas y palpos. Se observaron los ataques espasmódicos interrumpidos por momentos sin movimiento incluso durante 40 ó 50 segundos. Por último, se corrigió la temperatura reflejada individual en el momento de la muerte.

3.7.- Análisis de datos

Para analizar el efecto de la temperatura y salinidad de aclimatación sobre los límites térmicos (*SPC* y *Heat coma*) se realizó un análisis ANOVA multifactorial. Previamente se calcularon los estadísticos descriptivos (media y error estándar) para cada variable por tratamiento combinado de salinidad y temperatura de aclimatación, y se comprobó el cumplimiento de los requisitos del ANOVA. Para ver la normalidad de los datos se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov mediante el análisis de los residuos no tipificados. Para comprobar la homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad) se empleó el test de Levene. Una vez comprobados dichos requisitos se realizó un análisis ANOVA para cada variable dependiente, incluyendo la salinidad y la temperatura de aclimatación y el sexo como factores fijos. En ambos casos se exploró tanto el efecto aislado de cada uno de los factores como sus interacciones.

El número final de individuos testados para el *Heat coma* y el *SPC* varió entre 14 y 29. La razón de esta variabilidad se debe a que a pesar de utilizar inicialmente entre 20 y 30 individuos para cada tratamiento, algunos individuos se movieron durante las mediciones y fueron desechados al no poder ser identificados.

Para los factores que tuvieron un efecto significativo se realizaron pruebas post-hoc para detectar diferencias entre los distintos tratamientos. En este caso se utilizó el test de Bonferroni con un nivel de significación de 0,05.

La relación entre ambos límites térmicos fue analizada mediante correlación de Pearson y Spearman. Todos los análisis fueron analizados con el paquete estadístico IBM SPSS versión 19.0 para Windows.

4. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del análisis ANOVA univariante multifactorial y se incluyen las tablas resultantes del análisis, que muestran la significación de los factores y sus interacciones sobre la variable analizada y las gráficas representativas de los estadísticos descriptivos (media y error estándar) para cada tratamiento, así como las diferencias significativas entre ellos.

4.1.- SPC

Conforme bajaba la temperatura, la tendencia general de comportamiento fue una ralentización de movimientos. Al principio los individuos batían enérgicamente sus patas hasta alcanzar una temperatura entre los 7 y los 4 °C dependiendo de su temperatura de aclimatación. A partir de ahí, hasta temperaturas cercanas a 0 °C, los movimientos fueron disminuyendo a la vez que se hicieron cada vez más lentos. Finalmente, por debajo de -4 a -7 °C quedaron prácticamente inmóviles.

En cuanto a la variación de la temperatura de los individuos durante el enfriamiento se observó una disminución gradual de la temperatura hasta alcanzar el *SPC* donde se produjo un incremento brusco de 0,7-2,5 °C de temperatura como consecuencia de la congelación de los fluidos internos (**Figura 11**).

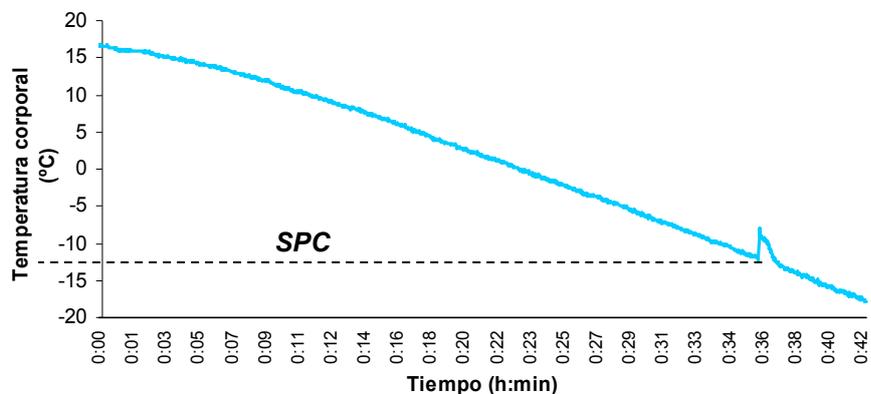


Figura 11. Variación de la temperatura corporal de un individuo durante el experimento de enfriamiento

El *SPC* estuvo afectado significativamente tanto por la salinidad como por la temperatura de aclimatación ($p \leq 0,05$), siendo la interacción entre ambos factores también significativa. Sin embargo, ni el sexo ni las demás interacciones entre factores tuvieron efecto significativo (**Tabla II, Figura 12**).

Tabla II. Resultados del análisis ANOVA para la variable respuesta *SPC*. En negrita se presentan los factores que han resultado significativos.

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: <i>SPC</i>					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	g/l	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	294,666 ^a	23	12,812	5,614	0,000
Intersección	25422,002	1	25422,002	11139,327	0,000
Temperatura	139,821	2	69,911	30,633	0,000
Salinidad	46,742	3	15,581	6,827	0,000
Sexo	0,147	1	0,147	0,064	0,800
Temperatura * Salinidad	47,800	6	7,967	3,491	0,003
Temperatura * Sexo	3,733	2	1,867	0,818	0,443
Salinidad * Sexo	2,582	3	0,861	0,377	0,770
Temperatura * Salinidad * Sexo	16,564	6	2,761	1,210	0,302
Error	515,774	226	2,282		
Total	28082,612	250			
Total corregida	810,440	249			

a. R cuadrado = 0,364 (R cuadrado corregida = 0,299)

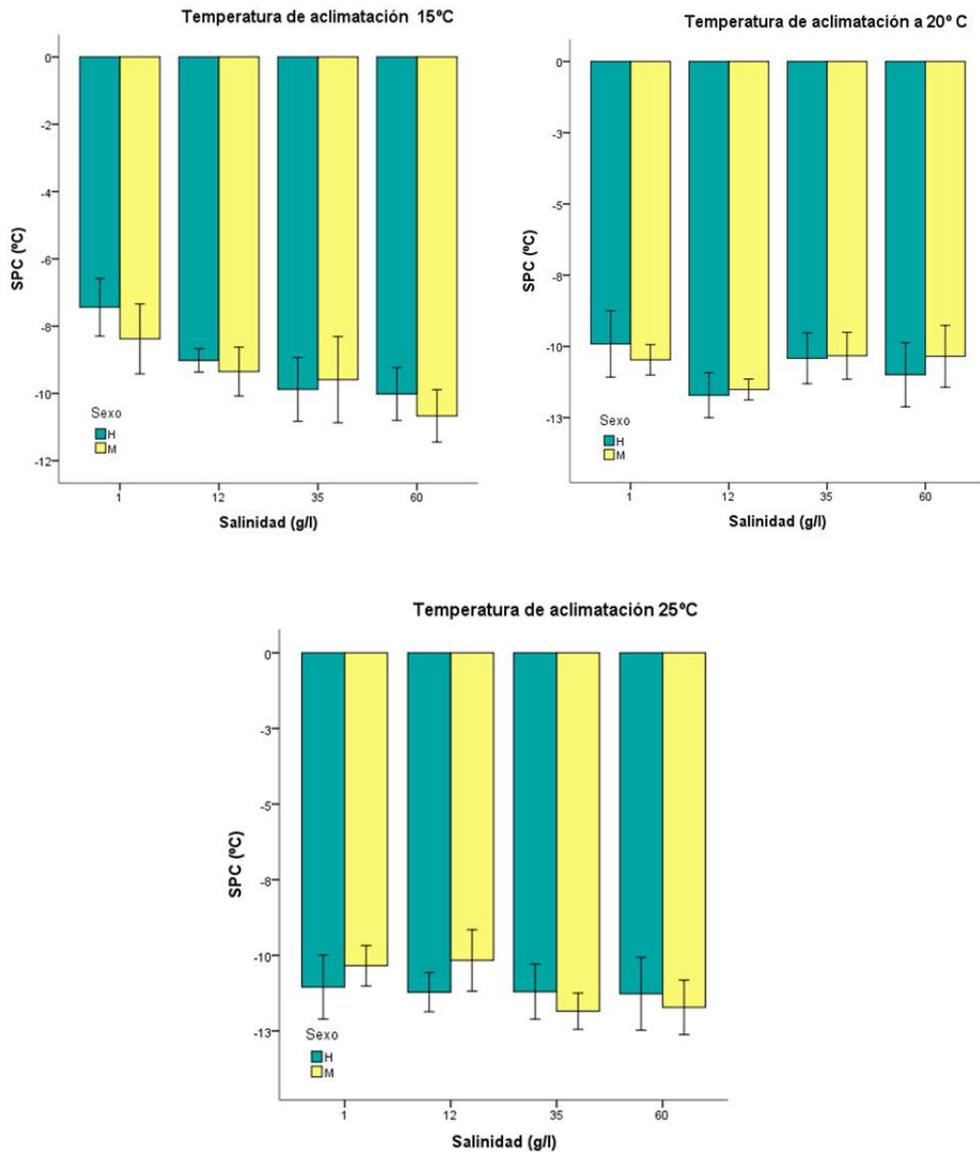


Figura 12. Variación del SPC (media ± ES) de machos y hembras de *E. politus* en relación a la temperatura y salinidad de aclimatación.

Respecto a la temperatura de aclimatación, a 15° C, el SPC fue mayor que en el resto de tratamientos (-9,22 ± 0,19), no habiendo diferencias significativas entre los tratamientos de 20 y 25 °C (Figura 12, Figura 13).

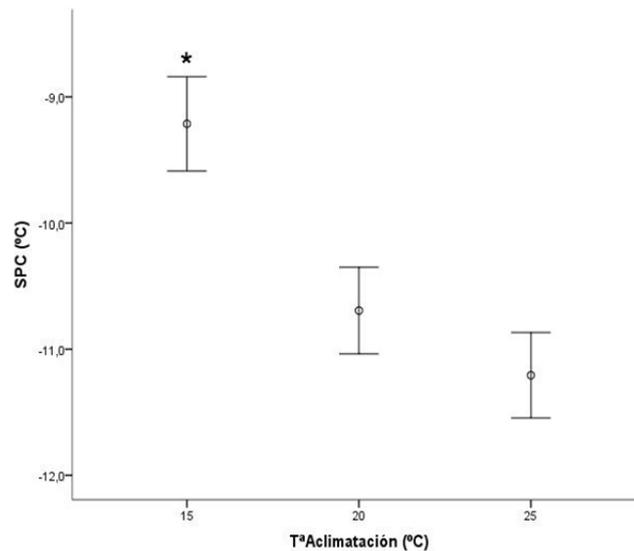


Figura 13. Variación del *SPC* (media ± ES) con respecto a la temperatura de aclimatación.

En cuanto a la salinidad, los individuos que fueron sometidos al tratamiento de salinidad de 1 g/l tuvieron menos tolerancia al frío que los demás ($-9,53 \pm 0,27$). En general se observó que a medida que aumentaba la salinidad se produjo un descenso del *SPC*, por lo tanto, un aumento a la tolerancia a las bajas temperaturas, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de 12, 35 y 60 g/l (**Figura 12, Figura 14**).

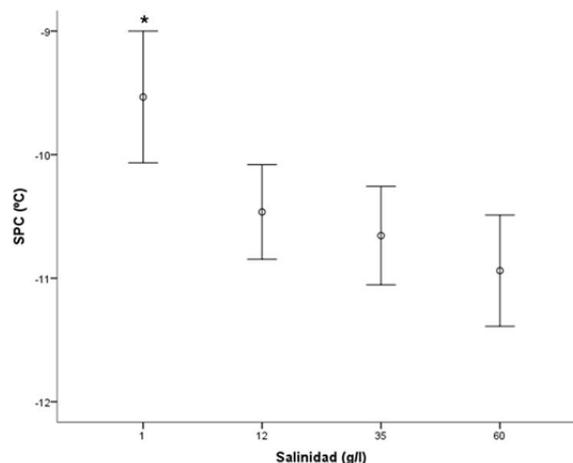


Figura 14 Variación del *SPC* (media ± ES) con respecto a la salinidad

Respecto al efecto de la interacción entre la temperatura y la salinidad de aclimatación (**Figura 15**), los individuos aclimatados a una temperatura de 15° C y a tratamientos de 1 y 12 g/l de salinidad presentaron los valores de *SPC* más altos. Los individuos sometidos a 35 g/l solo mostraron diferencias significativas en el *SPC* para las temperaturas de 15 y 25 °C, presentando valores intermedios a 20 °C. Sin embargo, los individuos aclimatados al tratamiento salino más alto (60 g/l) no mostraron diferencias significativas en función de la temperatura de aclimatación.

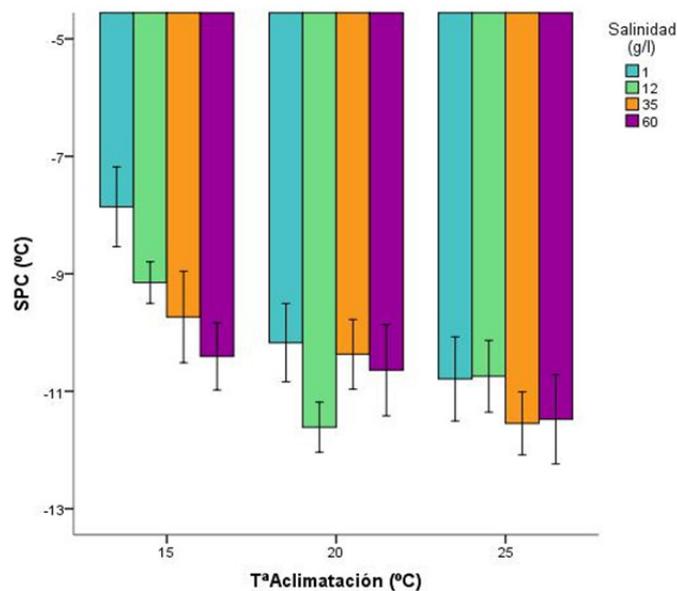


Figura 15. Variación del *SPC* (media ± ES) en función del tratamiento combinado de la temperatura y salinidad de aclimatación.

4.2- Heat coma

La tendencia general del comportamiento de los organismos durante los experimentos de calor fue un incremento del movimiento de patas, palpos y antenas conforme aumentaba la temperatura. Al llegar aproximadamente a una temperatura de 48 °C, había momentos en los que cesaban los movimientos pero a continuación continuaban con espasmos hasta el momento considerado como *Heat coma* donde se quedan completamente inmóviles. Justo en el momento antes del *Heat coma*, cuando la temperatura sobrepasaba los 50 °C se aceleraron los movimientos. Cuando se analizó la variación de la temperatura corporal de los individuos conforme aumentaba la temperatura de la cámara climática, la mayoría de individuos registraron un aumento de temperatura brusco, aunque de menor magnitud, previo al *Heat coma*, como resultado del calor generado por los intensos movimientos espasmódicos, aunque estos se pueden producir de forma intermitente (**Figura 16**).

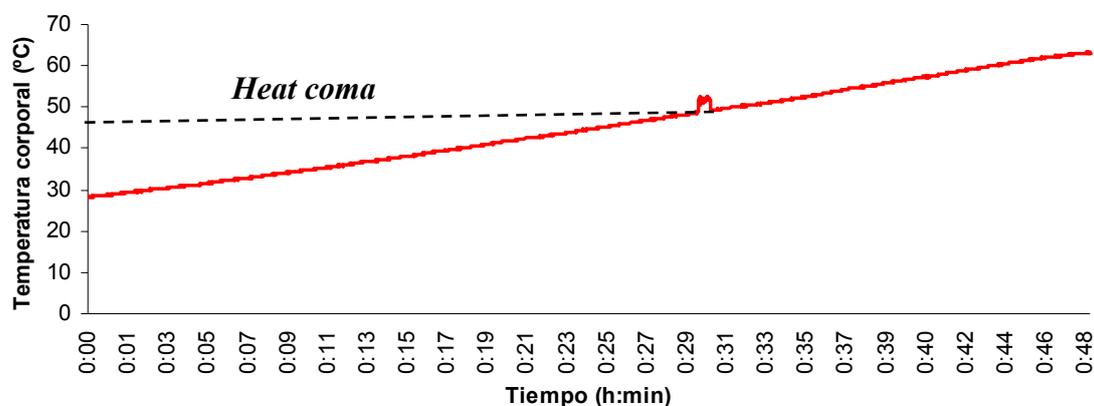


Figura 16. Variación de la temperatura corporal de un individuo durante el experimento de calentamiento

En este caso, solo la salinidad y la interacción entre temperatura y salinidad de aclimatación tuvieron un efecto significativo sobre el *Heat coma* ($p \leq 0,05$). Sin embargo, no tuvo efecto significativo el resto de factores ni las otras interacciones (**Tabla III, Figura 17**).

Tabla III. Resultados del ANOVA para la variable respuesta *Heat coma*. En negrita se presentan los factores que han resultado significativos.

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: <i>Heat coma</i>					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	g/l	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	121,641 ^a	23	5,289	3,915	0,000
Intersección	637538,620	1	637538,620	471921,731	0,000
Temperatura	7,651	2	3,826	2,832	0,061
Salinidad	63,888	3	21,296	15,764	0,000
Sexo	1,668	1	1,668	1,235	0,268
Temperatura * Salinidad	18,752	6	3,125	2,313	0,034
Temperatura * Sexo	7,691	2	3,845	2,846	0,060
Salinidad * Sexo	3,237	3	1,079	0,799	0,496
Temperatura* Salinidad * Sexo	11,073	6	1,845	1,366	0,229
Error	317,471	235	1,351		
Total	737224,783	259			
Total corregida	439,112	258			

a. R cuadrado = 0,277 (R cuadrado corregida = 0,206)

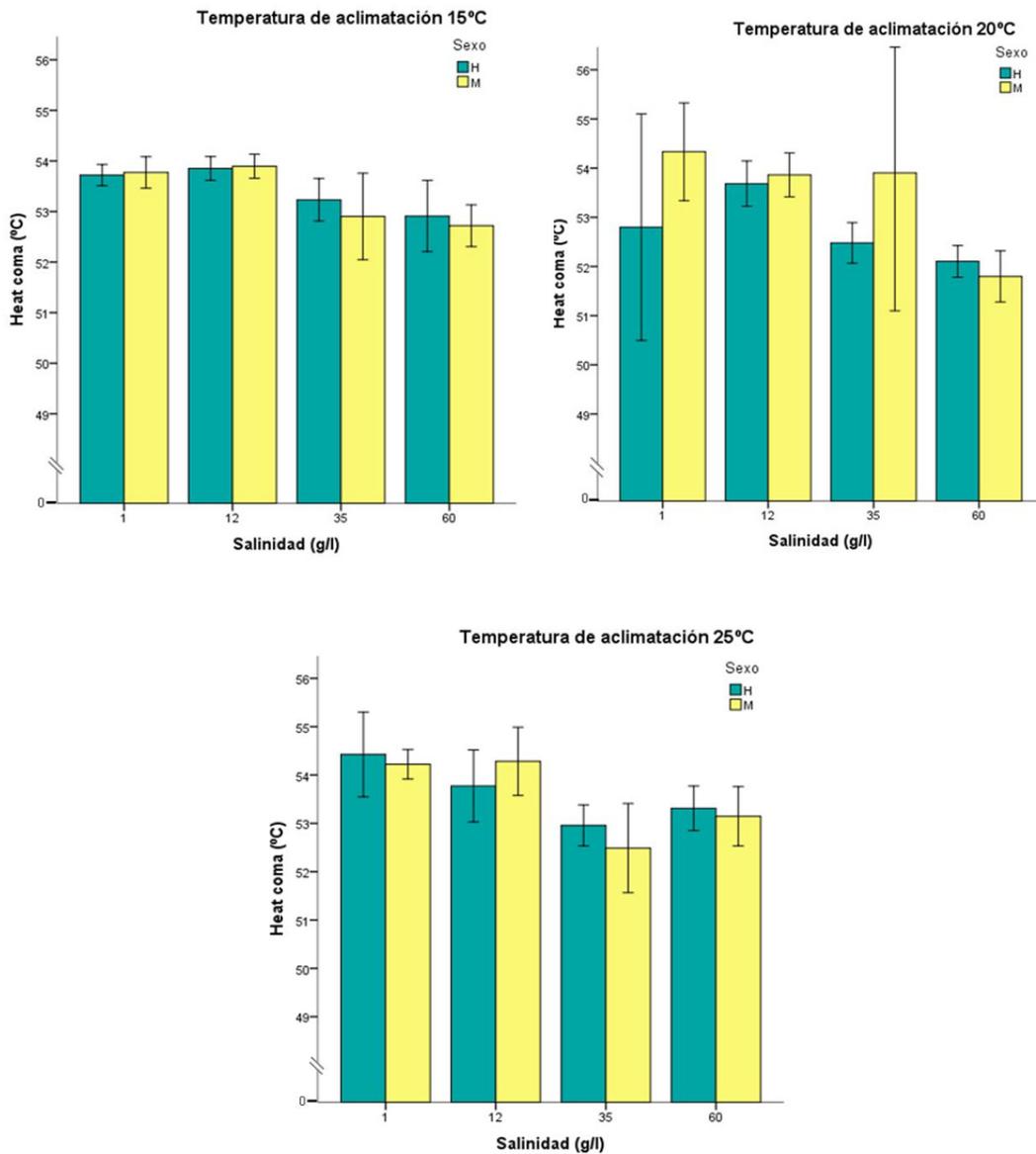


Figura 17. Variación del *Heat coma* (media \pm ES) de machos y hembras de *E. politus* en relación a la temperatura.

No se encontraron diferencias significativas en el *Heat coma* entre las temperaturas de aclimatación (**Figura 18**). En cuanto a la salinidad, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 1 y 12 g/l ni entre los de 35 y 60 g/l, sin embargo, si las hubo entre ambos grupos, presentando mayor tolerancia a elevadas temperaturas los individuos aclimatados a bajas salinidades (**Figura 17, Figura 19**).

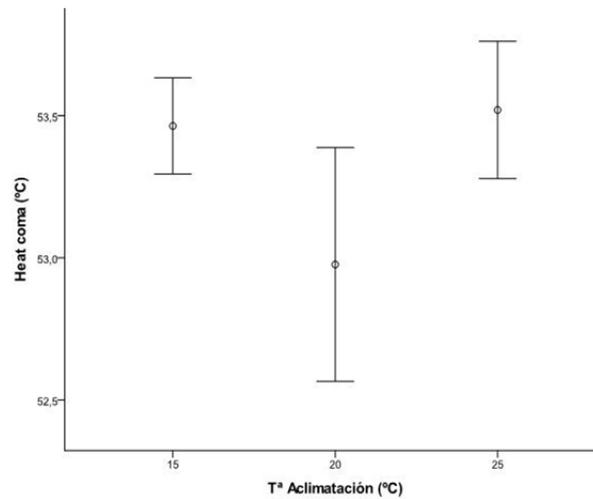


Figura 18. Variación del *Heat coma* (media \pm ES) con respecto a la temperatura de aclimatación.

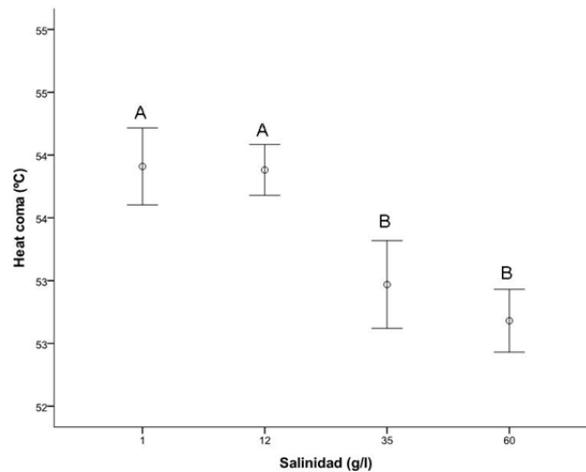


Figura 19. Variación del *Heat coma* (media \pm ES) respecto a la salinidad.

Cuando se analizó la interacción de la temperatura de aclimatación con la salinidad, la respuesta de los individuos a alta salinidad (60 g/l) fue diferente en las distintas temperaturas de aclimatación, presentando el valor significativamente más bajo (52 °C) a 20 °C. Sin embargo en los otros tratamientos de salinidad las respuestas generales fueron más homogéneas, no habiendo diferencias significativas (**Figura 20**).

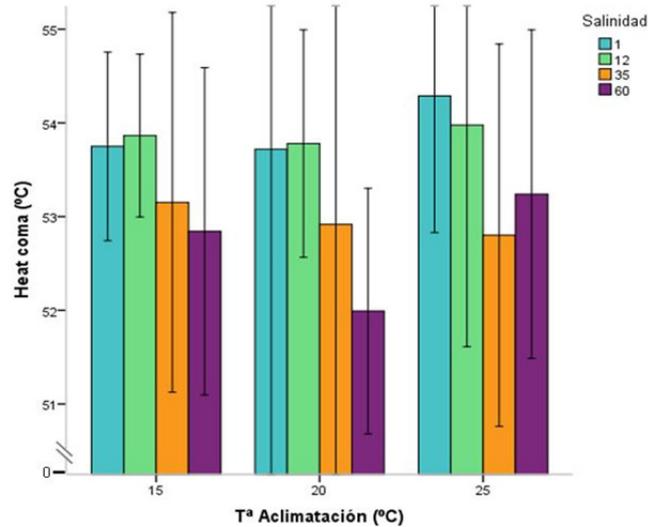


Figura 20. Variación del *Heat coma* (media \pm ES) en función del tratamiento combinado de la temperatura y salinidad de aclimatación.

4.3.-Correlación entre SPC y Heat coma

Ambos límites térmicos no presentaron una correlación significativa (r Pearson = 0,208; p = 0,496).

4.4.- Ventana térmica

El valor medio de SPC más bajo se dió a 20 °C y 12 g/l y el valor más alto de *Heat coma* fue a 25 °C y 1 g/l de salinidad. Las condiciones donde el rango de tolerancia para esta especie fue mayor, es decir las condiciones óptimas, fue a una temperatura de aclimatación de 20 °C y 12 g/l de salinidad, mientras que el menor rango de tolerancia lo encontramos en la combinación de temperatura y salinidad más bajas (15 °C y a 1 g/l) (**Tabla IV**). La ventana térmica fue mayor a 12 g/l en el rango de temperaturas de aclimatación testadas, disminuyendo esta conforme aumenta la salinidad (**Figura 21**).

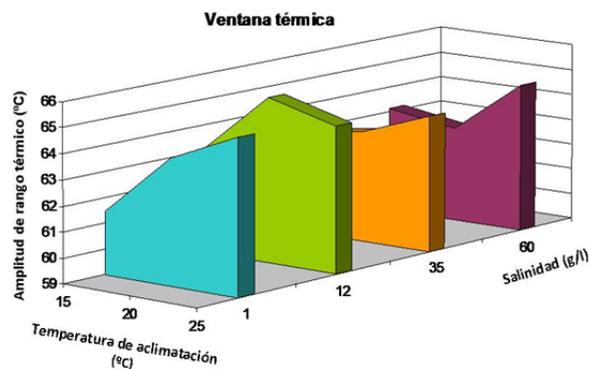


Figura 21. Representación gráfica de la ventana térmica.

Tabla IV. Límites térmicos medios y rango térmico para cada tratamiento de aclimatación.

TªAclimatación(°C)	Salinidad(g/l)	SPC medio(°C)	Heat coma medio(°C)	Rango térmico (°C)
15	1	-7,86	53,68	61,54
15	12	-9,15	53,92	63,07
15	35	-9,66	53,26	62,92
15	60	-10,33	52,78	63,11
20	1	-10,17	53,72	63,89
20	12	-11,69	53,78	65,47
20	35	-10,37	52,99	63,36
20	60	-10,70	51,99	62,69
25	1	-10,79	54,29	65,08
25	12	-10,75	53,98	64,72
25	35	-11,52	52,80	64,33
25	60	-11,55	53,24	64,79

5. DISCUSIÓN

5.1.- Tolerancia a bajas temperaturas

La tolerancia al frío de *E. politus*, al contrario de lo esperado, aumentó con la aclimatación a condiciones de mayores temperaturas (20 y 25 °C), sin embargo, también se incrementó con salinidades más altas (35-60 g/l) de acuerdo con nuestras predicciones. Dicho efecto es similar al encontrado en otros estudios de tolerancia térmica de especies de insectos acuáticos salinos, como el hemíptero *Trichocorixa verticalis verticalis* (Coccia et al, 2013). Sin embargo, Sánchez-Fernández et al. 2010, en dos especies de coleópteros acuáticos (*Nebrioporus ceresyi* y *N. baeticus*), encuentran los valores más bajos del límite térmico inferior en individuos aclimatados a elevadas salinidades, pero en combinación con bajas temperaturas (15°C).

El efecto de la concentración salina del medio en la tolerancia al frío puede estar relacionado con la capacidad de regulación osmótica del organismo. Así, el aumento del SPC en agua dulce (1 g/l) fue probablemente debido al efecto de dilución del medio interno del organismo por la tendencia a introducirse agua en un medio hipoosmótico, disminuyendo la osmolalidad de la hemolinfa, y por tanto aumentando la temperatura de su punto de congelación (Bradley 2009).

5.2.- Tolerancia a elevadas temperaturas

Contrariamente a nuestras expectativas iniciales, la temperatura de aclimatación no influyó en la tolerancia a elevadas temperaturas de *E. politus*. La ausencia de aclimatación térmica en el límite térmico superior es común en insectos asociados a ambientes extremos, como *Stratiomys japonica* (Garbuz et al. 2008), la larva de la mosca

antártica *Belgica antarctica* (Rinehart et al. 2006), y también se ha observado en algunas especies de Ditiscidos (Calosi et al. 2008), aunque en este caso no aparecen en ambientes extremos.

Por otra parte, la capacidad de aclimatación también depende de las tasas de cambio de la temperatura empleada en la determinación experimental de los límites térmicos (Chown et al. 2009). Además, hay trabajos que han investigado los efectos de la temperatura de aclimatación sobre los límites térmicos, llevados a cabo a tasas $\geq 0,25$ °C, que han demostrado que el límite térmico máximo responde menos a los tratamientos de aclimatación que el límite térmico mínimo (e.g. Klok & Chown 2003; Terblanche et al. 2006).

Sin embargo, la salinidad si tuvo un efecto significativo sobre el límite térmico superior. A diferencia de lo que se podría esperar por los resultados de otros estudios con coleópteros y hemípteros acuáticos salinos, en los que se observó una mayor tolerancia al calor en individuos aclimatados a elevadas temperaturas y salinidades (Sánchez-Fernández et al. 2010, Arribas et al. 2011, Coccia et al. 2013), nuestros resultados demuestran que los individuos aclimatados a bajas salinidades (1 y 12 g/l) son capaces de tolerar mejor el calor que a salinidades más altas (35 y 60 g/l). Las especies de los estudios arriba referidos presentan mayor tolerancia a la salinidad y viven frecuentemente en medios más salinos (Céspedes et al. 2013, Pallarés et al. en prensa), por lo que son osmoreguladores más eficientes y no se ven afectados negativamente por dichos valores de salinidad, como ocurre con *E. politus* al someterlo a los tratamientos de mayor salinidad.

La combinación de condiciones de aclimatación a elevada temperatura y salinidad provocó una disminución del límite térmico superior en *E. politus*, lo que parece indicar un efecto negativo entre ambos tipos de estrés y un posible *trade-off* entre tolerancia a la temperatura y tolerancia a la salinidad (Angielletta et al. 2003). Los mecanismos de osmoregulación pueden verse afectados por las temperaturas elevadas, reduciendo la supervivencia y respuestas de dispersión de los organismos frente al estrés osmótico (Pallarés et al. 2012). Por otro lado, el elevado coste energético que conlleva la osmoregulación en medios muy hiperosmóticos puede conllevar la disminución de energía destinada a otros mecanismos de regulación relacionados con la tolerancia térmica, como la producción de proteínas de estrés térmico (Hsp). Estas proteínas de choque térmico se producen en todos los organismos desde arqueobacterias a los mamíferos y su función es proteger a las proteínas de su desnaturalización por las elevadas temperaturas u otras condiciones de estrés (Feder & Hoffman 1999). En condiciones de estrés térmico y salino, la temperatura a partir de la cual se induce la producción de Hsp puede disminuir, reduciendo el límite térmico superior (Tomaneck 2011).

El papel de las Hsp en la tolerancia al calor ha sido ampliamente documentado (por ejemplo Solomon et al. 1991, Feder et al. 1996, Goto et al. 1998, Feder & Hofmann, 1999, Singh & Lakhota, 2000, Hoffmann et al. 2003, Mahroof et al. 2005, Teixeira & Polavarapu 2005; Gómez et al. 2009, citados por Haranda et al. 2011). Kalosaka et al. (2009) encuentran una relación positiva entre la termotolerancia de la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* y la expresión de Hsp70 inducibles, al igual que en *Drosophila* (Welte et al. 1993, Feder et al. 1996, Gong & Golic 2006, Bettencourt et al. 2008) pero la expresión de las proteínas de estrés reducen el crecimiento, desarrollo y la supervivencia a largo plazo

(Krebs & Feder 1997, Krebs & Feder 1998, Zatssepina et al. 2001 citados por Kalosaka et al. 2009). Además, mientras pequeños o moderados incrementos en Hsp70 aumentan la termotolerancia en *Drosophila*, grandes incrementos en Hsp70 provocan el efecto contrario (Krebs & Feder 1998).

5.3.- Capacidad de aclimatación

La capacidad de aclimatación a cambios de temperatura parece ser mayor en animales de ambientes moderadamente variables, y limitada en animales de ambientes muy estables o altamente variables (Tomaneck 2008). Estos últimos, son los ambientes típicos que generalmente ocupa *E. politus*. Nuestros resultados según lo esperado muestran que *E. politus* es una especie muy euritérmica, con una amplia tolerancia térmica y una limitada capacidad de aclimatar a elevadas temperaturas, aunque presenta cierto grado de plasticidad fenotípica a las bajas temperaturas. Especies cuyas preferencias de hábitat y climáticas están próximas a su límite térmico superior, probablemente no puedan desarrollar tolerancias fisiológicas al aumento de la temperatura, por lo que serán más sensibles al cambio climático (Tomaneck 2008, Araujo et al. 2013). Sin embargo, *E. politus* vive en ambientes que no es raro que puedan alcanzar hasta 35 °C en verano, con variaciones diarias de hasta 18 °C (Pallarés et al. 2012), por lo que dada su elevada tolerancia a estas altas temperaturas y a pesar de su baja capacidad de aclimatación podría ser capaz de sobrevivir al aumento de temperatura de varios grados previstos con los escenarios de cambio climático a medio y largo plazo (IPCC 2013). No obstante, la combinación del aumento de temperatura y salinidad de los medios acuáticos donde vive, conllevaría un aumento de su tolerancia térmica inferior pero una disminución del límite superior en condiciones de elevada salinidad, reduciéndose globalmente su tolerancia térmica.

6. CONCLUSIONES

1. *Enochrus politus* presenta una amplia tolerancia térmica con límites térmicos medios de $-10,38 \pm 0,32$ y $57,37 \pm 0,19$ siendo su tolerancia mayor en condiciones óptimas de temperatura y salinidad media (20 °C y 12 g/l) donde vive frecuentemente la especie.
2. En condiciones de temperaturas más bajas y agua dulce, su rango de tolerancia térmica disminuye.
3. La exposición a aguas salinas aumenta su tolerancia al frío, pero disminuye su tolerancia al calor.
4. La especie presenta una cierta capacidad de aclimatación, respondiendo el límite térmico inferior a las condiciones de temperatura y salinidad, y el límite térmico superior se ve afectado negativamente por la salinidad. Por tanto, la salinidad ejerce una mayor influencia en la tolerancia térmica y capacidad de aclimatación en la especie estudiada que la temperatura.
5. A pesar de su limitada capacidad de aclimatación al aumento de temperatura, dada su elevada tolerancia a temperaturas extremas, se prevé que la especie sea capaz de tolerar el aumento de temperaturas previsto con el cambio climático.

7. REFERENCIAS

- Addo-Bediako A, Chown SL & Gaston KJ. 2002. Metabolic cold adaptation in insects: a large-scale perspective. *Functional Ecology* 16: 332–338.
- Angilletta MJ. 2009. *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford: Oxford University Press.
- Angilletta MJ, Wilson RS, Navas CA & James RS. 2003. Tradeoff and the evolution of thermal reaction norms. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 234–240.
- Araújo MB, Ferri-Yáñez F, Bozinovic F, Marquet PA, Valladares F & Chown SL. 2013. Heat freeze niche evolution. *Ecology Letters* 16: 1206–1219.
- Arribas P, Andújar C, Sánchez-Fernández D, Abellán P & Millán A. 2013. Integrative taxonomy and conservation of cryptic beetles in the Mediterranean region (Hydrophilidae). *Zoologica Scripta* 42 (2): 182–200.
- Arribas P, Velasco J, Abellán P, Sánchez-Fernández D, Andújar C, Calosi P, Millán A, Ribera I & Bilton DT. 2011. Dispersal ability rather than ecological tolerance drives differences in range size between lentic and lotic water beetles (Coleoptera: Hydrophilidae). *Journal of Biogeography* 39(5): 884–894.
- Bettencourt BR, Hogan CC, Nimali M & Drohan BW. 2008. Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. *BMC Biology* 6: 5–15.
- Block W. 1996. Cold or drought—the lesser of two evils for terrestrial arthropods? *European Journal of Entomology* 93: 325–339.
- Boussau B, Blanquart S, Necsulea A, Lartillot N & Gouy M. 2008. Parallel adaptations to high temperatures in the Archaean eon. *Nature* 456: 942–945.
- Bradley TJ. 2009. *Animal osmoregulation*. Oxford Animal biology Series. Oxford: Oxford University Press.
- Calosi P, Bilton DT, Spicer JI & Atfield A. 2008. Thermal tolerance and geographic range size in the *Agabus brunneus* group of European diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae). *Journal of Biogeography* 35: 295–305.
- Calosi P, Bilton DT, Spicer JI, Votier SC & 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.
- Céspedes V, Pallarés S, Arribas P, Millán A & Velasco J. 2013. Water beetle tolerance to salinity and anionic composition and its relationship to habitat occupancy. *Journal of Insect Physiology* 59:1076–1084.
- Chown SL & Gaston KJ. 2008. Macrophysiology for a changing world. *Proceedings of the Royal Society London b*. 275: 1469–1478.

Chown SL & Nicolson S. 2004. *Insect Physiological Ecology. Mechanism and patterns*. Oxford: Oxford University Press.

Chown SL, Jumbam KR, Sørensen JG & Terblanche JS. 2009. Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. *Functional Ecology* 23: 133–140.

Coccia C, Calosi P, Boyero L, Green AJ & Bilton DT. 2013. Does Ecophysiology Determine Invasion Success? A Comparison between the Invasive Boatman *Trichocorixa verticalis verticalis* and the Native *Sigara lateralis* (Hemiptera, Corixidae) in South-West Spain. *PLoS ONE* 8(5), doi: 10.1371/annotation/2c817fcd-acf8-49ea-82cb-74776a3eeb9b.

Feder ME & Hofmann GE. 1999. Heat shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61: 243–282.

Feder M, Cartaño NV, Milos L, Krebs RA & Lindquist SL. 1996. Effect of engineering Hsp70 copy number on Hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 199: 1837–1844.

Garbuz DG, Zatssepina OG & Przhiboro AA. 2008. Larvae of related Diptera species from thermally contrasting habitats exhibit continuous up-regulation of heat shock proteins and high thermotolerance. *Molecular Ecology* 17: 4763–4777.

Gaston KJ. 2003. *The structure and dynamics of geographic ranges*. Oxford: Oxford University Press.

Gaston KJ & Chown SL. 1999. Elevation and climatic tolerance: a test using dung beetles. *Oikos* 86: 584–590.

Gómez FH, Bertoli CI, Sambucetti P, Scannapieco AC & Norry FM. 2009. Heat-induced hormesis in longevity as correlated response to thermal-stress selection in *Drosophila buzzatii*. *Journal of Thermal Biology* 34:17–22.

Gong WJ & Golic KG. 2006. Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* 172: 275–286.

Goto SG, Yoshida KM & Kimura MT. 1998. Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and non diapausing adults of *Drosophila triauraria*. *Journal of Insect Physiology* 44: 1009–1015.

Haranda T, Takenaka S, Sekimoto T, Nakajyo M, Takao I & Katagiri C. 2011. *Heat coma* as an indicator of resistance to environmental stress and its relationship to ocean dynamics in the sea skaters, Halobates (Heteroptera: Gerridae). *Insect Science* 18: 703–711.

Hoffmann AA. 1995 Acclimation: increasing survival at a cost. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 1–2.

Hoffmann AA, Chown SL & Clusella-Trullas S. 2013. Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: how constrained are they? *Functional Ecology* 27: 934-939.

Hoffmann AA, Sørensen JG & Loeschcke V. 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology* 28: 175-216.

Hosler JS, Burns JE & Esch HE. 2000. Flight muscle resting potential and species-specific differences in chill-coma. *Journal of Insect Physiology* 46: 621-627.

IPCC, 2013. *Cambio Climático 2013: Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*. Stocker, T. F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex y P.M. Midgley (eds.). Cambridge: Cambridge University Press.

Kalosaka K, Soumaka E, Politis N & Mintzas AC. 2009. Thermotolerance and HSP70 expression in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Journal of Insect Physiology* 55:568-573.

Klok CJ & Chown SL. 1998 Interactions between desiccation resistance, host-plant contact and the thermal biology of a leaf-dwelling sub-Antarctic caterpillar, *Embryonopsis halticella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Journal of Insect Physiology* 44: 615-628.

Klok CJ & Chown SL. 2003. Resistance to temperature extremes in sub-Antarctic weevils: interspecific variation, population differentiation and acclimation. *Biological Journal of the Linnean Society* 78: 401-414.

Krebs RA & Feder ME. 1997. Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress Chaperone*. 2: 60-71.

Krebs RA. & Feder ME. 1998. Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much? *Journal Insect Physiology* 44: 1091-1101.

Lutterschmidt WI & Hutchison VH. 1997. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1553-1560.

MacMillan HA, Williams CM, Staples JF & Sinclair, BJ. 2012. Reestablishment of ion homeostasis during chill-coma recovery in the cricket *Gryllus pennsylvanicus*. *Proceedings of National Academic Sciences* 109: 20750-20755.

Mahroof R, Zhu KY & Subramanyam BH. 2005. Changes in expression of heat shock proteins in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) in relation to developmental stage, exposure time and temperature. *Annals of the Entomological Society of America* 98:100-107.

Millán A, Velasco J, Gutiérrez-Cánovas C, Arribas P, Picazo F, Sánchez-Fernández D & Abellán P. 2011. Mediterranean saline streams in southeast Spain: What do we know? *Journal of Arid Environments* 75(12): 1352-1359.

Millán A; Sánchez-Fernández D, Abellán P; Picazo F; Carbonell JA Lobo JM & Ribera I. En prensa. Atlas de los Coleópteros Acuáticos de España Península. MAGRAMA. Madrid.

Odum, E.P. 1959. *Fundamentals of ecology*. Phyladelphia: Sounders Ed.

Pallarés S, Arribas P, Céspedes V, Millán A & Velasco J. 2012. Lethal and sublethal behavioural responses of saline water beetles to acute heat and osmotic stress. *Ecological Entomology* 37(6): 508-520.

Pallarés S, Arribas P, Bilton D, Millán A & Velasco J. En prensa. Patterns of osmotic regulation in water beetle species (*Enochrus*: Hydrophilidae and *Nebrioporus*: Dytiscidae) with differential niches on the salinity gradient. *Journal of Experimental Biology*.

Pörtner H. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132A: 739-761.

Ribera I, Schödl S & Hernando C. 1997. *Enochrus ater* (Kuwert) and *E. salomonis* (Sahlberg) (Coleoptera: Hydrophilidae), two widespread but overlooked species new to the European fauna. *Hydrobiologia* 354: 183–188.

Rinehart JP, Hayward SA & Elnitsky MA. 2006. Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 14223–14227.

Sánchez-Fernández D, Aragón P, Bilton DT & Lobo JM. 2012. Assessing the Congruence of Thermal Niche Estimations Derived from Distribution and Physiological Data. A Test Using Diving Beetles. PLoS ONE 7(10), doi:10.1371/journal.pone.0048163.

Sánchez-Fernández D, Abellán P, Picazo F, Millán A, Ribera I & Lobo, JM. 2013. Do protected areas represent species' optimal climatic conditions? *Diversity and Distributions* 19: 1407–1417.

Sánchez-Fernández D, Calosi P, Atfield A, Arribas P, Velasco J, Spicer JI, Millán A & Bilton DT. 2010. Reduced salinities compromise the thermal tolerance of hypersaline specialist diving beetles. *Physiological Entomology* 35(3): 265-273.

Singh AK, & Lakhota SC. 2000. Tissue-specific variations in the induction of Hsp70 and Hsp64 by heat shock in insects. *Cell Stress Chaperones* 5: 90–97.

Solomon JM., Rossi JM, Golic K, McGarry T, & Lindquist S. 1991. Changes in hsp70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila*. *New Biology* 3:1106–1120.

Stillman JH. 2003. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science* 301: 65.

Teixeira LAF. & Polavarapu S. 2005. Expression of heat shock protein 70 after heat stress during pupal diapause in *Rhagoletismendax* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 98: 966–972.

- Terblanche J, Klok CJ, Krafur ES & Chown SL. 2006 Phenotypic plasticity and geographic variation in thermal tolerance and water loss of the tsetse *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae): implications for distribution modelling. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 786–794.
- Terblanche JS, Hoffmann AA, Mitchell KA, Rako L, Le Roux PC & Chown, SL. 2011. Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *Journal of Experimental Biology* 214(22): 3713-3725.
- Tomanek L. 2008. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global warming: the heat shock response. *Physiological and Biochemical Zoology* 81: 709-717.
- Tomanek L, Zuzow MJ, Ivanina AV, Beniash E & Sokolova IM. 2011. Proteomic responses to elevated P_{CO2} level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* 214: 1836-1844.
- Vannier G. 1994. The thermobiological limits of some freezing tolerant insects: the supercooling and thermostupor points. *Acta Oecologica* 15: 31–42.
- Velasco J, Millán A, Hernández J, Gutiérrez C Sánchez D, Abellán P & Ruiz M. 2006. Response of biotic communities to salinity changes in a Mediterranean hypersaline stream. *Saline Systems* 12 (2): 1-15.
- Wehner R, Marsh AC & Wehner S. 1992. Desert ants on a thermal tightrope. *Nature* 357: 586–587.
- Welte MA, Tetrault JM, Dellavalle RP, & Lindquist SL. 1993. A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Current Biology* 3: 842–853.
- Wiens JJ, Graham CH, Moen DS, Smith SA & Reeder TW. 2006 Evolutionary and ecological causes of the latitudinal diversity gradient in hylid frogs: treefrog trees unearth the roots of high tropical diversity. *The American Naturalist* 168: 579-596.
- Williams SE, Shoo LP, Isaac JL, Hoffmann AA & Langham G. 2008. Towards an integrated framework for assessing the vulnerability of species to climate change. *PLoS Biology* 6: 2621-2626.
- Wilson PW, Heneghan AF & Haymet ADJ. 2003. Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. *Cryobiology* 46: 88–98.
- Woods HA & Harrison JF. 2002. Interpreting rejections of the beneficial acclimation hypothesis: when is physiological plasticity adaptive? *Evolution* 56: 1863–1866.
- Zatsepina OG, Velikodvorskaia VV, Molodtsov VB, Garbuz D, Lerman DN, Bettencourt BR, Feder ME & Evgenev MB. 2001. *Drosophila melanogaster* strain from sub-equatorial Africa has exceptional thermotolerance but decreased Hsp70 expression. *Journal Experimental Biology* 204: 1869–1881.