



Estrés fisiológico en urogallos cantábricos (*Tetrao urogallus cantabricus*) silvestres y en cautividad: variaciones temporales e implicaciones metodológicas

Jesús Martínez-Padilla^{1,*} , Alba Estrada² 

(1) Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC). Avda. Nuestra Señora de la Victoria, 16. Jaca, Huesca, España.

(2) Grupo de Biogeografía, Diversidad y Conservación. Departamento de Biología Animal. Universidad de Málaga, Málaga, España.

* Autor de correspondencia: Jesús Martínez-Padilla [j.mart@ipe.csic.es]

> Recibido el 02 de febrero de 2021 - Aceptado el 24 de marzo de 2021

Cómo citar: Martínez-Padilla, J., Estrada, A. 2021. Estrés fisiológico en urogallos cantábricos (*Tetrao urogallus cantabricus*) silvestres y en cautividad: variaciones temporales e implicaciones metodológicas. *Ecosistemas* 30(1): 2161. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2161>

Estrés fisiológico en urogallos cantábricos (*Tetrao urogallus cantabricus*) silvestres y en cautividad: variaciones temporales e implicaciones metodológicas

Resumen: El estudio de los factores ambientales que pueden explicar los niveles de estrés fisiológico en poblaciones naturales es de vital importancia para especies vulnerables, ya que puede influir en la mortalidad de los individuos y, por tanto, en la viabilidad poblacional. En este trabajo se exploran los condicionantes ambientales que pueden explicar las variaciones de estrés fisiológico medido a través de niveles de corticosterona en plumas de urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*). Se emplearon muestras recogidas de individuos en cautividad y de individuos silvestres. Las muestras recogidas de los individuos silvestres se recopilaban desde 1998 hasta 2017 y se consideraron 35 variables climáticas de temperatura y precipitación. Los análisis de repetibilidad sugirieron que los niveles de corticosterona en la combinación de plumas corporales y secundarias fueron repetibles dentro de individuos, mientras que en la combinación de plumas corporales y primarias no lo fueron, por lo que se consideraron sólo las medidas de las plumas corporales y secundarias. Los resultados indicaron que los individuos en cautividad tuvieron un menor estrés fisiológico y que, en individuos silvestres, hubo un incremento de los niveles de estrés hasta estabilizarse en los últimos años de estudio. Ninguna variable climática estuvo relacionada con los niveles de estrés fisiológico. Especulamos que la tendencia temporal en los niveles de estrés podría estar reflejando limitaciones alimenticias, quizá asociadas a cambios en la estructura o composición del hábitat o interacciones con otras especies silvestres o ganado doméstico, lo que podría explicar el menor estrés fisiológico de los individuos en cautividad. Desde el punto de vista metodológico, las plumas secundarias o corporales, independientemente del sexo, serían las preferibles para establecer un monitoreo del estrés fisiológico del urogallo en condiciones naturales o de cautividad.

Palabras clave: urogallo; cautividad; cordillera cantábrica; estrés; temperatura; precipitación

Physiological stress in wild and captive Cantabrian capercaillies (*Tetrao urogallus cantabricus*): temporal trends and methodological implications

Abstract: Determining the environmental factors that may explain the variation in physiological stress is crucial in threatened species since they can influence mortality and therefore population viability. Here we studied the climatic factors that can be associated with corticosterone levels in feathers, as proxy of physiological stress, in Cantabrian capercaillies (*Tetrao urogallus cantabricus*). We used feathers collected both from individuals in captivity and in wild conditions. Samples from wild birds were collected from 1998 to 2017 and 35 climatic variables (temperature and precipitation) were considered. Analyses of repeatability showed that the combination of body and secondary feathers had a highly repeatable corticosterone levels within individuals than body and primary feathers. By using only body and secondary feathers, captive birds had lower corticosterone levels and stress levels increased overtime but stabilized in the last few years. None of the climatic variables were related to corticosterone levels. We speculate that the observed temporal trend in stress levels might reflect access to specific food, but that such limitation can be tightly linked to other temporal changes like structure or habitat composition or interactions with other competing species for this food resource. If food limitation is a factor explaining high stress levels, it can be a plausible explanation for the lower corticosterone levels observed in captive birds compared to wild animals. From a methodological perspective, those feathers from the same individual particularly body or secondary ones, regardless of the sex, should be selected to implement a continuous monitoring of physiological stress in wild or captive capercaillies.

Keywords: capercaillie; captivity; Cantabrian mountain range; stress; temperature; precipitation

Introducción

De acuerdo a la teoría sugerida por Lochmiller (1996), niveles altos de estrés fisiológico en los individuos pueden derivar en efectos inmunosupresivos, reduciendo la capacidad de resistencia frente a patógenos. Una menor resistencia de los individuos a patógenos, puede derivar en una menor tasa de reproducción o disminución de las tasas de supervivencia de los individuos, lo que podría explicar parcialmente el declive poblacional de algunas especies. Por tanto, el estudio de los factores ambientales que pueden explicar los niveles de estrés fisiológico en poblaciones naturales es de vital importancia para especies vulnerables.

Los glucocorticoides son de particular interés para examinar cómo los individuos responden frente a variaciones ambientales, especialmente porque son los principales mediadores de la alostasis de un organismo para enfrentarse a los cambios ambientales (Sapolsky et al. 2000; McEwen y Wingfield 2003; Landys et al. 2006). La corticosterona es el principal glucocorticoide en aves, y se ha empleado en múltiples ocasiones para poder determinar la asociación entre la condición física individual y las variables ambientales del lugar en el que se desarrolla o localiza la población (Treen et al. 2015). Sin embargo, la cuantificación de los niveles de corticosterona en sangre es problemática especialmente en aves en libertad, ya que los niveles de corticosterona medidos tanto en sangre como en heces se incrementan después de la captura (Romero y Romero 2002). Sin embargo, se puede estudiar el nivel de estrés fisiológico con niveles de corticosterona en plumas, que ofrece información del nivel de estrés ambiental integrando una medida tanto de los niveles basales como de picos de corticosterona durante el crecimiento de la pluma (Bortolotti et al. 2008). Este método es de reciente aparición, pero tiene la ventaja de no ser intrusivo, ya que no requiere de la captura del individuo, y por tanto no está sujeto a fuentes de variación debido a su captura, y además es estable a lo largo de los años al ser depositado en la pluma. Por tanto, la estimación de los niveles de estrés fisiológico en plumas puede ser un buen indicador de estrés fisiológico en aves en libertad. Esta técnica ya se ha utilizado en múltiples estudios de aves, también en galliformes como el lagópodo escocés (Bortolotti et al. 2009; Mougeot et al. 2010; Wenzel et al. 2013; Mougeot et al. 2016), en rapaces como el ratonero común (Martínez-Padilla et al. 2013), en migradores árticos (Legagneux et al. 2014) o en aves marinas (Will et al. 2014; Fairhurst et al. 2017) que ratifican que mayores niveles de corticosterona en plumas son indicativos de un mayor estrés ambiental, bien debido a mayores niveles de parásitos o dietas deficitarias. Debido a los efectos inmunosupresivos de los niveles de corticosterona, los individuos que mantienen niveles altos de corticosterona de modo crónico, pueden reducir su supervivencia y reproducción (Blas et al. 2007; Koren et al. 2012), influyendo por tanto en la dinámica poblacional.

Las condiciones ambientales en las que viven los individuos de diferentes poblaciones hacen que éstos tengan respuestas fisiológicas (Martínez-Padilla et al. 2010), comportamentales (Mougeot et al. 2005) y evolutivas adaptadas a los lugares en los que habitan (Martínez-Padilla et al. 2017). Por tanto, es fundamental comprender los condicionantes ambientales que las especies, poblaciones o incluso individuos experimentan, que nos ayuden a determinar los mecanismos fisiológicos que podrían explicar declives poblacionales en especies vulnerables. Así, conociendo las condiciones ambientales de las distintas poblaciones, se podrían asociar éstas a variaciones (o variables) morfológicas, comportamentales o de cualquier otro tipo que se consideren. Específicamente, se ha observado que condiciones climáticas adversas pueden tener un efecto sobre los niveles de corticosterona en pluma en individuos de diferentes poblaciones (Treen et al. 2015), quizá como reflejo de condiciones alimenticias adversas experimentadas durante el crecimiento de las plumas y que eventualmente pueden explicar la mortalidad de los individuos con mayores niveles de estrés fisiológico medido a través de los niveles de corticosterona en plumas (Koren et al. 2012).

En este estudio, se pretende estudiar el efecto de las condiciones ambientales en los niveles de corticosterona en pluma de diferentes localidades e individuos de urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*). El urogallo cantábrico se encuentra en un claro retroceso tanto en sus efectivos poblacionales como en sus áreas de distribución en la Cordillera cantábrica (Obeso 2004; Pollo et al. 2005; Robles et al. 2006; Bañuelos y Quevedo 2008), siendo actualmente una especie catalogada como en peligro crítico de extinción. Las causas sugeridas para explicar el declive poblacional del urogallo cantábrico tienen una naturaleza multifactorial, entre las que destacan la degradación del hábitat tanto a nivel local como global (Quevedo et al. 2006; Bañuelos et al. 2008) y la caza (Rodríguez-Muñoz et al. 2015), que han dado lugar a una baja diversidad genética (Rodríguez-Muñoz et al. 2007; Alda et al. 2011) y escaso flujo génico entre las poblaciones cantábricas (Morán-Luis et al. 2014). Sin embargo, el efecto de los cambios climáticos observados en las últimas décadas, especialmente en lo referente al incremento de las temperaturas, ha sido poco estudiado en la dinámica poblacional de la especie. Considerando que el incremento de las condiciones climáticas adversas puede incrementar los niveles de estrés fisiológico (Treen et al. 2015), y unos mayores niveles de estrés pueden afectar a la supervivencia de los individuos (Koren et al. 2012), es reseñable que la influencia de variables climáticas no se haya estudiado en relación a los niveles de estrés en aves silvestres, especialmente en especies amenazadas.

El objetivo de este estudio es profundizar en los mecanismos que podrían explicar el declive poblacional del urogallo cantábrico en el Principado de Asturias a través de la potencial relación entre variables climáticas, especialmente de temperatura y precipitación, en los niveles de estrés ambiental cuantificado a través de los niveles de corticosterona en plumas.

Para ello, se estableció un protocolo de muestras de individuos en cautividad para evaluar la repetibilidad dentro de un mismo individuo de los niveles de corticosterona entre tipos de pluma. Este análisis ayudaría a poder evaluar la fiabilidad de los niveles de corticosterona medidos en campo seleccionando las plumas más adecuadas. Además, se exploró si las condiciones de temperatura y precipitación están asociadas a los niveles de corticosterona en plumas. Asumiendo los requerimientos ambientales del urogallo cantábrico, es esperable que unas condiciones climáticas adversas puedan incrementar los niveles de estrés de la especie.

Material y métodos

Área de estudio

El área de estudio considerada ha sido el rango de distribución histórico de la especie según se recoge en el Proyecto LIFE del urogallo cantábrico (<http://lifeurogallo.es>). Debido a que sólo disponemos de datos de presencia del Principado de Asturias, se ha considerado sólo el rango histórico de distribución dentro de esta provincia (Fig. 1). El área de estudio se ha dividido en cuadrículas UTM de 1km² para realizar los análisis.

Metodología de muestreo

Las plumas analizadas en este estudio fueron recogidas durante los transectos y muestreos regulares que el Principado de Asturias, bien por guardería o por técnicos contratados, ha ido recogiendo desde el año 1994 hasta el año 2017. Todas las plumas recolectadas en esos años pertenecen a un total de 64 individuos, independientemente de que procedieran de individuos silvestres o cautivos. Se analizaron 68 plumas para individuos en libertad (Tabla 1). No se analizaron más muestras de las recolectadas por el Principado Asturias porque o bien estaban en mal estado de conservación o no se conocían las coordenadas de donde se recogieron. Todas las muestras que procedían de ejemplares en libertad fueron de 27 localizaciones diferentes de la población asturiana de urogallo, considerando las cuadrículas de 1x1 km como área de localización. En algunas de estas muestras había más de un tipo de pluma (Tabla 2), que fueron analizadas de manera independiente.

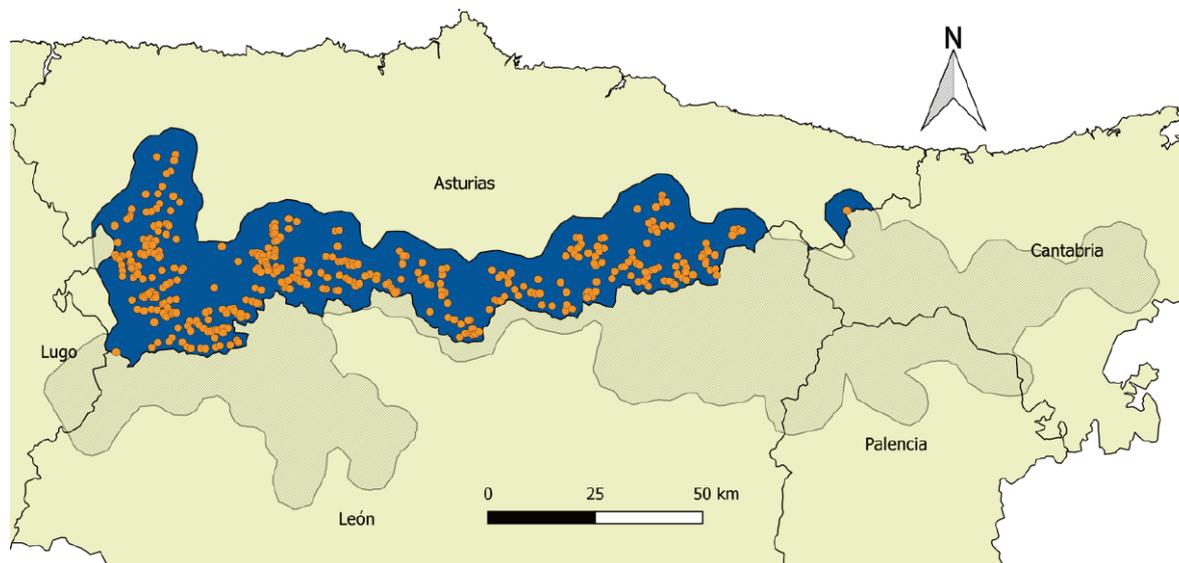


Figura 1. Distribución histórica del urogallo cantábrico (gris) y área de estudio (azul; <http://lifeurogallo.es>). Los puntos naranjas indican los cantaderos (activos o no) de la especie durante el período de estudio según la Consejería de Medio Ambiente del Principado de Asturias.

Figure 1. Historic (grey) and study area (dark blue) of the Cantabrian capercaillie (<http://lifeurogallo.es>). Orange points show the active or abandoned leks during the study period according to Consejería de Medio Ambiente del Principado de Asturias.

Tabla 1. Número de plumas analizadas por año procedentes de individuos silvestres. Se indica el número de plumas por año independientemente del número de individuos identificados en condiciones naturales.

Table 1. Number of feathers sampled each year from wild capercaillies.

Año	1998	2004	2011	2012	2013	2015	2016	2017	Total
Número de plumas	5	2	27	1	1	1	12	19	68

Tabla 2. Tamaño de muestra de los distintos tipos de plumas a las que se les analizó la concentración de corticosterona.

Table 2. Sample size for each type of feather from which corticosterone was analyzed.

Tipo de pluma	Nº de plumas
Primarias	8
Secundarias	11
Cola	5
Corporal	62
Total	86

Además, se analizaron un total de 18 plumas de urogallo procedentes de 7 individuos del centro de cría en cautividad, fundamentalmente para establecer la repetibilidad intra-individual de las medidas de corticosterona en plumas (ver sección abajo para más detalles).

Variabes consideradas

Se consideraron variables climáticas (Tabla 3) descriptoras del periodo 1971-2000 (AEMet 2011). La resolución de las variables era de 1 km². Para proceder a los análisis, se redujo el tamaño de píxel a 100 m x 100 m sin modificar sus valores. Para las distintas variables se calculó el promedio de los valores de los píxeles que englobaba cada cuadrícula UTM de 1km² en los que se detectaron las muestras de plumas recogidas. El sistema de coordenadas utilizado en todos los casos fue el ETRS89 - Zona UTM 30N y todas las variables fueron procesadas con el software QGIS.

Debido a la alta colinealidad de muchas de las variables climáticas, se procedió a la eliminación de aquellas variables con un índice de colinealidad alto. En concreto se usó el índice VIF (*Variation Inflation Factor* de sus siglas en inglés). Se eliminó secuencialmente la variable con mayor VIF hasta que el conjunto de variables tuviera un VIF menor a 5. Este procedimiento se realizó por separado para las variables de precipitación y de temperatura. Posteriormente, se comprobó el VIF de las restantes variables en conjunto.

El conjunto completo de variables ambientales se detalla en la Tabla 3, así como el conjunto final seleccionado para los análisis.

Los valores de VIF se calcularon con la función *multicol* del paquete de R *fuzzySim* (Barbosa 2015; Barbosa 2018). Tras este cribado, de un total de 35 variables climáticas, sólo 5 variables fueron incluidas en los modelos.

Tabla 3. Variables climáticas inicialmente consideradas. Se indica el valor de colinealidad para cada variable (VIF). La columna “análisis” indica de su inclusión (1) o no (0) de la variable en los análisis posteriores. Sólo se consideraron aquellas variables que tuvieron un VIF<5 (ver métodos). El VIF se realizó por separado para las variables de precipitación y temperatura. Los valores VIF de las variables excluidas son los que la variable tenía antes de ser eliminada del conjunto de variables. Los valores VIF de las variables seleccionadas son los obtenidos con el conjunto final de variables seleccionadas.

Table 3. Climatic variables considered. Variation Inflation Factors (VIFs) are shown for each variable. Column “Análisis” refers to those variables that were included (1) or not (0). Only variables that had a VIF<5 were considered further in the analyses (see methods for more details). The VIF procedure was performed separately for precipitation and temperature variables. VIF values of excluded variables are those that the variable had before being removed from the set of variables. VIF values of selected variables are those obtained with the final set of selected variables.

Grupo predictor	Variable	Código	VIF	Análisis
Variables seleccionadas (precipitación y temperatura)	Precipitación media primavera	P_prima	3.745	1
	Número medio días precipitación ≥ 30mm verano	Dp30_vera	2.200	1
	Temperatura media máximas enero	Tx_enero	1.277	1
	Número medio anual días temperatura mínima ≥ 20°C	Dtn20_anua	2.925	1
	Número medio anual días temperatura máxima ≥ 25°C	Dtx25_anua	3.664	1
Precipitación	Precipitación media invierno	P_invi	Inf	0
	Precipitación media anual	P_anual	Inf	0
	Número medio días precipitación ≥ 30mm otoño	Dp30_oto	6.751.964	0
	Número medio anual días precipitación ≥30mm	Dp30_anual	2.665.026	0
	Precipitación media otoño	P_oto	256.222	0
	Número medio días precipitación ≥ 30mm invierno	Dp30_inv	189.061	0
	Número medio días precipitación ≥ 30mm primavera	Dp30_prima	101.811	0
	Precipitación media verano	P_vera	6.341	0
Temperatura	Temperatura media anual	T_anual	Inf	0
	Temperatura media invierno	T_inv	Inf	0
	Temperatura media julio	T_julio	Inf	0
	Temperatura media mínimas julio	Tn_julio	65.196.483.000	0
	Temperatura media anual máximas	Tx_anual	4.163.349.000	0
	Temperatura media mínimas invierno	Tn_invi	719.091.000	0
	Temperatura media mínimas verano	Tn_vera	180.948.300	0
	Temperatura media máximas verano	Tx_vera	64.208.670	0
	Temperatura media mínimas primavera	Tn_prima	24.028.860	0
	Temperatura media anual mínimas	Tn_anual	20.674.830	0
	Temperatura media mínimas otoño	Tn_oto	7.767.487	0
	Temperatura media otoño	T_oto	6.973.329	0
	Temperatura media máximas otoño	Tx_oto	1.109.267	0
	Temperatura media máximas julio	Tx_julio	592.460	0
	Temperatura media primavera	T_prima	301.906	0
	Temperatura media máximas invierno	Tx_inv	288.133	0
	Temperatura media máximas primavera	Tx_prima	225.397	0
	Temperatura media mínimas enero	Tn_enero	149.141	0
	Temperatura media enero	T_enero	49.245	0
	Temperatura media verano	T_vera	22.510	0
Número medio anual días temperatura mínima ≤ 0°C	Dtn0_anual	16.220	0	
Rango de temperatura media (julio – enero)	RangoT	9.191	0	

Análisis de corticosterona en plumas

Para los análisis de los niveles de corticosterona en las plumas de urogallo cantábrico se siguió el protocolo de extracción de esteroides en plumas (Bortolotti et al. 2008). Las plumas fueron clasificadas según su morfología en primarias, secundarias, cola o corporales. Posteriormente se eliminó el cálamo y fueron cortadas con tijeras en pequeños trozos (<5mm) incluyendo raquis, barbas y barbillas, hasta conseguir una cantidad de muestra no inferior a 30 mg (siempre y cuando hubiera suficiente cantidad de pluma). En las plumas de mayor tamaño, p. ej., primarias y plumas de la cola, se desecharon también los dos centímetros inferiores de raquis, con el fin de eliminar la zona donde éste era más grueso. Siempre que fue posible se extrajo la muestra de una sola pluma. Sin embargo, en algunos casos una sola pluma no alcanzaba el umbral mínimo de peso a priori seleccionado (30 mg). En esos casos se alcanzaron los 30 mg con material de otra pluma del mismo individuo, siempre y cuando hubiera más de una pluma del mismo tipo. Las muestras fueron pesadas en tubos de ensayo en una balanza analítica de precisión (modelo Sartorius).

Posteriormente se añadieron 6 ml de metanol y se introdujeron durante 30 minutos en un baño ultrasónico. A continuación, los tubos se taparon y se introdujeron en un baño de agua a 50 °C con agitación continua durante aproximadamente 19 horas. Entonces, las muestras se filtraron con un filtro jeringa de nailon con una luz de 0.45 µ. Además, los tubos de ensayo en los que estaban las plumas cortadas se lavaron con otros 2 ml de metanol y se filtraron, añadiéndolos al resto. Los tubos de ensayo con el fluido resultante se introdujeron en una rejilla de tubos a una temperatura de 50 °C bajo una corriente de nitrógeno hasta su evaporación. Finalmente, las muestras se introdujeron en un kit comercial de corticosterona ELISAs (DRG, Alemania) y se midió la densidad óptica de las distintas muestras en un espectrofotómetro de placa (BioTek, Estados Unidos).

La fiabilidad de los resultados obtenidos en relación a los niveles de corticosterona en pluma está determinada por la cantidad de pluma (peso) que pudo incluirse en los análisis. El nivel mínimo de confianza de detección fiable de corticosterona, basado en el análisis de laboratorio, fue de un peso mínimo de muestra de 30mg. Las muestras con un peso inferior no fueron incluidas en los análisis, reduciéndose el tamaño muestral a 75 plumas. Todos los análisis y resultados que se describen en las secciones posteriores en relación a los niveles de corticosterona se refieren a este subconjunto de muestras.

Análisis estadísticos

Todos los análisis se realizaron con el software R, versión 4.0.2 (R Core Team 2020). La repetibilidad de los niveles de corticosterona se analizó utilizando el paquete "rptR" (Stoffel et al. 2017) para variables gaussianas. El cálculo de los intervalos de confianza se obtuvo tras un *bootstrap* paramétrico de 1000 repeticiones al 95%. Los análisis de repetibilidad se hicieron únicamente con las plumas obtenidas de los individuos en cautividad.

Los modelos restantes empleados fueron modelos lineales mixtos generales. En todos ellos se usó la concentración de corticosterona en plumas como variable dependiente y se descartaron las muestras del mismo individuo que no alcanzaron los 30mg. Se realizaron 3 modelos estadísticos. El primero para determinar la relación entre el estatus de cautividad o libertad en los niveles de estrés. El segundo para explorar las tendencias temporales en los niveles de estrés y, el tercero, para determinar si los factores ambientales podrían explicar esta variación. Tanto en el segundo como en el tercer modelo, sólo se utilizaron los valores de corticosterona estimados de muestras procedentes de animales en libertad.

En el primero modelo, se usó como variable explicativa el factor que codificaba si la muestra procedía de individuos en cautividad o no. Además, se incluyó el sexo y su interacción con la variable origen (cautividad o libertad). Para evitar problemas de no independencia de las muestras procedentes de individuos en libertad de las mismas áreas, se consideró el individuo como variable aleatoria,

ya que en algunas ocasiones se pudo asumir que varias plumas pertenecían al mismo individuo.

En un segundo modelo, exploramos la tendencia temporal y el potencial efecto del sexo como variables fijas explicativas de los niveles de corticosterona. Para ello, se incluyó como variable explicativa el sexo (macho o hembra), y el año como variable continua. En el caso del año, se consideró tanto la relación simple lineal como cuadrática no lineal con la variable dependiente. Para poder controlar por el posible efecto intra-anual en la variación de los niveles de corticosterona, se consideró el mes en el que se tomaron las muestras como variable explicativa. Para evitar problemas de no independencia de las muestras procedentes de las mismas áreas, se consideró el área de procedencia y el individuo como variables aleatorias.

Una vez analizadas las variables no ambientales potencialmente explicativas de la varianza de los niveles de corticosterona en pluma, se analizó el nivel de significación de las variables climáticas para explicar la varianza de la variable dependiente. En este modelo, se incluyeron las variables climáticas como variables explicativas, además de su formulación cuadrática para explorar relaciones no lineales, junto con el año en su formulación cuadrática y lineal, el sexo y el mes de recogida de la muestra. El área e individuo se consideraron variables aleatorias.

Resultados

Los niveles medios de corticosterona fueron 4.72 ± 0.16 pg/mg ($n=75$, media \pm error estándar). La repetibilidad de los niveles de corticosterona sólo se pudo calcular en dos grupos de plumas debido al bajo número de individuos de los que se tenían plumas de diferentes partes del cuerpo (ver **Tabla 2** y **3**). Se estudió la repetibilidad de los niveles de corticosterona para las plumas corporales y primarias ($n=5$, **Tabla 4**), por un lado, y corporales y secundarias por otro ($n=10$, **Tabla 4**).

La repetibilidad de las medidas de corticosterona para plumas de tipo corporales y secundarias fue 0.799 ± 0.15 (media \pm error estándar, Intervalo de Confianza (IC): 0.366, 0.945). La repetibilidad de los niveles de corticosterona intra-individual entre plumas primarias y corporales fue de 0.143 ± 0.275 (IC: 0, 0.834). Estos resultados sugerirían que tanto las plumas corporales como las secundarias serían repetibles dentro de individuos y podrían ser usadas indistintamente para obtener los niveles medios de corticosterona de una población. Por tanto, los análisis siguientes sólo consideraron los valores de corticosterona en pluma que procedían de plumas secundarias y corporales.

Los niveles de corticosterona no estuvieron asociados al sexo (estimador: 0.156 ± 0.371 , $t = 0.422$, $p = 0.675$). Sin embargo, sí se obtuvieron diferencias en los niveles de corticosterona estadísticamente significativas entre individuos que procedían de condiciones en cautividad o en libertad (estimador: 1.470 ± 0.696 , $t = 2.110$, $p = 0.043$; **Fig. 2**), aunque no en la interacción con el sexo (interacción sexo*cautividad: estimador 0.086 ± 1.446 , $t=0.061$, $p = 0.951$). Específicamente, los individuos que procedían de condiciones naturales presentaron unos niveles más elevados de corticosterona en pluma que los que estaban en condiciones de cautividad (cautividad: 3.757 ± 0.206 ; libertad: 4.996 ± 0.187 ; **Fig. 2**).

Considerando únicamente las muestras recogidas de individuos en libertad, cuando exploramos la tendencia temporal de los niveles de corticosterona se observó que los niveles de corticosterona en pluma variaban de un modo no lineal con el tiempo (término simple: estimador = -0.193 ± 0.314 , $t = -0.164$, $p = 0.543$; término cuadrático: estimador = -0.335 ± 0.148 , $t = -2.260$, $p = 0.029$; **Fig. 3**). Específicamente, se observa una tendencia estadísticamente significativa cuadrática negativa, en la que ha habido un incremento en los años iniciales hasta un máximo en aproximadamente 2011, para mantenerse o decrecer levemente al final del período de estudio. No se observó ninguna relación estadísticamente significativa de las variables de temperatura o precipitación consideradas en los niveles de corticosterona en pluma (**Tabla 5**).

Tabla 4. Tipos y cantidad de plumas obtenidas para el mismo individuo en cautividad con objeto de establecer la repetibilidad de los niveles de corticosterona en diferentes plumas en el mismo individuo.

Table 4. Sample size of feathers of the same individual to calculate within-individual repeatability of corticosterone levels in relation to the type of feathers considered.

	Secundaria	Terciaria	Cobertora	Cola	Corporales
Primarias	3	0	1	1	5
Secundarias		0	0	0	10
Terciaria			0	0	0
Cobertora				0	0
Cola					0

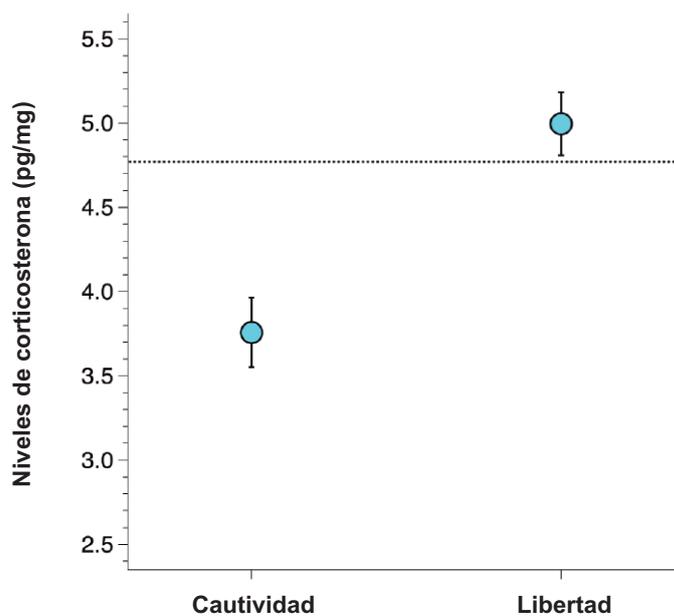


Figura 2. Niveles de corticosterona en pluma en relación a su procedencia (media \pm error estándar). Se muestra con una línea de puntos el nivel medio (4.72 ± 0.16) de corticosterona en pluma para las muestras analizadas sólo de los tipos repetibles (corporales y secundarias – ver [métodos](#)).

Figure 2. Corticosterone levels from wild or captive individuals (mean \pm standard error). Dotted line represents corticosterone mean (4.72 ± 0.16) from body and secondary feathers (see [methods](#)).

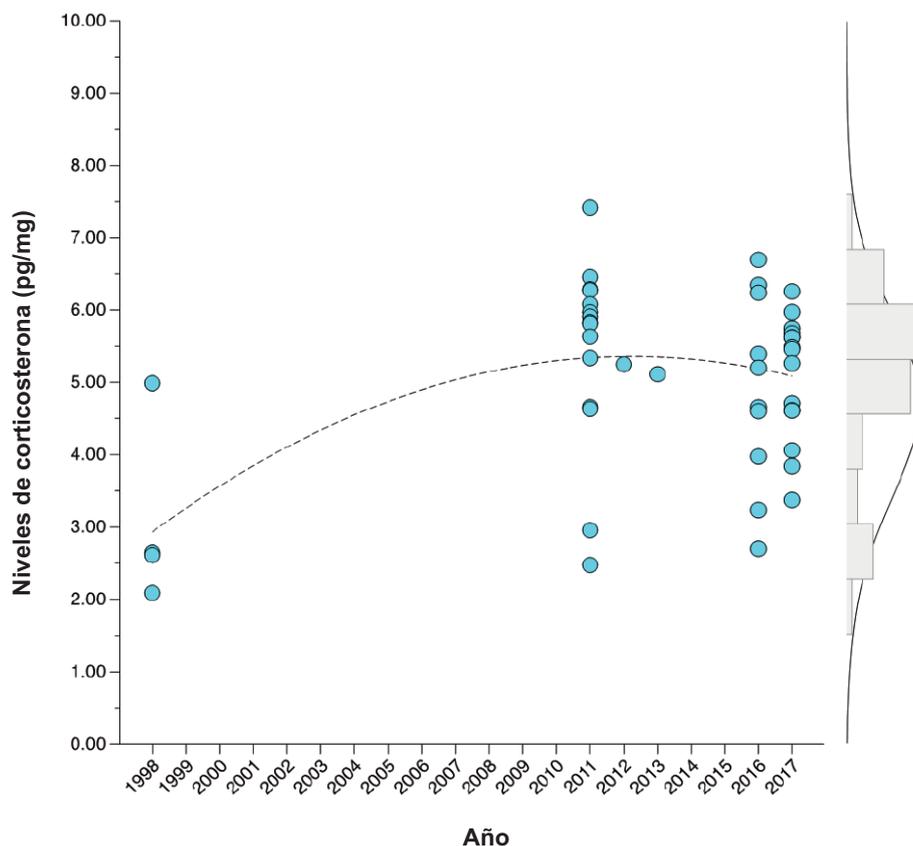


Figura 3. Niveles de corticosterona en pluma de urogallo cantábrico y año de muestreo. En el panel derecho se muestra el histograma de la variable dependiente con la curva de su distribución ($\bar{x} = 4.77$, $sd = 1.27$). Nótese que esta gráfica sólo incluye valores de corticosterona de plumas corporales y secundarias que pesaron más de 30mg (ver métodos), por tanto, las muestras detalladas en la [Tabla 1](#) y los representados en esta figura pueden no coincidir.

Figure 3. Temporal trend of corticosterone levels of feathers of Cantabrian capercaillies. The panel on the right shows the frequency distribution of the corticosterone levels ($\bar{x} = 4.775$, $sd = 1.27$). Note that this relationship only considers corticosterone levels from body and secondary feathers that weighted more than 30mg, therefore numbers from [Table 1](#) and those shown in this figure might not be the same.

Tabla 5. Modelo lineal mixto general que explora la influencia temporal y ambiental en los niveles de corticosterona en pluma de urogallo cantábrico en condiciones en libertad. El significado de las variables fijas se detalla en la [tabla 1](#).

Table 5. General Linear Mixed Model that explores the temporal and environmental trend in corticosterone levels of feathers of wild Cantabrian capercaillies. The meaning of each fixed variable is detailed in [Table 1](#).

VARIABLES FIJAS	ESTIMADOR	ERROR ESTÁNDAR	t value	P
Intercepto	5.419	0.240	22.526	< 0.001
Año	-0.332	0.345	-0.96	0.366
Año²	-0.410	0.159	-2.574	0.029
Mes	-0.090	0.250	-0.363	0.719
P_prima	0.006	0.008	0.705	0.492
Dtn20_anua	-2.636	3.340	-0.789	0.446
Dp30_vera	1.601	1.982	0.807	0.435
Tx_enero	-0.299	0.288	-1.039	0.311
Dtx25_anua	0.017	0.010	1.616	0.139

VARIABLE ALEATORIA	VARIANZA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Área	0.263	0.554
Individuo	0.307	0.554
Residual	0.567	0.753

Discusión

Los niveles de corticosterona en pluma son un indicador del estrés fisiológico en aves en el momento del crecimiento de la pluma. Desde el punto de vista metodológico, los resultados sugieren que las muestras obtenidas de un mismo individuo de diferentes plumas son repetibles, pero no entre todos los tipos de plumas. Además, nuestros resultados sugieren que los individuos en cautividad tienen menores niveles de estrés fisiológico que los individuos en libertad. Considerando únicamente muestras tomadas de individuos silvestres, se observa un incremento temporal en los niveles de corticosterona en pluma hasta estabilizarse en los últimos años del muestreo. Finalmente, los niveles de corticosterona no mostraron variaciones asociadas a las condiciones de precipitación y temperatura a lo largo del período de estudio.

Entre las causas que se han descrito en la literatura, el incremento en los niveles de estrés pueden deberse a variaciones en otros factores a lo largo de los años, entre los que se podrían encontrar un incremento de los predadores (Cockrem y Silverin 2002; Bennett et al. 2016), parásitos (Mougeot et al. 2016) o molestias humanas, pero que requeriría un estudio adicional y específico para determinar la fuente de variación de los niveles de estrés durante esos años. Podría sugerirse que el incremento de la corticosterona a lo largo de los años pueda deberse al deterioro temporal de las plumas más antiguas, reduciendo los niveles detectados. Sin embargo, estudios que han analizado corticosterona en plumas durante un período de más de 150 años (1859-2012), no encontraron diferencias significativas en los niveles de estrés a lo largo del período de estudio (Fairhurst et al. 2015). Por tanto, es probable que el incremento en los niveles de corticosterona en pluma a lo largo del tiempo se deba a otras razones de tipo comportamental o ecológico.

Los determinantes ecológicos que expliquen la variación en los niveles de corticosterona en pluma de urogallo cantábrico pueden ser muy variados. En este trabajo hemos considerado variables relacionadas con la temperatura y la precipitación y ninguna de las variables usadas sugieren que estén asociadas a los niveles de corticosterona. Por tanto, no existe certeza para afirmar que el declive poblacional potencialmente derivado de un elevado nivel de estrés fisiológico pueda estar asociado a una variación en las temperaturas o precipitaciones. No obstante, no podemos descartar de un modo taxativo que estas variables puedan tener un papel en los niveles de estrés fisiológico del urogallo porque tanto la variación espacial de las muestras recogidas como el número de muestras en cada localidad son bajas. Estas variables de precipitación y temperatura no estuvieron asociadas de un modo estadísticamente significativo en el mismo modelo en el que se detectó que el año tenía una relación, no lineal, con los niveles de estrés fisiológico. Esto puede indicar que hay variaciones interanuales ambientales que no han podido ser capturadas por las variables ambientales consideradas, que recogen valores medios de un período de 30 años. Hay múltiples variables que podrían haber sufrido un cambio interanual en el período de estudio en el que se acota este trabajo y que podrían derivar en unos mayores niveles de estrés fisiológico. El acceso a una buena alimentación o las cargas parasitarias pueden ser potenciales variables que pudieran explicar el incremento del estrés fisiológico en los últimos años. Existe poca información sobre las cargas parasitarias en urogallos cantábricos, pero los datos existentes no parecen apuntar a que esta pudiera ser una causa de mayor estrés fisiológico (Obeso et al. 2000; Millán et al. 2008). Una dieta deficitaria podría tener un fuerte impacto en los niveles de estrés fisiológico (Treen et al. 2015) y podría ser un factor a considerar en la cordillera cantábrica, en especial el acceso a algunas especies como el arándano (*Vaccinium myrtillus*) durante todo el año (Rodríguez y Obeso 2000; Blanco-Fontao et al. 2010), pero especialmente en otoño, durante la muda, que podría reflejarse en unos mayores niveles de estrés fisiológico. Esta limitación al acceso a las arandaneras podría ser importante no sólo para la adquisición del fruto *per se*, sino también por su papel de resguardo (Storch 1994; Wegge et al. 2005). No obstante, limitaciones en el acceso a recursos alimenticios concretos pueden reflejar no sólo

la falta del alimento u otros beneficios, sino estar asociado a una enorme variedad de factores, desde la alteración del hábitat, molestias humanas o interacciones con otras especies por el espacio, como pueden ser los ciervos, jabalí o el ganado doméstico extensivo (Tarjuelo et al. 2015). Si una dieta inadecuada fuera el factor determinante de un mayor estrés fisiológico, podría ser una explicación plausible de las diferencias en los niveles de estrés entre los individuos en cautividad y en libertad. Así, el menor nivel de estrés de los individuos en cautividad podría ser explicado por una mejor alimentación, programada y elaborada en función de los requerimientos alimenticios específicos de la especie (Balsera, R. comunicación personal). No obstante, la explicación de la variación en los niveles de estrés es probablemente multifactorial y no asignada a un único factor. Otros factores como la abundancia de predadores en condiciones naturales, inexistentes en la cría en cautividad, así como molestias humanas derivadas de las actividades cinegéticas o deportivas, podrían ser potenciales mecanismos a explicar este patrón. Independientemente del factor que cause este menor nivel de estrés en los urogallos cautivos, es reseñable que la cría en cautividad no tiene un efecto negativo sobre los niveles de estrés medidos a través de corticosterona en pluma. El objetivo de este trabajo queda distante de poder clarificar la importancia relativa de estos factores, ya que debería existir un seguimiento interanual de todos ellos para ver si alguna variable explica mayor varianza que el año en los niveles de estrés fisiológico en el urogallo cantábrico.

Desde un punto de vista metodológico, es importante reseñar varios aspectos. El primero, que los niveles de corticosterona en plumas de urogallo no estuvieron influidos por el sexo de los individuos. Por tanto, las plumas de ambos sexos podrían ser representativas de los niveles de estrés fisiológico en una zona determinada. El segundo aspecto, es que los niveles de estrés fisiológico no estuvieron asociados al mes de obtención de la muestra. Este resultado es esperable ya que los niveles de corticosterona analizados en plumas reflejan el estrés fisiológico en el momento de crecimiento de la pluma, lo que indica que las muestras proceden del momento de la muda, independientemente de cuándo se recogieron. Esta ausencia de influencia es un apoyo indirecto sobre la estabilidad y fiabilidad de los niveles de corticosterona obtenidos. Por último, a pesar de la baja muestra de plumas de diferentes partes del cuerpo para el mismo individuo, se ha podido comprobar que las plumas corporales y secundarias son igualmente válidas para estimar los niveles de corticosterona en pluma de distintas poblaciones o individuos. Se recomienda, por tanto, centrar los esfuerzos en aumentar el tamaño de muestras de estos dos tipos de plumas con el fin de poder llevar a cabo estudios más detallados sobre los niveles de estrés y sus causas en el total de la población. No obstante, sería recomendable no desechar plumas diferentes que pudieran ser asignadas al mismo individuo para poder analizar la repetibilidad de las mismas, ya que las muestras de plumas de un mismo individuo analizadas en este trabajo han sido escasas. Todo ello, indicaría que el seguimiento del estrés fisiológico de la especie a nivel temporal y espacial podría hacerse con plumas de individuos del mismo sexo, independientemente del mes en el que se obtuvieron, pero con preferencia por plumas corporales o secundarias.

Conclusiones

El estrés fisiológico inferido a través de los niveles de corticosterona en pluma puede ser un indicador de las condiciones ambientales experimentadas por las aves en libertad. Sin embargo, la determinación de los factores concretos que pudieran explicar la variación espacial y temporal del estrés fisiológico en condiciones naturales requiere del diseño y estudio de las variables ambientales potencialmente implicadas, además del análisis de las muestras obtenidas. En este estudio se ha detectado un incremento temporal desde 1998 a 2017 de los niveles de estrés fisiológico hasta su estabilización en los últimos años, desde aproximadamente 2011. Futuros estudios podrían determinar si alguna variable ambiental pudiera explicar esta tendencia temporal, de las que aquellas aso-

ciadas a la temperatura y precipitación podrían ser descartadas. Metodológicamente, plumas de individuos del mismo sexo y secundarias o corporales serían las preferibles para establecer un monitoreo del estrés fisiológico del urogallo en condiciones naturales o de cautividad. Finalmente, es destacable el menor nivel de corticosterona en plumas de urogallos en cautividad en relación a los urogallos en libertad, lo que indica un menor estrés ambiental experimentado en los urogallos cautivos.

Contribución de los autores

Jesús Martínez-Padilla: Conceptualización; Gestión de datos; Análisis estadísticos; Fondos; Metodología y Escritura del texto. Alba Estrada: Gestión de datos; Metodología y Escritura del texto.

Agradecimientos

Este trabajo no se podría haber desarrollado sin la colaboración del personal coordinado por Víctor M. Vázquez y Ramón Balsera, de la Conserjería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales del Principado de Asturias. Durante la recogida y análisis de muestras, JM-P disfrutó de un contrato de investigación financiado por el Principado de Asturias en la Unidad Mixta de Investigación y Biodiversidad (UMIB – Principado de Asturias, Universidad de Oviedo y CSIC). Además, este trabajo fue financiado por el Principado de Asturias (SEP/610/14/2017, cofinanciado por el programa FEADER). Durante el período de escritura del proyecto, J.M-P estuvo financiado por ARAID y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-104835GB-I00).

Referencias

- AEMet 2011. *Iberian climate atlas. Air temperature and precipitation (1971-2000)*, Agencia Estatal de Meteorología. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, España.
- Alda, F., Sastre, P., De La Cruz-Cardiel, P.J., Doadrio, I. 2011. Population genetics of the endangered Cantabrian capercaillie in northern Spain. *Animal Conservation* 14: 249-260.
- Bañuelos, M.J., Quevedo, M. 2008. Update of the situation of the Cantabrian capercaillie *Tetrao urogallus cantabricus*: an ongoing decline. *Grouse News* 25: 5-7.
- Bañuelos, M.-J., Quevedo, M., Obeso, J.-R. 2008. Habitat partitioning in endangered Cantabrian capercaillie *Tetrao urogallus cantabricus*. *Journal of Ornithology* 149: 245-252.
- Barbosa, A.M. 2015. fuzzySim: applying fuzzy logic to binary similarity indices in ecology. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(7), 853–858
- Barbosa, A.M. 2018. fuzzySim: Fuzzy Similarity in Species Distributions. R package version 1.8.3/r101. <https://R-Forge.R-project.org/projects/fuzzy-sim/>
- Bennett, A.M., Longhi, J.N., Chin, E.H., Burness, G., Kerr, L.R., Murray, D.L. 2016. Acute changes in whole body corticosterone in response to perceived predation risk: A mechanism for anti-predator behavior in anurans? *General and Comparative Endocrinology* 229: 62-66.
- Blanco-Fontao, B., Fernández-Gil, A., Obeso, J.R., Quevedo, M. 2010. Diet and habitat selection in Cantabrian Capercaillie (*Tetrao urogallus cantabricus*): ecological differentiation of a rear-edge population. *Journal of Ornithology* 151: 269-277.
- Blas, J., Bortolotti, G.R., Tella, J.L., Baos, R., Marchant, T.A. 2007. Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 8880-8884.
- Bortolotti, G.R., Marchant, T.A., Blas, J., German, T. 2008. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology* 22: 494-500.
- Bortolotti, G.R., Mougeot, F., Martínez-Padilla, J., Webster, L.M.I., Pierny, S.B. 2009. Physiological Stress Mediates the Honesty of Social Signals. *Plos One* 4.
- Cockrem, J.F., Silverin, B. 2002. Sight of a predator can stimulate a corticosterone response in the Great tit (*Parus major*). *General and Comparative Endocrinology* 125: 248-255.
- Fairhurst, G.D., Bond, A.L., Hobson, K.A., Ronconi, R.A., Wanless, R. 2015. Feather-based measures of stable isotopes and corticosterone reveal a relationship between trophic position and physiology in a pelagic seabird over a 153-year period. *Ibis* 157: 273-283.
- Fairhurst, G.D., Champoux, L., Hobson, K.A., Rail, J.F., Verreault, J., Guillemette, M., et al. 2017. Feather corticosterone during non-breeding correlates with multiple measures of physiology during subsequent breeding in a migratory seabird. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology* 208: 1-13.
- Koren, L., Nakagawa, S., Burke, T., Soma, K.K., Wynne-Edwards, K.E., Gefen, E. 2012. Non-breeding feather concentrations of testosterone, corticosterone and cortisol are associated with subsequent survival in wild house sparrows. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 1560-1566.
- Landys, M.M., Ramenofsky, M., Wingfield, J.C. 2006. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *General and comparative endocrinology* 148: 132-149.
- Legagneux, P., Harms, N.J., Gauthier, G., Chastel, O., Gilchrist, H.G., Bortolotti, G., et al. 2014. Does Feather Corticosterone Reflect Individual Quality or External Stress in Arctic-Nesting Migratory Birds? *PLOS ONE* 8: e82644.
- Lochmiller, R.L. 1996. Immunocompetence and animal population regulation. *Oikos* 76: 594-602.
- Martínez-Padilla, J., Mougeot, F., Webster, L.M.I., Pérez-Rodríguez, L., Pierny, S.B. 2010. Testing the interactive effects of testosterone and parasites on carotenoid-based ornamentation in a wild bird. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 902-913.
- Martínez-Padilla, J., Mougeot, F., García, J.T., Arroyo, B., Bortolotti, G.R. 2013. Feather corticosterone levels and carotenoid-based coloration in common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Raptor Research* 47: 161-173.
- Martínez-Padilla, J., Estrada, A., Early, R., García-González, F. 2017. Evolution meets biogeography: evolutionary potential decreases at high and low environmental favourability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284.
- McEwen, B.S., Wingfield, J.C. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior* 43: 2-15.
- Millán, J., Gortazar, C., Ballesteros, F. 2008. Parasites of the endangered Cantabrian capercaillie (*Tetrao urogallus cantabricus*): correlates with host abundance and lek site characteristics. *Parasitology Research* 103: 709.
- Morán-Luis, M., Fameli, A., Blanco-Fontao, B., Fernández-Gil, A., Rodríguez-Muñoz, R., Quevedo, M., et al. 2014. Demographic Tagging of Endangered Capercaillie in NW Spain. *PLOS ONE* 9: e99799.
- Mougeot, F., Evans, S.A., Redpath, S.M. 2005. Interactions between population processes in a cyclic species: parasites reduce autumn territorial behaviour of male red grouse. *Oecologia* 144: 289-298.
- Mougeot, F., Martínez-Padilla, J., Bortolotti, G.R., Webster, L.M.I., Pierny, S.B. 2010. Physiological stress links parasites to carotenoid-based colour signals. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 643-650.
- Mougeot, F., Lendvai, A.Z., Martínez-Padilla, J., Pérez-Rodríguez, L., Girardeau, M., Casas, F., et al. 2016. Parasites, mate attractiveness and female feather corticosterone levels in a socially monogamous bird. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 70: 277-283.
- Obeso, R. 2004. Urogallo cantábrico *Tetrao urogallus cantabricus*. En: Madoño, A., González, C., Atienza, J.C. (eds.). *Libro Rojo de las Aves de España*, pp. 176-178. Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife. Madrid, España.
- Obeso, J.R., Rodríguez, L.D., Álvarez, I., Niño, E., Del Campo, J.C. 2000. Intestinal parasites in the Cantabrian Capercaillie, *Tetrao urogallus cantabricus*: a coprological study. *Ardeola* 47: 191-195.
- Pollo, C.J., Robles, L., Seijas, J.M., García-Miranda, A., Otero, R. 2005. Trends in the abundance of Cantabrian Capercaillie *Tetrao urogallus cantabricus* at leks on the southern slope of the Cantabrian Mountains, north-west Spain. *Bird Conservation International* 15: 397-409.
- Quevedo, M., Bañuelos, M.J., Obeso, J.R. 2006. The decline of Cantabrian capercaillie: How much does habitat configuration matter? *Biological Conservation* 127: 190-200.
- R Core Team 2020. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria.
- Robles, L., Ballesteros, F., Canut, J. 2006. *El urogallo en España, Andorra*

- y Pirineos franceses: *Situación actual (2005)*: SEO/BirdLife. Madrid, España.
- Rodríguez, A.E., Obeso, J.R. 2000. Diet of the cantabrian capercaillie: geographic variation and energetic content. *Ardeola* 47: 77-83.
- Rodríguez-Muñoz, R., Mirol, P., Segelbacher, G., Fernández, A., Tregenza, T. 2007. Genetic differentiation of an endangered capercaillie (*Tetrao urogallus*) population at the Southern edge of the species range. *Conservation Genetics* 8: 659-670.
- Rodríguez-Muñoz, R., del Valle, C.R., Bañuelos, M.J., Mirol, P. 2015. Revealing the consequences of male-biased trophy hunting on the maintenance of genetic variation. *Conservation Genetics* 16: 1375-1394.
- Romero, L.M., Romero, R.C. 2002. Corticosterone responses in wild birds: the importance of rapid initial sampling. *The Condor* 104: 129-135.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21: 55-89.
- Stoffel, M.A., Nakagawa, S., Schielzeth, H. 2017. rptR: repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 1639-1644.
- Storch, I. 1994. Habitat and survival of capercaillie *Tetrao urogallus* nests and broods in the Bavarian alps. *Biological Conservation* 70: 237-243.
- Tarjuelo, R., Barja, I., Morales, M.B., Traba, J., Benítez-López, A., Casas, F., et al. 2015. Effects of human activity on physiological and behavioral responses of an endangered steppe bird. *Behavioral Ecology* 26: 828-838.
- Treen, G.D., Hobson, K.A., Marchant, T.A., Bortolotti, G.R. 2015. Large-scale spatial variation in feather corticosterone in invasive house sparrows (*Passer domesticus*) in Mexico is related to climate. *Ecology and Evolution* 5: 3808-3817.
- Wegge, P., Olstad, T., Gregersen, H., Hjeljord, O., Sivkov, A.V. 2005. Capercaillie broods in pristine boreal forest in northwestern Russia: the importance of insects and cover in habitat selection. *Canadian Journal of Zoology* 83: 1547-1555.
- Wenzel, M.A., Webster, L.M.I., Paterson, S., Mougeot, F., Martínez-Padilla, J., Piertney, S.B. 2013. A transcriptomic investigation of handicap models in sexual selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67: 221-234.
- Will, A.P., Suzuki, Y., Elliott, K.H., Hatch, S.A., Watanuki, Y., Kitaysky, A.S. 2014. Feather corticosterone reveals developmental stress in seabirds. *The Journal of Experimental Biology* 217: 2371-2376.