



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis multi-escalar de la capacidad invasora de *Discoglossus pictus auritus* (Amphibia, anura)

Olatz San Sebastián Mendoza



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència *Reconeixement- SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.*

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia *Reconocimiento - SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.*

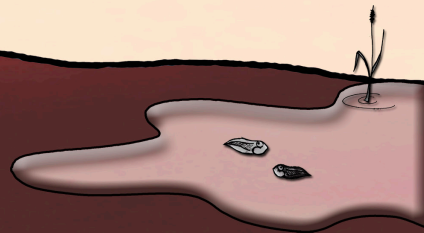
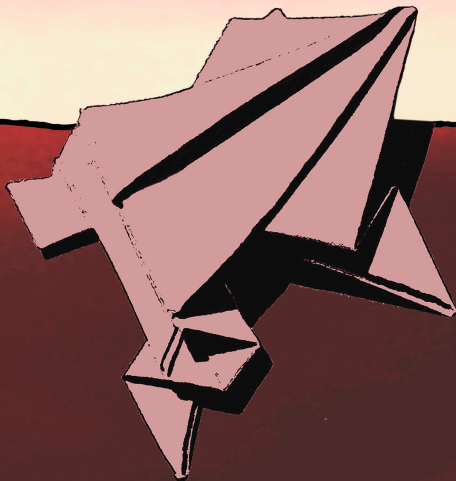
This doctoral thesis is licensed under the *Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0. Spain License.*



Análisis multi-escalar de la capacidad
invasora de *Discoglossus pictus auritus*
(Amphibia, anura)

Olatz San Sebastián Mendoza

TESIS DOCTORAL 2016



Análisis multi-escalar de la capacidad invasora de *Discoglossus pictus auritus* (Amphibia, anura)

Multi-scale analysis of *Discoglossus pictus auritus*
(Amphibia, Anura) invasiveness

Anàlisi multi-escalar de la capacitat invasora de
Discoglossus pictus auritus
(Amphibia, Anura)

Análise multi-escalar da capacidade invasora de
Discoglossus pictus auritus (Amphibia, Anura)

Discoglossus pictus auritus-en inbaditzeko gaitasunaren
eskala anitzeko analisia

Olatz San Sebastián Mendoza

Barcelona, juliol de 2016

Diseño y maquetación de portada:

Olatz San Sebastián & ThemonyH@Graphiks



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis multi-escalar de la capacidad invasora de *Discoglossus pictus auritus* (Amphibia, anura)

Memòria presentada per la
Olatz San Sebastián Mendoza
per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Departament de Biologia Evolutiva,
Ecologia i Ciències Ambientals
Programa de doctorat de Biodiversitat

Barcelona, 2016

Dr. Gustavo A. Llorente Cabrera
Director de Tesis

Departament de Biologia Evolutiva,
Ecologia i Ciències Ambientals
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Dr. Álex Richter-Boix
Codirector de Tesis

Department of Ecology and Genetics.
Evolutionary Biology Center.
Uppsala University



Esta tesis doctoral ha sido desarrollada en el Departamento de la Universidad de Barcelona con el apoyo de la Sociedad de Ciencias Aranzadi (SCA). Para su realización no se ha contado con financiación propia por lo que fue realizada en dedicación parcial, compaginándose con actividades laborales externas.

Parte del trabajo presentado fue financiado por la SCA (con duración de 1 año lectivo) y dos becas de estancia de 6 y 3 meses cada una, concedidas por la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya (AGAUR 2011 BE1 00697) y la Fundació Montcellimar y Universitat de Barcelona (estades formatives a Espanya i l'estranger 2014). Estas últimas tuvieron como objetivo principal el desarrollo del primer capítulo de esta tesis doctoral en colaboración con el Centro de Investigação em Ciências Geo-Espaciais (CICGE) y la Universidad de Oporto.

A mi amatxo,

Koldo, y

Mark

AGRADECIMIENTOS

A la hora de escribir este apartado no puedo dejar de hacer un recorrido de todo lo que he pasado durante este tiempo y casi parece un diario. Me ha dado la oportunidad de conocer y pasar tiempo con mucha gente que no me gustaría olvidar. He recopilado notas, revisado redes, móviles, servilletas de terrazas, notas en cuadernos de viaje... en fin, alguna de ellas puede que no aparezcan en este apartado pero que estén segur@s que la única razón será que mi cabeza tiene la mayor parte de neuronas ocupadas ahora mismo. Todo este tiempo y las personas que me han acompañado en un momento u otro estarán conmigo para siempre. Ahí voy!!

Gracias amatxo! Esta tesis doctoral y todo el trabajo no habría sido posible sin tu apoyo incondicional, así que va por ti! Me has acompañado en los momentos buenos y los malos, vía telemática o presencial pero siempre has estado ahí. Por otro lado, diría yo que algo de culpa de esta tesis tienen los genes navarros de cabezonería que dicen que existen y que hace falta para acabar una tesis, no? Gracias por tu cariño, tu confianza en mi trabajo, tus detalles y proporcionar esa tranquila felicidad que tú sabes entre muchas otras cosas. Y también va por mi hermano que siempre me ha acompañado aunque no se haga notar: gracias por visitarme en los lugares más lluviosos de la península, tus comentarios al fondo del teléfono, hacer que la grúa se llevara mi coche ja ja! Los dos me habéis hecho sentir en casa como si no pasara el tiempo, y mira que los "tesistas" el último año estamos insoportables. Paco, gracias por querer aportar ese optimismo que sólo tú tienes. Gracias por cada foto, por cada visita, por cada comida. Y qué voy a decir de mi aumentada familia navarro-catalana, GRACIAS por vuestro apoyo y cada momento. Cuando llegué éramos 9 (mi madrina, el tío Eduardo, Elsa, Manel, Mireia, Ángel, Pati, Mark y yo), y ahora llegamos a 12 (Olivia, Daniela, Mafi y Pablet) y tengo una ahijada supermaca ☺ Gracias por estar ahí, apoyarme y darme tanto a tod@s. En cuanto a la familia vasca, los he tenido más lejos pero para ellos no pasa el tiempo "aún sigues persiguiendo sapos?" jajajaja, bueno es más original que "cuándo dejas de estudiar?". Sé que están esperando la celebración con gambas en la terraza de la letxugina, no Victor? Gracias por ser como sois.

Gracias a toda la familia de la Universidad. Empezando por mi director Gustavo, solía bromear con bloquearlo por el pasillo de lo ajetreado y rápido que va siempre. Gracias por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la ciencia y comenzar a desarrollar un pensamiento científico que desconocía. Un café con leche con azúcar para celebrar la tesis? Un gracias enorme a mi codirector, Álex. “Discutir” contigo me ha hecho disfrutar de la ciencia, me ha animado a desarrollar mis ideas, me ha dado confianza, gracias de verdad. Y bueno, esos skypes, los que conseguimos, y esas historias, contigo he hablado de la realidad de la ciencia y he crecido en ciencia al mismo tiempo. Un agradecimiento enorme a los “segundos de a bordo” Albert y Xavi, ambos habéis sido un pilar esencial para mí, aquí y en la Conchinchina. El conocimiento y calidad personal que tenéis es un referente para mí y gracias a los dos estoy ahora aquí y lo sabéis. Y también a Antonia, Marta y Silvia. No me olvido de Núria, para nada. Ella me entendió en muchos momentos, me aguantó, me aconsejó, me enseñó, llenó el despacho de chistes conmigo :P, en fin que fuiste una compañera genial. Siempre valdrás más de lo que creas. Y con Jordi, vaya par, sois la leche, gracias. Me he reído mucho con los dos (recuerdo unos GLMs en un congreso...). “Mikele” te incluyo aquí porque siempre te consideré uno de los pilares de este grupo de herpetólogos de la UB, para mí el grupo de referencia desde siempre ☺. Gracias por acogernos aquí y allá, darnos casa, familia, ánimo y ser “medio vasko oye”. Gracias a tod@s los que han pasado por este grupo, con el mismo interés por estos “bitxos”: Urtzi, por fin un compañero vaskito que pillaba las bromas. Me he reído mucho desde midiendo millones de larvas hasta comiendo caramelos en Sevilla (fijo que aún estarán ahí para próximos congresos verás). Y Eudald, dale fuerte al disco, hacemos una saga? Pol, he compartido poco tiempo contigo pero transmites tan buen rollo ☺. Felipe, gracias por ese buen rollo también y esa tranquilidad que se transmite. Y a los que han ido entrando, força!

No sólo a los herpetólogos, he tenido grandes compañeros de despacho. Merci Eloy y Deborah, he compartido muchos momentos con vosotros y siempre ha sido genial (desde el “momento bata” Debs hasta “el torsos” Eloy). Álex Sanchez, tú eras mi compañía a partir de horas en las que ya no quedaba nadie, y vaya que me he reído, merci, no sabes lo bien qué va para acabar el día de trabajo. Saliendo del despacho, la cantidad de gente a la que tengo que agradecer pasar todo esto conmigo buf, seguro que me falta gente. Desde mis compañeros de Máster: Inés (mi “estancia” en tu casa no la olvidaré, saludetes al bloque Zero-José), Gemma (siempre estás ahí, incluso a mar abierto :P), Rubén (momentazos tipo playmobil!), Alberto (por insistirme en que crea en mí y ... que me apunte a kick-boxing ja ja), Blanca (esas salidas de máster y demás

risas), Ulla (gracias por tu energía), Nati (por ti), Isa (gracias por esas conversaciones en la playa con el radar entre otras cosas), Edu (por dejarte conocer un poco y escuchar alguna de mis paranoias estadísticas), Mireia (por estar ahí y ... “tener un buen tema de tesis para discutir un día”), Luigi, Luis, tantos... Y a los que han ido entrando Mario (pejkau te debo unas cañas y lo sabes; has sido una alegría con patas y lo sabes), Irene (porque no me siento tan sola en mi despiste habitual, vaya par), Francesc (entraste más tarde pero eres imprescindible en la UB, Francesc Cobain), Té (venga, que ya estamos; gracias por tooooodo el apoyo y por compartir tu familia portuguesa con nosotros), Oriol (gracias por “acompañarme” cada comida), José (por despejar la mente a base de patines y discusiones varias), Vero (gracias por tu apoyo, una pena no acabar compartiendo casa pero ya sabes dónde tienes una), Nico, Karla, Toni, Zuzy, Laura en fin tod@s tod@s! Gracias también a los que han ido apareciendo en el grupo y que hacen todo más fácil (ese grupo whatsappero!). Y por último, a los camareros más majos del bar de Biología :P

Un agradecimiento muy especial a Xavier Ferrer. No sólo confió en mí para el Vertebracat sino que ciertamente ha posibilitado esta tesis doctoral. Valoro mucho tu forma de ver las cosas, compartimos la inquietud por el movimiento de proyectos que acerquen la ciencia y la biología a la comunidad y eres de las pocas personas que veo, saben aprovechar lo bueno de cada persona. Agradezco también el apoyo de Toni Serra y Xavier Font, con vosotros tengo ganas de aprender más sobre Access y programación. Gracias a María José por su trabajo con l@s “lok@s” doctorand@s y a todos los profesores que me han enseñado algo este tiempo, Santi, Domingo y las nuevas generaciones de postdoc Joan (un gusto trabajar con “ustedes”), Raúl, Guillem (cuando quieras, invitado a comer o beber ;P), Marc, Laura, Francesc y Nerea (gracias por facilitarme tanto las cosas y esos momentos APM y disección de pollo, entre otros), Toni, Albert Cama, y más que seguro que me dará una rabia enorme no haber incluido.

No me olvido de Oporto y toda su gente, imposible. Ha sido un lugar de acogida genial, el CICGE, la Universidad do Porto, el CIBIO. Aquí sí que me dejaré muchísima gente porque eráis tantos! Allí tuve sentimientos encontrados: seguir con la ciencia y vivir la vida que inicialmente quise o apostar por una vida que consideraba más real. Neftalí, cuando llegué no sabía nada de modelación ni de Sistemas de Información Geográfica, así que imagina lo que me has enseñado y sé lo que me has sufrido ja ja. Qué decir de cada discusión recurrente, gracias por tu paciencia y por todo lo que me has aportado. Vero, Cat, Antigoni, Angelica, Caterina, Leili & Housein, Coralie & Fernando, Brito,

Jesús (gracias por todo de verdad, música, amistad, cantes jaja), Kike (compartiendo situaciones), Álex (gracias por las risas y los desahogos Charlie), Joana, Raquel (tengo la bocina en el coche ☺) and Raquel & James, los gallegos Guille y Fer (ahora si queréis llevaros mi ordenador con la tesis, no problema), Agosto (por hacer una piñata tan TAN) y Luci (gracias por apoyarme en la intención de ir a escalar, ahora sí, no?), Zbyszeck (por todos los “a beer?” y esa visita fugaz), Anamarija, Iván, Daniele & Michela, Xico (esas comidas frente al mar), Tex, Iolanda, Antonio, Jesús & Laura, Graciela, Duarte, Cristina, Michael (el hawai-tokyano :P), Magda, Armando, Ana & Pedro, Helena, Sofía, tanta gente que se cruzó conmigo este tiempo y me ayudó de una forma u otra! Tampoco me olvido del grupo que me acogió en la Universidad de Porto junto con Neftalí, Elena, Catia, Joao, Nelson, Miguel, Eko, Ana, Elisabete, Ana Cláudia, Ana Sofía. Y el grupo del CICGE: Bernardo, Americo, Dalmiro, Sergi. Merci a Susana y Oscar, fuisteis los vecinos y compañeros perfectos, ojalá que volvamos a coincidir, aquí o allá. Patri, ahora estás en Barna, gracias por tu visión externa de la ciencia y tu apoyo. Gracias a Arlindo y Xico, inolvidable campaña de campo que contribuyó también a despejarme y seguir con la tesis.

Y el gracias al origen de todo, Aranzadi. Primero me motivasteis a saber más sobre astronomía y al final acabé en Herpetología. Juantxo, junto con Mertxe y Josema hacéis un trabajo increíble que admiro de verdad. Siempre, SIEMPRE habéis estado ahí y habéis respetado el trabajo de tod@s. Xabi qué te voy a decir, Rubio! Admiro tu ímpetu, tu capacidad y echo en falta ese grupo llamado el Observatorio. Gracias por vuestro apoyo constante a tod@s, cada vez que volvía ahí estabais. Alberto, Ainhoa, Nagore, Manu, Iñaki, Aitor L., Ariñe, Vanesa, Ion, Aitor V. y la nueva tanda que espero que siga cuidando lo esencial, aupa ahí! Aitziber no te me olvidas. Gracias por cada risa, por cada frase de ánimo y cada visita. Firmaría en cualquier lado por trabajar contigo, vales mucho!

Y vuelvo a Barcelona, si tengo que dar las gracias a alguien es a vosotros. Eneritz, Luci, Anna, Carlos e Iñaki: conoceros ha sido de lo mejor que me ha pasado en Barcelona, sois los mejores y de verdad. Podría enrollarme mucho con vosotros pero ya lo haré celebrándolo, gracias por vuestro apoyo, consejos, ánimos, visitas y por ayudarme a disfrutar a pesar de muchas cosas. Chic@s ahora sí acabo la tesis cabritinhas!

Y gracias a tod@s l@s que han estado ahí o allá: Ainhoa (a pesar de las bilbainadas, eskerrrik asko benetan; buen rolloooo), Anabel (gracias por estar a pesar de que la vida cambie tanto), Noemí (siempre siempre me apoyas, me escuchas y puedo contar

contigo, gracias), JM (por creer en mí y mis ideas de bombero; ya sabes, nos haremos ricos), las Bioneskak (a pesar de estar desaparecida, aún seguís a mi lado). En el pueblo, gracias a toda la gente que me acogió cuando llegué. Primero Conchita y Pere, muchas gracias por vuestro cariño y estar ahí para lo que toque. Cris y Jordi, gracias por aguantar nuestras neuras de “tesistas”. Mucho estrés. A ver si ahora os hablamos de otra cosa, no? Aida y Toni gracias por vuestro buen rollo. Pep, gracias por cada visita a Porto y por cada plan de monte que aún está pendiente. Sole y Jaume por estar y ayudarme con “mis liadas”. Por último la gente con la que coincidí en la Fundació Emys. En esa etapa pasó de todo y cada persona es un mundo, pero unas risas ya nos echamos y una ilusión ya compartimos. Gracias a tod@s!

Quería reservar el final para la persona que ha compartido conmigo cada minuto prácticamente 24 horas al día y que se ha tragado tanto mis buenos como malos momentos, que ha luchado conmigo por resolver cada problema, disfrutar cada momento y sobrellevar las condiciones desfavorables. Hasta te has puesto los patines asesinos varias veces para que no me sintiera tan desubicada. No ha sido fácil pero ya estamos y ahora toca disfrutar. Te vienes conmigo?! Va por ti!

Eskerrik asko denoi!

RESUMEN GENERAL

Las invasiones biológicas representan tanto una amenaza para la biodiversidad como una oportunidad para profundizar en el conocimiento de la adaptación de las especies y el funcionamiento de las comunidades biológicas. Las Especies Exóticas Invasoras siguen tres fases: introducción, establecimiento y expansión. Pocas, de las muchas especies introducidas, consiguen llegar a la fase de expansión con éxito. Son muchos los factores que conforman la capacidad invasora de una especie y que explican su éxito en el área invadida, variando los mismos entre especies y escalas de estudio. A excepción de casos como los de *Lithobates catesbeianus* o *Rhinella marina* entre otros, escasos trabajos han sido dedicados al estudio de los factores que favorecen la invasión de las especies de anfibios y su efecto potencial en las especies nativas a pesar de ser uno de los grupos más amenazados en la actualidad. En esta tesis doctoral se ha desarrollado un análisis multi-escalar de los principales factores que conforman la capacidad invasora del sapillo pintojo mediterráneo, *Discoglossus pictus auritus* una especie introducida en Banyuls sur Mer (Francia), a 5 km de la frontera con Cataluña, a finales del siglo XIX. En la actualidad cuenta con poblaciones abundantes y se encuentra en expansión tanto en Francia como en España. Trabajos previos indican su potencial efecto sobre la comunidad nativa y la necesidad de su estudio en profundidad.

Los factores que actúan a macroescala son ampliamente utilizados en el estudio de las invasiones biológicas y se consideran los más efectivos a la hora de predecir el éxito de las especies introducidas. En este trabajo se analizaron cuatro factores clave en este aspecto: el alcance potencial de expansión (*spatial spread*), la capacidad de expansión (*dispersal ability*), la plasticidad del nicho realizado (*realized niche plasticity*) y la progresión de la expansión en un futuro (*increasing/decreasing expansion at the future*). Se observó que las condiciones encontradas por *D. pictus* en el área de invasión son favorables a su expansión, al ser similares a las del área de origen (*niche conservatism*) y que las translocaciones registradas dentro de esta área, podrían acelerar el proceso. Su capacidad de expansión, hasta el momento, presenta un patrón típico de las especies

invasoras: con una fase *lag* inicial, seguida de un aumento exponencial de su tasa de expansión. A pesar de que los anfibios presentan menores tasas que otros grupos, se espera una progresión y aumento de su invasión en un futuro y por tanto se recomienda su seguimiento.

A mesoescala, el análisis de aquellos factores que determinan la estructuración de las comunidades son esenciales a la hora de entender el éxito de una especie. Las comunidades de anfibios se distribuyen en un gradiente de sistemas acuáticos con diferente hidropериodo, quedando las especies organizadas en función de su capacidad a hacer frente a las diferentes amenazas: la desecación en los hábitats efímeros, y la depredación en los ambientes acuáticos más estables y permanentes. A partir de dos diseños experimentales se estudió la respuesta de *D. pictus* a la desecación bajo diferentes condiciones de disponibilidad de recursos, así como su reacción y la de una especie de anuro nativo (*Pelodytes punctatus*) a tres depredadores frecuentes en el área de introducción. Los resultados obtenidos demuestran que *D. pictus* responde de forma eficaz a la desecación, una respuesta sin embargo dependiente de la disponibilidad de los recursos. Por otra parte, presentó plasticidad frente a los diferentes depredadores, aunque menor que la observada en la especie nativa. Estas cualidades permiten entender la preferencia de *D. pictus* por los sistemas acuáticos efímeros con poca abundancia de depredadores, donde cabe esperar un elevado éxito reproductivo que explicaría su buena capacidad invasora.

El último capítulo (análisis a microescala) analizó la gestión de los recursos tróficos realizada por *D. pictus* y su potencial interacción con la especie nativa con la que presenta mayor solapamiento espacial y temporal (*Bufo calamita*), tanto en campo como en laboratorio (análisis a microescala). Estudios previos, así como los resultados obtenidos en la sección anterior, indican que la gestión de los recursos tróficos es un factor clave para el éxito reproductivo de los anfibios. El estudio del nicho trófico y la actividad trófica de ambas especies a microescala indicó que *D. pictus* presenta una efectiva estrategia trófica, así como un desplazamiento de la especie nativa hacia recursos de menor calidad. Este desplazamiento podría llegar a afectar de forma negativa a la capacidad de respuesta de la especie nativa a la desecación de los sistemas efímeros por los que ambas especies muestran preferencia a la hora de reproducirse.

Este trabajo destaca la estrategia trófica de *D. pictus* (microescala) con una gestión de los recursos inclinada a favorecer crecimientos rápidos y elevados, pero con una gran

capacidad de alterarla en función de su disponibilidad. Por otro lado, parece presentar una mayor capacidad competitiva en el nicho trófico (microescala) que la especie nativa con la que convive habitualmente en ambientes efímeros, observándose un desplazamiento dentro del nicho que podría llegar a alterar la estructuración de las comunidades naturales (mesoescala). La disponibilidad de hábitats favorables en el área de introducción y su potencial expansión futura (macroescala) podría provocar a medio plazo algún tipo de consecuencia sobre las especies nativas en áreas con condiciones desfavorables, con escasez de puntos de agua o problemas de conservación.

Esta tesis doctoral proporciona una visión global de la capacidad invasora de una especie a diferentes niveles, aplicando para ello diferentes técnicas de estudio: ENMs, técnicas de ordenación, diseños experimentales en laboratorio y campo, y análisis de isótopos estables. El trabajo y resultados obtenidos representan un importante avance en el conocimiento del proceso de invasión de *D. pictus* en Europa, y asienta las bases para el desarrollo de estudios adicionales que profundicen en las cuestiones planteadas.

ÍNDICE

ÍNDICE

Introducción general	3
1. Especies Exóticas Invasoras (EEI)	3
1.1. Concepto y contexto general	3
1.2. Establecimiento y éxito de invasión	6
2. Especies Exóticas Invasoras de anfibios	10
2.1. Contexto	10
2.2. Capacidad invasora en anfibios	13
2.2.1. <i>Macroescala geográfica</i>	13
2.2.2. <i>Mesoescala geográfica</i>	15
2.2.3. <i>Microescala geográfica</i>	17
3. Especie de estudio	19
3.1. <i>Discoglossus pictus auritus</i>	21
3.1.1. Distribución nativa	21
3.1.2. Distribución en el rango de introducción	22

3.1.3. Establecimiento y expansión en el rango de introducción	23
Objetivos	29
Informe de los directores	39
Sección 1. Capacidad invasora de <i>Discoglossus pictus</i> a macroescala	41
Resumen del capítulo 1.	43
Capítulo 1. Differential trophic traits between invasive and native anuran tadpoles	45
Sección 2. Capacidad invasora de <i>Discoglossus pictus</i> a mesoescala	69
Resumen del capítulo 2.	71
Capítulo 2. Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles.	73
Resumen del capítulo 3.	85
Capítulo 3. How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators?	87
Sección 3. Capacidad invasora de <i>Discoglossus pictus</i> a microescala	99
Resumen del capítulo 4.	101
Capítulo 4. Differential trophic traits between invasive and native anuran tadpoles.	103
Resumen del capítulo 5.	113

Capítulo 5. Trophic strategies of a non-native and a native amphibian species in shared ponds	115
Discusión general	135
1. Capacidad invasora de <i>Discoglossus pictus</i> a macroescala	136
2. Capacidad invasora de <i>Discoglossus pictus</i> a mesoescala	140
3. Capacidad invasora de <i>Discoglossus pictus</i> a microescala	145
4. Consideraciones generales de la capacidad invasora de <i>Discoglossus pictus</i> en el área de introducción	149
5. Limitaciones y futuros estudios	154
Conclusiones	161
Referencias bibliográficas	167

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. ESPECIES EXÓTICAS INVASORAS (EEI)

1.1. CONCEPTO Y CONTEXTO GENERAL

Hoy día el progreso humano y la celeridad en los avances provocan fuertes impactos sobre la dinámica natural de los ecosistemas. La fragmentación del hábitat, la intensificación de la contaminación en medios terrestres y acuáticos o el efecto invernadero sólo son algunas de las consecuencias de la actividad humana. En los últimos 50 años la mejora de las infraestructuras, y por tanto de las conexiones entre países y continentes, ha sido uno de los factores con mayor impacto en el medio ambiente debido, no sólo a la fragmentación y pérdida del hábitat natural, sino a la dispersión de una gran cantidad de especies en áreas distantes a su distribución original (Mooney & Hobbs, 2000; Richardson, 2011). Las especies que una vez introducidas consiguen establecerse en los nuevos territorios e iniciar su expansión se denominan comúnmente como invasoras (Richardson et al. 2000). Dichas especies pueden provocar importantes daños en los ecosistemas receptores, y son consideradas uno de los principales problemas en el campo de la biología de la conservación junto con la destrucción del hábitat, la sobreexplotación, la contaminación y el cambio climático (Mack et al. 2000; Clavero & García-Berthou 2005; D'Amore et al. 2010). Al mismo tiempo, el fenómeno es considerado por la comunidad científica como una inestimable oportunidad para avanzar en el conocimiento de la adaptación de las especies y de la estructuración de las comunidades mediante el estudio de los procesos que tienen lugar en las nuevas interacciones. Tanto ha crecido el interés en este campo que ya han surgido revistas dedicadas exclusivamente a este tema (*Biological Invasions* o *Aquatic Invasions*, por ejemplo), enciclopedias o volúmenes como Simberloff &

Rejmánek (2011) así como webs o congresos nacionales e internacionales monográficos sobre esta temática. Las invasiones biológicas, son procesos continuos en el tiempo y el espacio que pasan por tres etapas: la introducción, el establecimiento y la invasión propiamente. No todas las especies introducidas consiguen establecerse con éxito en los nuevos hábitats, hablándose entonces de especies casuales (*casual species*). Solo tras su establecimiento en núcleos reproductores se considera a una especie como naturalizada (*naturalized species*), paso previo que puede dar lugar a la expansión de la misma, momento a partir del cual se denominaría especie invasora (*invasive species*) (ver **Cuadro 1**). Sólo una parte de las especies introducidas se establecen con éxito y de éstas sólo un porcentaje muy bajo de especies se convierten en invasoras con fuerte presencia en las comunidades receptoras (Pimentel et al. 2001; Richardson & Pyšek, 2006; Vila et al., 2008).

En la actualidad existe un extenso debate en cuanto a si la capacidad invasora de las especies debe definirse sobre la base de los impactos ecológicos que causan sobre los ecosistemas o de la magnitud y la rapidez de expansión de su rango (por ejemplo, Richardson et al., 2000; Daehler, 2001; Simberloff et al, 2012; Blackburn et al, 2014). Mientras unos autores defienden que especie invasora es toda aquella especie naturalizada que consigue expandir su distribución con éxito, otros consideran como invasora únicamente aquellas especies que además de tener estas características, conllevan un impacto negativo sobre el sistema y/o la biota receptora (Alpert et al,

Especies casuales (*casual species*) – especies introducidas fuera de su distribución que no forman poblaciones con autoreemplazamiento en el área de introducción y cuya persistencia depende de la introducción repetida de individuos o propágulos.

Especies naturalizadas (*naturalized species*) – especies introducidas fuera de su distribución que mantienen poblaciones reproductoras y que persisten durante un periodo determinado sin intervención directa del hombre.

Especies invasoras (*invasive species*) – especies naturalizadas que mantienen poblaciones reproductoras a menudo abundantes y con una elevada capacidad de expansión. Definición aceptada por el World Conservation Union (IUCN), the Convention on Biological Diversity y el World Trade Organization add economy, environment or health impacts to invasive species denomination.

Cuadro 1. Definición de los términos especies casuales, naturalizadas e invasoras basados en Richardson et al. 2000, Colautti & MacIsaac 2004, Occhipinti - Ambrogi & Galil 2004 y Pyšek et al. 2009.

2000). Los dos puntos de vista tienen su origen en dos percepciones distintas del fenómeno, uno con una clara vocación práctica y conservacionista, y otra más básica interesada no tanto en sus efectos negativos sino en entender los mecanismos intrínsecos y extrínsecos que permiten a una especie introducida desarrollarse y expandirse favorablemente en un nuevo ambiente. Los impactos negativos que se han descrito de estas especies son muy diversos. Estos van desde su efecto en la alteración del equilibrio dinámico natural de los ecosistemas a la contaminación genética, actuar como vector de enfermedades e incluso a ser responsables de la modificación del hábitat (Elton 1958; Manchester & Bullock 2000; Gilbert & Doods 2001). Sin embargo, diferenciar entre especies exóticas invasoras y no invasoras en función de su impacto puede conllevar a equívoco. Aunque algunas especies exóticas tienen efectos notables e inmediatos sobre las comunidades nativas como la depredación o degradación del hábitat (Rodda & Savidge 2007), otros presentan efectos menos perceptibles a corto plazo como la reducción de la *fitness* de las especies nativas, contaminación genética de las poblaciones nativas, desestabilización de la organización natural de las poblaciones o alteraciones con efecto dominó en las comunidades receptoras (Santos et al, 2007; Kraus, 2015). Por otro lado, el proceso de invasión de una especie es dinámico y los efectos derivados de su introducción pueden diferir también dependiendo del momento o lugar de la invasión: una invasión puede categorizarse como no dañina hasta que entra en contacto con una especie determinada o las condiciones ambientales cambian, alterando las condiciones ecológicas y resultar nociva en la nueva zona alcanzada (Mack et al., 2000; Clavero & García-Berthou 2005; Strayer et al. 2006; Jeschke et al, 2014). Su potencial nocivo puede responder a las características de los hábitats o comunidades receptoras (riqueza de especies, la degradación del hábitat, la co-ocurrencia con especies o poblaciones amenazadas, entre otras) que varían a lo largo de su área de expansión. Es el caso, por ejemplo, del árbol del viajero (*Ravenala madagascariensis*) plantado ampliamente por motivo ornamental en todo el trópico sin aparentes impactos pero que se ha convertido en plaga en las islas Macareñas (Cronk y Fuller, 1995). En consecuencia, la prudencia y la ampliación del conocimiento específico de cada caso son fundamentales para el correcto manejo de esta problemática (Joly 2000; GEIB ed. 2010; Vilá et al. 2008), y una definición en función de sus propiedades de expansión más que en los daños causados parece más adecuada para identificar a aquellas especies con un potencial dañino a lo largo de su futura expansión.

El estudio de las especies invasoras (con o sin efectos evidentes) no sólo tiene un

elevado interés en materia de conservación sino que posee un inestimable valor científico (Sax *et al.*, 2007), como ya se dijera anteriormente. La especiación y organización de las comunidades actuales derivan de un proceso prolongado de adaptación al nicho ecológico disponible (condiciones climáticas, interacción entre especies y procesos de competencia alrededor de los recursos disponibles). Es esperable que en sistemas saturados las especies introducidas de otras regiones estén peor adaptadas a las nuevas condiciones que las nativas y no consigan establecerse con éxito. Sin embargo las especies invasoras, consiguen naturalizarse y expandirse en un período extremadamente corto de tiempo. Su estudio presenta una oportunidad única en el estudio de la evolución y adaptación de las especies a nuevos ambientes y comunidades tanto de las propias especies invasoras como de las autóctonas que conforman la comunidad de recepción. Permite a los investigadores analizar que fenómenos ecológicos y evolutivos capacitan a dichas especies para penetrar en las nuevas comunidades, mediante el estudio de su plasticidad fenotípica, sus interacciones ecológicas, o su composición genética. Responder a qué factores y características facilitan su éxito, es el primer paso para el análisis de una invasión y sus posibles consecuencias.

1.2. ESTABLECIMIENTO Y ÉXITO DE INVASIÓN

El éxito de invasión de una especie viene definida fundamentalmente por tres factores principales: el historial de su introducción, la permeabilidad del sistema receptor a la invasión y la capacidad invasora propia de la especie (**Cuadro 2**). El **historial de su introducción** está principalmente relacionada con el número de individuos introducidos, la frecuencia de los eventos de introducción y la viabilidad y capacidad de reproducción de estas especies tras su introducción (Blackburn & Duncan, 2001; Lockwood et al, 2005; Colautti et al, 2006). En el caso de las plantas invasoras, sobre las que puede encontrarse una extensa bibliografía con respecto a invasiones biológicas, dicho proceso suele definirse bajo el término de “propagules pressure” (Williamson & Fitter, 1996). Un alto número de individuos o introducciones numerosas y consecutivas parece favorecer el establecimiento de las especies y ser clave para algunas de ellas (Jeschke & Strayer, 2006; Hayes & Barry, 2008; Blackburn et al, 2013, Blackburn et al, 2015a y b). Por otro lado, **la permeabilidad del sistema receptor** a la invasión indica la susceptibilidad del mismo a ser invadido, haciendo referencia a aquellas condiciones

del medio que facilitan la naturalización de las especies introducidas (Crawley 1987; Mack et al, 2000). Se ha observado, por ejemplo, que el grado de humanización del sistema receptor está relacionado con el éxito de algunas de éstas (Simberloff, D. 1986; Gassó et al. 2009; Pyšek, et al. 2010). Por último, **la capacidad invasora de la especie**, que incluye todas aquellas características propias de la especie que aumentan su éxito de invasión. Se ha tratado de elaborar un listado de características generales que definieran un modelo de invasor con el objetivo de responder a porqué unas especies obtienen éxito y otras fallan en alguna de las fases del proceso de invasión (Pyšek & Richardson, 2007; van Kleunen et al, 2010). Características recurrentes en la bibliografía que definen a los invasores que tienen éxito son, por ejemplo, la capacidad de dispersión, el ser especies generalistas en las diferentes dimensiones del nicho (tráfico, espacial, etc), la plasticidad fenotípica o las estrategias reproductivas propias de especies con estrategias tipo R, que aseguren camadas o puestas abundantes y de desarrollos rápidos (Rehage et al, 2005; Rodda & Tyrrell, 2008).

En la mayoría de los casos, determinar la historia de la introducción es extremadamente difícil al carecer de datos y registros históricos, sin embargo el avance en las técnicas y análisis de genética de poblaciones permite cada vez con mayor exactitud reinterpretar cuándo y cómo tuvo lugar la introducción de las poblaciones (Sato et al, 2010; Cristescu 2015). Dicha dificultad ha dado lugar a que hasta el momento gran parte de los trabajos se centren en determinar la permeabilidad del sistema y/o la capacidad invasora de la especie. Ambos factores, aunque independientes, están estrechamente relacionados. Especies con los rasgos generales propios de buen invasor, que harían pensar que tendrán un potencial invasor alto, pueden no prosperar en su extensión como es esperado en función del sistema en el que son introducidos. La permeabilidad del sistema (*invasibility*) está definido por los requerimientos y características de la especie y la capacidad invasora de las especies (*invasiveness*) por las condiciones del sistema (Alpert et al, 2000). Así deben ser estudiados de forma conjunta.

Por otro lado, dos factores claves a la hora de estudiar la capacidad invasora de una especie es su variabilidad entre taxones, y más concretamente entre **especies**, y de la **escala de estudio** (Hayes & Barry, 2008; Kraus, 2009; Hortal et al, 2010; Reed et al, 2012; Hulme et al, 2013). Así diferentes autores han destacado los factores que de forma general caracterizan a una **especie** como una buena especie invasora en plantas (por ejemplo Williamson and Fitter, 1996; Dawson et al, 2011) o en peces (por ejemplo Marchetti et al, 2004). Dependiendo de la fisiología, los requerimientos específicos y las

Presión de propágulos o historia de introducción (*history of introduction or propagule pressure*) – cantidad de organismos o partes viables del mismo que son introducidos en un determinado lugar y pueden llegar a desarrollar individuos adultos. Se incluye también dentro del término la frecuencia en la que se producen dichas introducciones y la capacidad de los individuos a formar nuevas poblaciones (Lonsdale, 1999; Colautti et al, 2006; Chytrý et al., 2008; Kraus 2009)

Permeabilidad del sistema (*invasibility*) – susceptibilidad del sistema o comunidad residente al establecimiento y expansión de nuevas especies (Lonsdale, 1999; Alpert, 2000; Chytrý et al., 2008).

Capacidad invasora de la especie (*invasiveness*) – capacidad de una especie introducida a superar las diferentes barreras bióticas y abióticas del sistema y las comunidades residentes y volverse invasivas (Alpert, 2000; Richardson, D.M., & Pyšek, P. (2006).

Cuadro 2. Definición de los términos historia de introducción, permeabilidad del sistema y capacidad invasora de la especie.

amenazas que limitan el éxito de cada grupo, se han escogido los aspectos más relevantes para cada taxón con la intención de buscar generalidades que permitan identificar de antemano a los potenciales invasores. Un trabajo de referencia en este aspecto es el llevado a cabo por Baker (1974) que destaca los 12 caracteres que caracterizan a la “maleza ideal” (**Tabla 1**). Caracteres como aquellos que favorezcan la fecundidad o la tasa de crecimiento rápida se repiten en otros grupos de animales, como en el de los peces, y destacan otros caracteres decisivos por sus características específicas como la tolerancia a la variación de ciertos compuestos químicos en el medio acuático (Marchetti et al, 2004). También entre especies, estos caracteres varían (Moravcová et al, 2015) respondiendo a los requerimientos específicos de cada una, como la selección de hábitat o la amplitud en la tolerancia a determinados contaminantes, entre otros.

La **escala de estudio por su parte** responde a diferentes cuestiones y un mismo carácter puede llegar a ser favorable a una escala y no a otra, variando la percepción de la capacidad invasora de una especie dependiendo de la escala de estudio. A macroescala por ejemplo, la riqueza de especies puede favorecer la introducción de nuevas especies y sin embargo a nivel comunitario o microescala desfavorecerlo (Alpert et al, 2000). La riqueza de especies está ligada a ecosistemas con nichos variados y con recursos donde una especie puede encontrar fácilmente su nicho idóneo o recursos que explotar frente a ecosistemas más pobres (Robinson et al. et al. 1995; Palmer & Maurer et al.

1	Requisitos de germinación para diferentes hábitats
2	Germinación discontinua y longevidad de las semillas
3	Crecimiento rápido en fase vegetativa (floración temprana)
4	Producción de semillas continua y extendida en el tiempo
5	Autocompatibilidad pero no autogamia completa
6	Polinización cruzada no especializada
7	Alta producción de semillas en condiciones ambientales favorables
8	Producción de semillas en amplio rango de condiciones ambientales
9	Adaptaciones para la dispersión a cortas y largas distancias
10	En plantas perennes, una reproducción vegetativa vigorosa
11	En plantas perennes, quebradiza para evitar ser arrancada del suelo
12	Fuerte potencial para competencia interespecífica

Tabla 1. Caracteres de la “maleza ideal” según Baker 1974.

1997; Stohlgren 1999). Sin embargo, dentro de una misma comunidad la riqueza específica puede favorecer la presencia de interacciones competitivas o depredadores potenciales (Case 1991; Tilman 1997). Asimismo el estudio jerarquizado o en diferentes escalas también responde a diferentes cuestiones que permiten obtener una visión integrada de la capacidad invasora de una especie. Estudios a macroescala responden a cuestiones como qué factores limitan la distribución de las especies, si es probable una expansión continuada en el espacio y en el tiempo, o si existen indicios de adaptación de la nueva especie durante su invasión. Mientras que a mesoescala y microescala analizarían cómo las nuevas especies se estructuran en las comunidades nativas o las interacciones bióticas con las especies residentes. Además de la capacidad invasora de una especie introducida entendida como su capacidad de expansión y adaptación a nuevos ambientes, el estudio a diferentes niveles permite determinar con mayor rigurosidad el potencial efecto de su introducción. Una especie podría tener un aparente escaso impacto a macroescala debido por ejemplo a tasas de expansión lentas, y sin embargo resultar dañinas a microescala por su fuerte capacidad competitiva, o por el contrario tener una rápida expansión y por tanto percibir una alta capacidad invasora y no mostrar efectos negativos a mesoescala por ocupar nichos vacíos en el área de introducción.

Por este motivo un correcto diseño analítico que tenga en cuenta las peculiaridades de cada especie en un sistema y que integre trabajos a diferentes escalas es esencial a la hora de evaluar la capacidad invasora de las especies introducidas y/o potencialmente

invasoras (Pauchard & Shea, 2006; Soberón & Nakamura, 2009; Soberón, 2010). Esta tesis doctoral explora la capacidad invasora de una especie de anfibio. Inicialmente es necesario tener en cuenta el carácter bifásico de su ciclo vital y su sensibilidad a la vez que plasticidad ecológica que les permite responder a la presión generada por diferentes factores (como la desecación o respuesta a depredadores), y que despierta un gran interés en el mundo científico (Denver et al, 1997, 1998; Laurila et al, 2002a, 2002b; Newman, 1992). Por otro lado, en la actualidad este grupo de vertebrados es uno de los más amenazados del planeta (Catenazzi, 2015) añadiendo mayor importancia al estudio de aquellos factores que pueden alterar sus poblaciones y especies locales, como es la introducción de especies invasoras (Baillie et al., 2004; Bucciarelli et al., 2014). Dada la particularidad y complejidad de cada especie de anfibio, la siguiente sección explica la selección de los factores y escalas analizados en esta tesis doctoral.

2. ESPECIES EXÓTICAS INVASORAS DE ANFIBIOS: CONTEXTO Y CAPACIDAD INVASORA

2.1. CONTEXTO

En 2008, un proyecto de investigación financiado por la UE (DAISIE— Alien Invasive Species Inventory for Europe) desarrolló el primer inventario paneuropeo de especies exóticas invasoras, con aproximadamente 12.000 registros de especies exóticas con presencia en Europa, de las cuales se estimó que alrededor de un 10-15% eran invasivas. Estas especies se encontraban representadas en todos los grandes grupos taxonómicos: mamíferos, anfibios, reptiles, peces, invertebrados, plantas, hongos, bacterias y otros organismos (DAISIE 2009, **Figura 1**). De las especies introducidas con éxito únicamente 7 corresponden al grupo de los anfibios con algún impacto negativo sobre la biodiversidad nativa europea.

Hasta los últimos 25 años la problemática de las especies invasoras de anfibios y reptiles únicamente era citada en algunos trabajos de forma puntual (Groves & Burdon, 1986). La mayor parte de estudios y medidas de conservación en este grupo, se iniciaron y se tomaron cuando las especies ya se encontraban establecidas y eran problemáticas, especialmente cuando las introducciones generaban costes económicos. Actualmente,

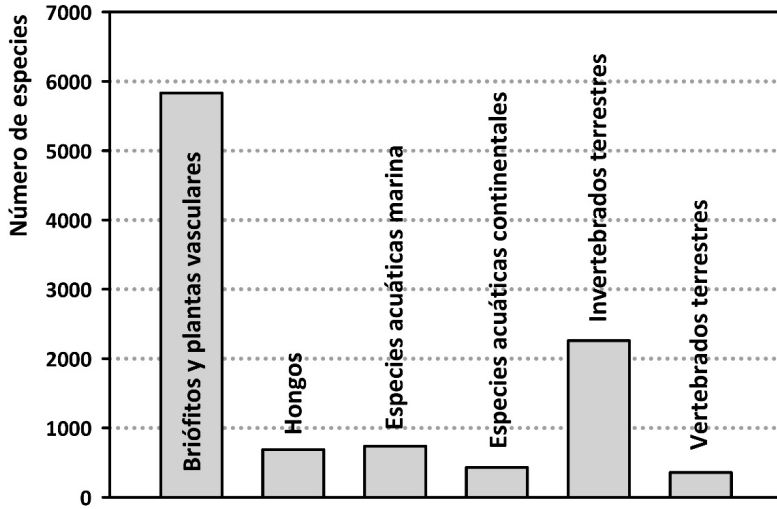


Figura 1. Número estimado de especies exóticas en Europa por grupos taxonómicos. Fuente: En base a los datos elaborados por Alien Invasive Species Inventory for Europe (DAISIE, 2009).

en el caso de los anfibios, el conocimiento se reduce a escasas especies, y su control se limita a su erradicación en puntos de agua localizados pero no a su total eliminación (Kraus, 2009).

Probablemente el caso de anuro invasor más estudiado a nivel mundial sea el del sapo de caña (*Rhinella marina*). Con distribución nativa al sur de Texas (Estados Unidos), ejemplares de esta especie fueron introducidos en Florida y Hawai para el control de plagas de insectos, así como en Australia en 1935 donde ha llegado a convertirse en un verdadero problema ambiental (Philips et al, 2007). Las predicciones iniciales sobre el alcance de la invasión de esta especie subestimaron su alcance y en la actualidad presenta una creciente capacidad expansiva más allá de sus puntos de introducción (Urban et al, 2007). Su rápida adaptación, velocidad de dispersión y el impacto registrado hace de esta especie, una de las más estudiadas y la convierte en un referente entre los estudios de anuros invasores. Se han registrados múltiples impactos directos y efectos en cadena sobre la biota nativa como consecuencia de su introducción. Debido a su toxicidad muchas de las especies afectadas son depredadores (como los varanos *Varanus* spp. (Doody et al, 2006) o especies de gatos marsupiales o Quoll (Burnett, 1997), que han sufrido altas tasas de mortalidad o adaptaciones conductuales derivadas con el fin de evitar el riesgo toxicológico que la especie invasora representa. En cuanto a los efectos sobre otros anuros, se han obtenido resultados contradictorios. En algunos estudios

parece ser el agente que facilita el incremento poblacional de especies nativas y en otros casos las especies nativas parecen resultar negativamente afectadas con severas reducciones en sus poblaciones, como ocurre con diferentes especies de anfibios anuros del género *Limnodynastes* (Williamson, 1999). Dos de los factores que explican la elevada capacidad invasora de esta especie son su rápida dispersión y su alta capacidad adaptativa.

Otra de las especies de anuros invasores más estudiados son las ranas coqui comunes. Nativas de Puerto Rico (*Eleutherodactylus coqui*) fueron introducidas accidentalmente en Hawái en los años 80. En su caso se han detectado diferentes efectos sobre la biota y comunidades nativas como la desestructuración de la red trófica como efecto derivado de su elevada abundancia y escasez de depredadores (Sin et al., 2008). Destaca también el gran coste económico observado como consecuencia de la contaminación acústica producida por sus descontroladas poblaciones que ha afectado a la industria hotelera y residencial entre otras (Lescure & Marty, 2000; Kraus et al., 1999; Kraus y Campbell, 2002). La capacidad invasora de esta especie parece estar relacionada con su abundancia y la ausencia de depredadores en su área de introducción.

En Europa hay varias especies de anfibios introducidos que actualmente se encuentran en expansión. Las más destacadas son la rana toro (*Lithobates catesbeianus*), la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*), múltiples especies del género *Pelophylax* (proveniente tanto de Europa oriental y nororiental y Asia) y el sapillo pintojo mediterráneo (*Discoglossus pictus auritus*) (Ficetola et al., 2007; Rebelo et al., 2010; Cayuela, Besnard, & Joly, 2013). Hoy en día el interés por la capacidad invasora del sapillo pintojo mediterráneo y su proceso de expansión es cada vez mayor debido al aumento del área colonizada por la misma y el desconocimiento sobre ésta, con algunos estudios de referencia (Richter-Boix et al., 2012; Escoriza & Boix, 2012, Escoriza et al., 2014). *D. pictus auritus* se introdujo a principios del siglo XX en Banyuls Sur Mer, Francia (Wintrebert 1908), y actualmente está aumentando cada año su gama de áreas adecuadas del noreste de España y el sureste de Francia (Franch et al., 2007; Martens & Veith 1987; Montori et al., 2007). Se han detectado efectos negativos a nivel comunitario que podría suponer la desestructuración de las poblaciones nativas y una reducción en la *fitness* de algunas de las especies residentes (Richter-Boix et al., 2012). A pesar de ello, la información sobre cuál podría ser el alcance de esta expansión y sus consecuencias sobre las especies nativas, así como las características que determinarían su éxito en el área nativa es limitada.

2.2. CAPACIDAD INVASORA EN ANFIBIOS

El estudio de la capacidad invasora o de qué factores conducen al establecimiento y éxito de invasión está escasamente desarrollado en el caso de la herpetofauna. Algunos autores se han centrado en parte de los factores que podrían explicar este éxito. Por ejemplo, Bomford et al. (2009) entre otros presenta el estudio del nicho climático de una especie en su área nativa como herramienta para predecir su éxito en el área de introducción siguiendo la teoría de conservación de nicho. Otros autores se centran en los rasgos biológicos y ecológicos de la especie para determinar su capacidad invasora¹. Incluso Meshaka en 2004 indica un grupo de características que definirían un modelo de herpeto invasor. Muchas de sus características se encuentran relacionadas con reproducciones tempranas y prolongadas en el tiempo, en una dieta generalista y una alta tolerancia a la perturbación derivada de la actividad humana. También Van Bocxlaer et al (2010) relaciona la capacidad de expansión y el rango de distribución de una especie de anuro con una serie de caracteres que definen el Optimal Range Phenotype (ORP). En este estudio indica como el sapo de caña posee la mayor parte de ellos, destacando su escasa dependencia del medio acuático o a la humedad, disponer de tamaños corporales grandes, una ubicuidad en el lugar de puesta, así como la efectiva explotación de los recursos durante su fase larvaria, entre otros. Aun así la determinación de qué factores determinan la capacidad invasora de un anfibio sigue siendo un tema complicado debido, como ya ha sido indicado anteriormente, a los diferentes requerimientos de cada especie dentro de la comunidad receptora y las condiciones de la misma.

2.2.1 Macroescala geográfica

El establecimiento y expansión de una especie introducida depende en gran medida de que el hábitat de la región receptora proporcione un entorno favorable. A la hora de comprender la distribución geográfica de las especies han de entenderse los requerimientos medioambientales de cada una, se trate de una especie nativa, naturalizada o invasora. En 1917 Joseph Grinnell introdujo el término nicho ecológico que englobaba todos aquellos factores ambientales que permitían la supervivencia y reproducción de una especie (Grinnell 1917 y 1924). Sin embargo esta definición únicamente tenía en cuenta factores abióticos como el clima o la topografía, entre otros.

Posteriormente, Hutchinson (1957) definió matemáticamente los conceptos de nicho fundamental y realizado. El nicho fundamental es definido como un volumen de n dimensiones dentro del espacio ambiental donde la especie mantiene poblaciones viables y persiste en el tiempo sin inmigración. Éste viene delimitado por la tolerancia fisiológica de las especies a lo largo de los gradientes ambientales. Las dimensiones del *nicho fundamental* definen las condiciones bajo las cuales los organismos pueden interactuar pero no define la naturaleza, intensidad ni dirección de esas interacciones. Las especies no suelen disponer de la totalidad de su *nicho fundamental* debido a factores abióticos, bióticos y de dispersión. Por ejemplo, un área predicha como idónea climáticamente para una especie por encontrarse en los rangos viables, puede no ser colonizada por la nueva especie debido a la presencia de depredadores o de barreras geográficas que impidieran su dispersión. La subsección del *nicho fundamental* que finalmente utiliza la especie se denomina *nicho realizado* y viene definido como conjunto de factores donde las especies viven y no son excluidas por interacciones bióticas (**Figura 2**). Los modelos de nicho ecológico tratan de definir el nicho de una especie a partir de aproximaciones empíricas o matemáticas que relacionan la distribución de ésta con las variables ecogeográficas que ocupan. Los ENM describen los rangos y las variables que limitan la presencia de las especies. A partir del supuesto de conservación de nicho que defiende que las especies no varían dicho nicho a diferentes escalas temporales ni espaciales, los ENM permitirían realizar predicciones por ejemplo de la distribución potencial de las especies, suponiendo que estos límites se conservan en el espacio y el tiempo. A pesar de la limitación que comporta definir el nicho ecológico de una especie invasora a partir del nicho ocupado (nicho realizado) por la especie en su área nativa, los ENM se utilizan ampliamente en el estudio y gestión de estas especies con resultados importantes (Peterson & Vieglais 2001; Roura-Pascual et al. 2004; Real et al. 2008; Ficetola et al. 2009).

Esta herramienta tiene múltiples aplicaciones en el estudio y gestión de las invasiones biológicas ya que permite realizar predicciones sobre la potencial distribución de la especie introducida en un rango concreto o en un futuro bajo diferentes escenarios de cambio climático por ejemplo. Pocos estudios detectan cambios en el nicho ocupado entre el área nativa y la invadida, siendo frecuentemente relacionado con estos factores limitantes o con una aclimatación y potencial aumento de la amplitud del nicho nativo (Petitpierre et al, 2012). A pesar de ello las predicciones basadas en el nicho climático de las especies se han convertido en uno de los primeros pasos necesarios a la hora de estudiar la capacidad invasora de una especie, dando pie al desarrollo de posteriores

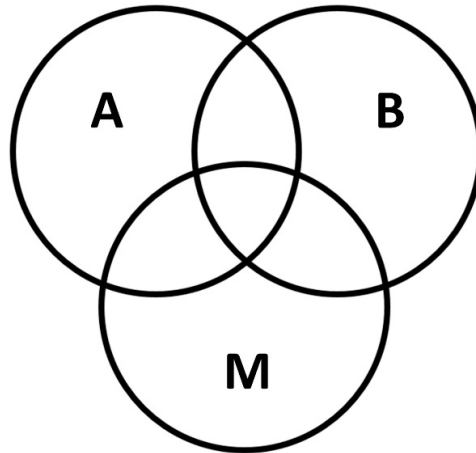


Figura 2. Representación gráfica de los diferentes nichos ecológicos basado en el diagrama BAM (Soberon & Peterson 2005). El círculo A representa la región geográfica donde la especie encuentra las condiciones abióticas adecuadas. Esta región puede ser considerada como la expresión geográfica del nicho fundamental. El círculo B representa la región donde la especie encuentra las interacciones bióticas adecuadas. Por último el círculo M corresponde a la región disponible por la especie teniendo en cuenta los factores históricos y limitaciones de dispersión (movimiento). El hábitat sólo es adecuado para la especie dentro del área común a los tres círculos, el cual se denomina nicho realizado.

estudios relacionados con la adaptación de dichas especies al nuevo medio y la toma de medidas de control de estas especies.

2.2.2. Mesoescala geográfica

Mientras que a macroescala el análisis del nicho climático parece fundamental a la hora de entender el establecimiento y expansión de las especies introducidas, a mesoescala el estudio de su anclaje o distribución dentro de la estructura natural de las comunidades es fundamental.

Los anfibios son animales bifásicos que dependen tanto del medio acuático como del terrestre. Utilizan el hábitat acuático en mayor o menor medida en función de la especie pero todos (salvo excepciones como algunos casos de viviparismo) dependen de él

como medio de reproducción y para el desarrollo de la fase larvaria (Wilburn 1980). Esta fase es la más vulnerable para los anfibios y de ella depende en gran parte su éxito posterior (Calef, 1973; Wells 2007). Estos ecosistemas presentan diferentes características en función de múltiples factores (localización, hábitat colindante, etc.), siendo el hidroperiodo un factor determinante en la organización de las especies de anfibios a nivel local (Wilbur 1997; Wellborn et al. 1996; Urban, 2004). Dentro del gradiente de temporalidad determinado por su hidroperiodo, las charcas se distribuyen a lo largo de un gradiente que abarca desde las efímeras, originadas por las precipitaciones y de escasa duración, hasta las permanentes que no se secan durante largos periodos de años. Basándose en estudios anteriores (Skelly 1996; Babbitt et al, 2003; Van Buskirk 2003) Richter-Boix y colaboradores (Richter-Boix et al, 2006) categorizan para los anfibios de ambientes mediterráneos estos ecosistemas en tres categorías: efímeras, temporales y permanentes. A pesar de la gran ubicuidad de algunas especies, éstas suelen presentar una distribución restringida a una porción del gradiente relacionada con su capacidad de responder a los diferentes factores abióticos y bióticos que varían a lo largo del sistema (Morand & Joly 1995; Snodgrass et al. 2000; Dayton & Fitzgerald 2001). A medida que el hidroperiodo del medio aumenta, la reducción de los recursos y el riesgo de desecación propio de los ambientes efímeros se reducen, pero en su lugar aumenta la amenaza por depredación y la competencia interespecífica en las charcas temporales (Smith 1983; Wellborn et al, 1996). En los ambientes permanentes la competencia decae de nuevo al incrementarse mucho la presión de los depredadores más agresivos o letales (**Figura 3**). Así pues los ambientes efímeros están ocupados normalmente por especies con una alta capacidad de aceleración del desarrollo y una eficaz gestión de los recursos, características que las definen como especies bien adaptadas a explotar los ambientes temporales y su principal riesgo, la desecación, pero con una respuesta menos eficaz a la presencia de depredadores. Por el contrario las especies de ambientes temporales y permanentes presentan una mayor respuesta plástica morfológica y conductual a la presencia de depredadores para minimizar sus riesgos, pero una menor capacidad plástica ante la desecación del medio (Schneider & Frost, 1996; Wellborn et al., 1996; Richter-Boix 2005, 2006; 2007a). El estudio de estas habilidades en una especie invasora definiría su hábitat idóneo a lo largo del gradiente, en el cual se esperaría que obtuviese mayor éxito reproductivo. La evaluación del hábitat ocupado por la especie invasora en el área invadida versus su hábitat idóneo en función de su respuesta a diferentes factores, permitiría analizar si la especie obtiene su máximo rendimiento en el área invadida o se ve reducida por algún factor.

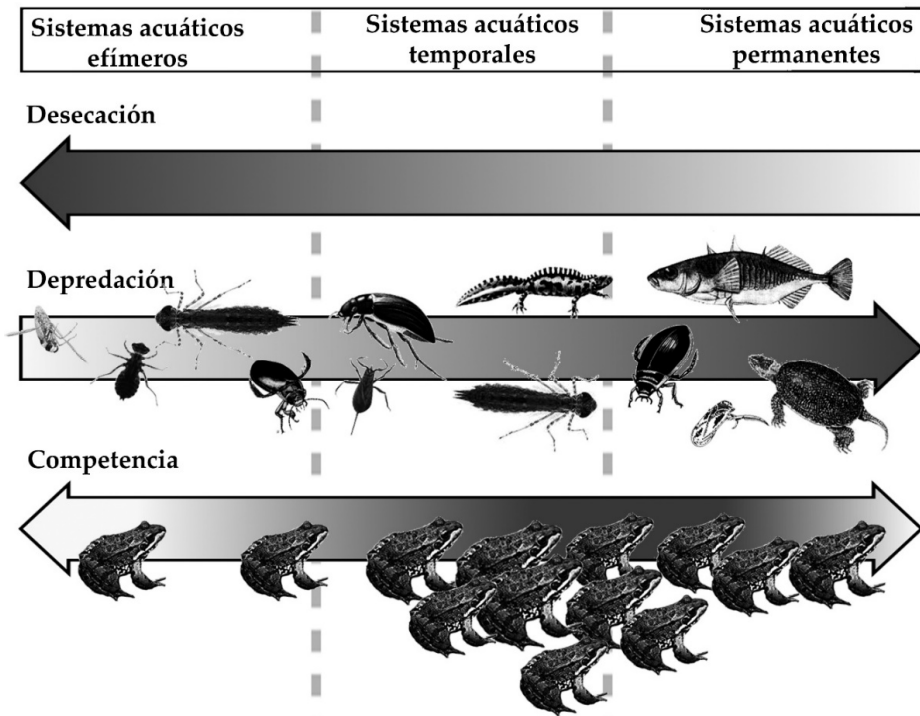


Figura 3. Esquema del gradiente de hidroperiodo y características asociadas en sistemas acuáticos. Las flechas gruesas indican efectos fuertes que limitan la distribución de especies. Flechas más delgadas indican efectos más débiles que no impiden la coexistencia de las especies que interactúan. Diagrama extraído de Wellborn, Skelly, & Werner (1996).

2.2.3 Microescala geográfica

Como ya se ha indicado, las especies de anfibios se estructuran en el territorio presentando una distribución diferencial en los diferentes tipos de medios acuáticos en respuesta a sus habilidades. La organización de las comunidades de anfibios dentro del mismo punto de agua suele responder al uso del nicho disponible que utiliza cada especie (microhábitat) y que puede estar limitado por las interacciones bióticas entre ellas. El nicho fundamental de una especie está definida como –siguiendo Hutchinson, 1957–, el hipervolumen multidimensional en el que una especie puede desarrollarse indefinidamente. Al igual que ocurría cuando lo definíamos para la macroescala geográfica éste se encuentra limitado por las interacciones bióticas (la competencia y la depredación principalmente) y abióticas (dimensión e hidroperiodo entre otras) que reducen el **nicho fundamental** a aquel que realmente utilizan y que se denomina **nicho**

realizado. Así, la organización y funcionamiento de las comunidades responden a las interacciones ecológicas entre organismos que coexisten en el tiempo y en el espacio junto con los factores abióticos. En particular, la competencia interespecífica ha sido objeto de estudio por diversos autores, no sólo como reguladora de las poblaciones y estructuradora de las comunidades (Heatwole, 1982; Schoener, 1983), sino también como fuerza motriz de los procesos evolutivos (Odum, 1986). Lack (1954) sostiene que la competencia es un proceso regulador debido a que los organismos se desarrollan hasta puntos cercanos a la capacidad de carga de los ecosistemas, motivo por el cual, son los recursos, o la competencia por los mismos, los que limitan a las poblaciones. Por su parte el *Principio de la Exclusión Competitiva* (Hardin, 1960) afirma que la competencia interespecífica y la supervivencia del más apto son las fuerzas que hacen que especies que utilizan los mismos recursos no puedan coexistir, y en definitiva asignan un rol protagónico a la competencia como fuerza estructuradora de comunidades. Todo esto dio lugar a una teoría desarrollada en base al paradigma de que especies con similares características morfológicas y ecológicas tienden a segregar alguna de las dimensiones del nicho ecológico. Sin embargo la exclusividad competitiva observada a nivel de microescala debería dar lugar con el tiempo a la no ocurrencia de las especies similares en un mismo hábitat, situación que sin embargo muchas veces no se cumple. La respuesta a ello puede deberse a sucesos que ocurren en la escala superior: la mesoescala y lo que se ha denominado metacomunidades dónde las especies poseen diferentes capacidades que les permiten de una manera dinámica coexistir (Richter-Boix et al, 2005, 2007c). Así por ejemplo, en el caso de las larvas de anfibios, podría ocurrir que la especie con menor capacidad competitiva se viera desplazada a otra parte del nicho por ejemplo explotando recursos tróficos infrautilizados (Tilman et al, 2004; Sol et al, 2012), variando su nicho reproductivo temporal o fenología (*efectos prioritarios** Wilbur, 1997; Wilbur & Alford, 1985; Knight et al 2009) o incluso modificando su selección de hábitat reproductivo (Cadi & Joly, 2003; Polo-Cavia et al, 2010). Las carencias en capacidades esenciales a una escala puede ser solventada con otras favorables a mayor escala: una escasa capacidad competidora puede compensarse con una mayor capacidad colonizadora de nuevos hábitats, permitiendo así la subsistencia de ambas especies a nivel de mesoescala y su coexistencia con frecuencia a nivel de microescala. El problema podría llegar en el caso de la introducción de especies invasoras con buena capacidad colonizadora y competitiva al mismo tiempo.

**efectos prioritarios*: conjunto de consecuencias derivadas de una reproducción más temprana de una especie con respecto a otra.

Es importante por tanto, conocer qué habilidades presentan las especies nativas y exóticas y cómo encaja en las poblaciones residentes, tanto a nivel de microescala como de mesoescala, para evaluar mejor la capacidad invasiva de la especie y sus posibles consecuencias sobre las especies nativas.

El nicho ecológico es multidimensional y la dimensión trófica, espacial y temporal son esenciales en su estudio (Pianka, 1982). Aunque existen autores que defienden que el nicho trófico es el menos importante (Calef, 1973; Heyer, 1976), otros destacan su importancia a la hora de explicar la organización de las comunidades en base a procesos de competencia (Pianka, 1981), depredación (Sih, Crowley, McPeck, Petranka, & Strohmeier, 1985) u otras interacciones indirectas (Werner & Peacor, 2003). En comunidades que ocupan sistemas cerrados y que coinciden en el nicho espacial (a escala del medio reproductivo) y temporal, el uso realizado de los recursos disponibles sería esencial para comprender el funcionamiento de la comunidad y el éxito de determinadas especies así como su capacidad invasora. Por un lado, la selección de un subnicho trófico frente a otro tiene importantes implicaciones para el desarrollo y éxito posterior de las especies. Y por el otro, la segregación o la alteración de la misma son reflejo de las interacciones interespecíficas que conforman las comunidades. Por ejemplo, la introducción de especies más competitivas puede desplazar a las especies nativas a nichos subóptimos obteniendo una menor *fitness*. Por otro lado, especies con gran capacidad de explotación de los recursos disponibles tendrán una mayor capacidad invasora que especies sin estas características.

3. ESPECIE DE ESTUDIO: *Discoglossus pictus auritus* Héron-Royer 1888

El objeto de estudio de esta tesis doctoral es el sapillo pintojo mediterráneo *Discoglossus pictus* subespecie *auritus* Héron-Royer 1888. Esta especie pertenece al género *Discoglossus* (Otth, 1837), representantes del clado Discoglossioidea. Las actuales especies de este género poseen una distribución circunmediterránea (Gasc et al., 1997; Real et al., 2005; Salvador, 1996; Vences y Grossenbacher, 2012; Zangari et al., 2006) y presentan importantes similitudes morfológicas y en la selección de hábitat (Knoepfler 1962; Capula 2007). La mayor parte de ellas, a excepción de *D. montalentii*,

seleccionan hábitats reproductivos efímeros o temporales (Salvidio et al. 1999). Hasta hace poco, dada su similitud morfológica, especialmente entre las especies del Mediterráneo occidental, éstas se consideraban como una única especie. Sin embargo en la actualidad se distinguen 6 especies (**Figura 4 y 5**), en base a los últimos estudios (Speybroeck et al, 2010; Pabijan et al., 2012; Vences et al, 2014): *D. nigriventer* Mendelssohn & Steinitz, 1943 en Israel (especie considerada extinta y redescubierta recientemente), *D. galganoi* Capula, Nascetti, Lanza, Bullini and Crespo, 1985 en la península ibérica (con dos subespecies: *D. galganoi jeanneae* y *D. galganoi galganoi*), *D. scovazzi* Camerano, 1878 en Ceuta, Melilla y Marruecos, *D. montalentii* Lanza, Nascetti, Capula and Bullini, 1984 en Córcega, *D. sardus* Tschudi, 1837 en Cerdeña, Córcega y algunas islas de menores dimensiones, y *D. pictus* Otth, 1837 en Sicilia, Malta, Túnez y Argelia (con dos subespecies *D. pictus pictus* y *D. p. auritus*, aunque Zangari et al, 2006 pone en duda esta validez subespecífica). Actualmente *D. p. auritus* presenta poblaciones introducidas en España y Francia, procedentes de Argelia (Busack, 1986; Veith & Martins, 1987; Glaw & Vences, 1991; García-París & Jockusch, 1999; Fromhage et al., 2003; Martínez-Solano, 2004; Martínez-Solano et al., 2004; Real et al., 2005; Zangari et al, 2006). En el área de distribución nativa no se observa simpatria de ésta y la especie del mismo género *D. scovazzi*. Tampoco las poblaciones introducidas de *D. p. auritus* presentan solapamiento en su distribución con las especies nativas presentes en la península ibérica (*D. g. galganoi* y *D. g. jeanneae*).

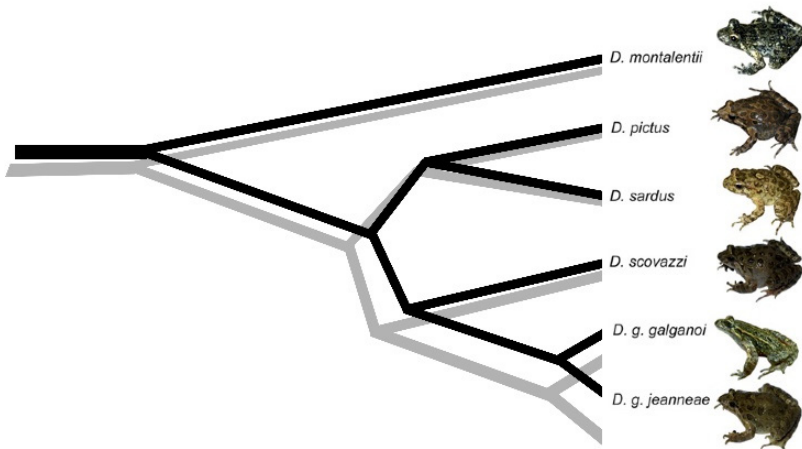


Figura 4. Relación filogenética de las especies de *Discoglossus* de la Mediterranea occidental en base a genes nucleares y mitocondriales. Pabijan et al, 2012.

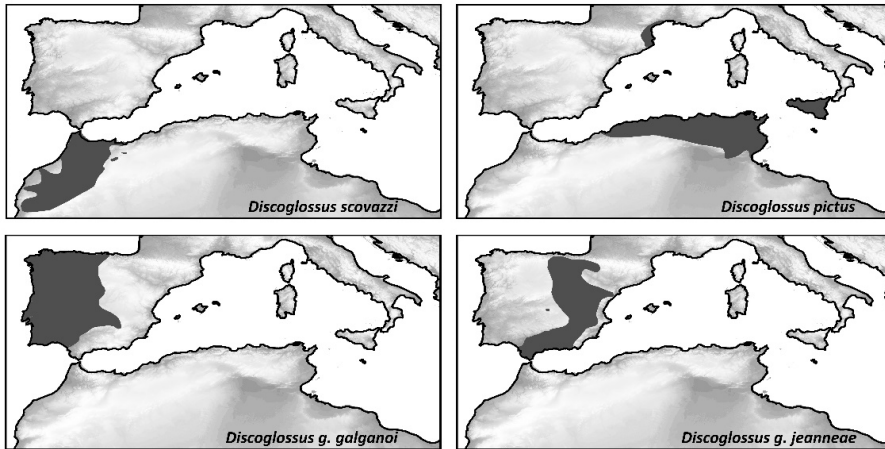


Figura 5. Distribución de 3 de las especies del género *Discoglossus* con zonas de contacto entre sí. Vences et al, 2014.

3.1. DISCOGLOSSUS PICTUS AURITUS

3.1.1. Distribución nativa

La distribución nativa de *Discoglossus pictus auritus* se encuentra en el Magreb occidental donde ocupa principalmente parte de Argelia, Túnez y Marruecos (Veith & Martens, 1997; Amor et al, 2013). Mientras en la parte nororiental del país se encuentra ampliamente extendida (desde la costa mediterránea a zonas semidesérticas), en el oeste parece extenderse más allá de la cuenca del río Moulouya y tanto su límite de distribución como su potencial contacto con *D. scovazzi* son un tema de interés en el estudio de la especie (Beukema et al, 2013; Pabijan et al, 2012). Su área de distribución se caracteriza por el clima mediterráneo, sin embargo, se encuentra estrechamente relacionada a zonas de clima semiárido, donde se localiza en poblaciones más fragmentadas en oasis situados al borde del desierto del Sahara (Ben Hassine & Nouria, 2012b; Mateo et al, 2013). Presenta poblaciones desde zonas costeras a nivel del mar hasta un máximo de 1800 m. sobre el nivel del mar en Argelia (Llorente et al, 2015).

En su rango nativo comparte parte de su distribución con otras especies de anfibios como los urodelos *Pleurodeles poireti* (Gervais, 1835), *Pleurodeles nebulosus* (Guichenot, 1850) y *Salamandra algira* Bedriaga, 1883 y los anuros *Bufo spinosus* Daudin, 1803, *Sclerophrys mauritanica* (Schlegel, 1841), *Bufo viridis* (Laurenti, 1768), *Hyla meridionalis*

(Boettger, 1874) y *Pelophylax saharicus* (Boulanger in Hartert, 1913). En el área se ha observado recientemente que existe cierto solapamiento trófico con *P. saharicus*, que podría conllevar procesos de competencia entre ambas especies (Samraoui et al, 2012). Estudios realizados en poblaciones nativas indican cierto oportunismo en su dieta, que sumado a su ubicuidad en el territorio, y un periodo reproductivo prolongado en el tiempo, podría favorecer su aclimatación y colonización de nuevas áreas (Ben Hassine & Nouira, 2009). A pesar de ser una de las especies más abundantes en la zona, junto con *P. saharicus*, se encuentra amenazada por la contaminación de los sistemas acuáticos y la intensificación agrícola a la que se ve sometida la región (Bosch et al, 2009; Ben Hassine & Nouira, 2012a).

3.1.2. Distribución en el rango de introducción

La distribución de la especie en el área introducida se localiza en el noreste peninsular y sureste de Francia (Geniez & Cheylan 1987; Llorente et al. 2015). Actualmente se ha expandido por el norte, en Francia, hasta las inmediaciones de la ciudad de Montpellier, mientras su límite meridional se localiza en la provincia de Barcelona, próximo a la población de Sant Celoni en el interior y entre Malgrat de Mar y Pineda de Mar en la costa. Esta área se caracteriza por pertenecer a la región biogeográfica «Mediterránea» principalmente y a la «Eurosiberiana», caracterizada por tener principalmente un clima Mediterráneo con influencias continentales y atlánticas. En su área de distribución introducida se registran unos valores de pluviosidad anual medios o altos (de 600 a 900 mm) y con temperaturas comprendidas entre los 14 y 15°C (Llorente et al., 1995, 1997). Aunque presenta poblaciones de forma excepcional a 980 metros sobre el nivel del mar en Girona o 1250 metros sobre el nivel del mar en Francia, la especie se distribuye principalmente desde el nivel del mar a los 500 metros de altitud (Llorente et al, 2015).

En el área introducida convive con tres especies de urodelos (*Salamandra salamandra*, *Triturus marmoratus* y *Lissotriton helveticus*) y siete de anuros (*Alytes obstetricans*, *Pelobates cultripes*, *Pelodytes punctatus*, *Hyla meridionalis*, *Bufo calamita*, *Bufo spinosus*, *Pelophylax perezii*).

Aunque las dos subespecies nativas de *D. galganoi* del área de introducción tienen zonas de contacto dentro de la península ibérica, donde parece darse un intercambio genético (Vences et al, 2014), la hibridación con *D. p. auritus* es poco probable ya que la distancia de la distribución de la especie invasora a las nativas es aún elevada, siendo de

momento, una mera hipótesis de futuro. Procesos similares de contaminación genética se han observado con anterioridad en la península ibérica provocando la consecuente pérdida de patrimonio genético como el detectado en *Pelophylax* (*P. lessonae*, *P. ridibundus*, *P. perezi*) (Graf et al., 1977; Uzzel, & Tunner, 1983; Arano & Llorente, 1995; Arano et al., 1995; Crochet et al., 1995).

3.1.3. Establecimiento y expansión en el rango de introducción

La primera evidencia de la presencia de la subespecie *D. p. auritus* en Europa data de 1906 (Wintrebert 1908) en Banyuls-sur-Mer (sur de Francia) (Knoeppler 1962, Martens & Veith 1987), aunque probablemente su introducción sea anterior (Montori et al, 2007; Llorente et al, 2015). En la actualidad se expande a través del sureste de Francia y el noreste de España, desde Montpellier en el norte, hasta la provincia de Barcelona en el sur (Knoepffler 1962; Geniez & Cheylan 1987; Martens & Veith 1987; Lanza 1989; Llorente et al 1995 & 1997; Barbadillo et al 1999; Salvador & García- París 2001; Fradet & Geniez 2004; Montori et al, 2007; Llorente et al, 2015). Su tasa de expansión general fue estimada en 2007 en 1.52 km/año en Cataluña y 1.3 km/año en territorio francés (Montori et al, 2007), obteniendo los máximos valores de 2.7 km/año hacia el sur.

Por otra parte, las diferentes translocaciones y/o nuevas introducciones registradas próximas al límite de distribución actual de la especie tanto en Francia (Sète, Montpellier y Lattes) como en España (Prat de Llobregat), pueden aumentar su rango de dispersión si se convierten en nuevos focos de expansión, como es el caso del Prat de Llobregat situado a 60 km de su límite de expansión y que ya registra crecimiento poblacional y signos de dispersión (Franch et al. 2007).

En el área invadida, ocupa principalmente estanques efímeros y temporales que comparte con especies oportunistas como el sapo corredor (*B. calamita*) y el sapillo moteado común (*P. punctatus*), principalmente. Estas especies presentan importantes similitudes con *D. pictus* en factores como la dieta o la fenología reproductiva (Montori et al, 2007; Escoriza & Boix 2012), lo cual prioriza el estudio de las consecuencias de dicho solapamiento o la comparativa entre las habilidades de estas especies entre sí. Aunque los primeros trabajos sugirieron que no existía interacción entre *D. pictus* y las especies nativas con las que se solapa en su actual distribución (Veith y Martens, 1987), estudios recientes han indicado lo contrario. La superposición espacial y de nicho trófico descrito por algunos autores entre la especie introducida y algunas nativas

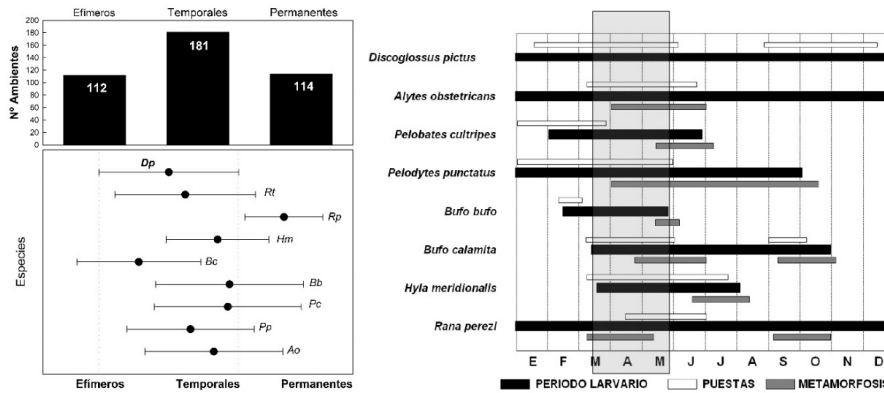


Figura 6. Gráficos de la distribución de los anuros del área introducida (NE peninsular) en el gradiente de ambientes acuáticos y fenología de las mismas durante el año. Datos extraídos del trabajo presentado por Montori et al (2007). A la izquierda: Dp: *Discoglossus pictus*, Rt: *Rana temporaria*, Rp: *Pelophylax perezi*, Hm: *Hyla meridionalis*, Bc: *Bufo calamita*, Pc: *Pelobates cultripes*, Pp: *Pelodytes punctatus*, Ao: *Alytes obstetricans*.

podría estar desencadenando procesos de competencia que podrían llegar a alterar el equilibrio de la comunidad de anfibios (Montori et al, 2007; Escoriza & Boix, 2012). Richter et al. (2012) observaron que la presencia de larvas de *D. pictus* provocaba la reducción de la *fitness* de algunas especies como *B. calamita*, reduciendo su tasa de supervivencia, peso y actividad, y aumentando la duración del período larvario. También se observó que las poblaciones de anfibios del área colonizada por *D. pictus* presentaban una estructuración en el gradiente de hábitats (en base al hidroperíodo) casi aleatoria, mientras que aquellas que ocupaban zonas a las que la especie aún no había llegado presentaban una organización espacial diferenciada. A pesar de ello, parece que las especies autóctonas continúan presentes y con buenas poblaciones en toda el área de distribución actual de *D. pictus* (Llorente et al, 2015).

Se trata de una especie oportunista con requerimientos ecológicos amplios y capaz de aprovechar las alteraciones humanas (Llorente et al, 2005). Al margen de su distribución y el tipo de ambientes que selecciona preferencialmente como hábitats reproductivos, se tiene poco conocimiento de la biología básica de la especie. Su período reproductivo es amplio, pudiendo reproducirse en varios momentos del año:

En cada cópula depositan un pequeño grupo de 20 a 50 huevos, pudiendo producir entre 500 a 1.000 huevos. La eclosión suele producirse en los 2 a 6 días posteriores y el desarrollo larvario completarse en un periodo comprendido entre 1 y 3 meses. La madurez sexual suele alcanzarse a los 2 o 3 años. Se encuentra catalogada bajo la categoría de preocupación menor (LC) por la UICN (2006) debido a su relativa amplia distribución y su elevada capacidad de tolerar una amplia gama de hábitats (Bosch et al., 2008).



Figura 7. Arriba, ejemplares de *Bufo calamita*, *Discoglossus pictus auritus* y *Pelodytes punctatus* (arriba). Ejemplar de *Discoglossus pictus auritus* (abajo). Fotografías de Marc Franch Quintana (arriba) y Olatz San Sebastián (abajo).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es explorar la capacidad invasora de *Discoglossus pictus* en Europa. Para ello se analiza los principales factores que determinan su éxito a macroescala, mesoescala y microescala geográfica englobados en los siguientes objetivos específicos:

1. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a macroescala

1.1. Análisis del proceso de invasión y capacidad de expansión de *Discoglossus pictus* en Europa

2. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a mesoescala

2.1. Evaluación de la respuesta de *Discoglossus pictus* a la desecación y la restricción de alimento y su efecto en el desarrollo pre- y post-metamórfico

2.2. Análisis comparativo de la respuesta de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Pelodytes punctatus* a la presencia de depredadores autóctonos y alóctonos y su efecto en el desarrollo pre- y post-metamórfico

3. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a microescala

3.1. Análisis comparativo de la capacidad de explotación de los recursos tróficos de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Bufo calamita* en co-ocurrencia y no ocurrencia.

3.2. Estudio de la estructuración de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Bufo calamita* en el nicho trófico de ambientes efímeros y análisis de la potencial interacción entre ambas especies en condiciones naturales.

Estos cinco objetivos específicos, son presentados como recopilación de los cinco artículos científicos (cuatro publicados y uno por enviar) ordenados en tres capítulos, en la presente tesis. Cada uno de los objetivos ha sido explorado a través de la

aplicación de diferentes metodologías (trabajo de campo y diseños experimentales de laboratorio en condiciones controladas) y técnicas (desde la modelación de nicho ecológico hasta el análisis de isótopos estables). La capacidad invasora de *D. pictus* se ha evaluado en parte a partir de estudios comparativos con las especies nativas con las que co-ocurre habitualmente. Este método es una de las opciones más utilizadas para el estudio de esta capacidad ya que permite maximizar la objetividad de las conclusiones (Alpert et al, 2006; Richards et al, 2006; Leishman et al, 2010). Los principales resultados y conclusiones de los diferentes manuscritos se unifican y presentan en una discusión general que trata de responder al objetivo general de la tesis.

A continuación se explica la importancia de cada uno de los factores estudiados para el análisis de la capacidad invasora de *D. pictus* en cada una de las escalas, así como se indica la sección, capítulo y artículo correspondiente a cada uno de los objetivos específicos.

SECCIÓN1. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a macroescala

CAPÍTULO 1: Análisis del proceso de invasión y capacidad de expansión de *Discoglossus pictus* en Europa

El objetivo de esta sección es analizar la capacidad invasora de *D. pictus* a nivel de establecimiento y expansión (Rago et al, 2012). El establecimiento de una especie invasora depende en gran parte de su historia de introducción. La cantidad de individuos introducidos, el número de introducciones realizadas y la distancia entre cada foco son algunos de los parámetros que propician el éxito de una especie introducida. Como ya se indicara estos parámetros son de difícil disponibilidad para la mayor parte de las introducciones. Por ello, en este trabajo centramos el estudio en explorar su capacidad invasora entendida como el alcance potencial de su expansión (*spatial spread*), su capacidad de expansión (*dispersal ability*), la plasticidad del nicho ocupado por la especie durante su introducción y expansión (*plasticity of realized niche*) y la continuidad potencial de su expansión en el futuro (*increasing/decreasing expansion of D. pictus at the future*). Para ello se han aplicado diferentes técnicas ampliamente utilizadas en las invasiones biológicas: la modelación del nicho realizado (environmental niche model - ENM) y técnicas de ordenación (PCAs).

Con el fin de determinar si *D. pictus* aún presenta hábitats con condiciones idóneas a su expansión en el área de introducción y el alcance de su invasión en la misma, se ha aplicado la modelación de nicho (ENM) a partir de su distribución actualizada. También se ha analizado la viabilidad de las nuevas introducciones o translocaciones registradas en el territorio y que podrían convertirse en nuevos focos de expansión acelerando así el proceso (*spatial spread*). Por otro lado, se ha explorado la potencial relación entre su tasa de expansión y la idoneidad de las condiciones encontradas durante la expansión. Se esperaría que especies con baja capacidad de expansión ralentizaran su invasión conforme el hábitat presentara condiciones más desfavorables. Siguiendo esta teoría la velocidad de expansión debería tener una clara relación positiva con la idoneidad del hábitat. En este caso, su potencial expansión se detendrá cuando la especie haya ocupado todos los hábitats adecuados. Por el contrario, una ausencia de relación o relación negativa indicaría que *D. pictus* presenta alta capacidad de invasión y es muy adaptable a los nuevos hábitats (*dispersal ability*). La plasticidad de nicho realizado por su parte indicaría que *D. pictus* es capaz de colonizar hábitats no ocupados anteriormente. Este carácter ha sido estudiado en base al análisis de las potenciales diferencias en el nicho realizado a lo largo de la progresión temporal y espacial de su invasión (*plasticity of realized niche*). Por último se evaluó si la expansión de la especie en un futuro se vería incrementada o, por el contrario, reducida teniendo en cuenta modelos predictivos de futuro con diferentes escenarios de cambio climático (*increasing/decreasing expansion of D. pictus at the future*).

Se ha considerado que estos cuatro caracteres son esenciales a la hora de caracterizar la capacidad invasora de una especie introducida a macroescala. Este trabajo corresponde al siguiente capítulo:

(CAPÍTULO 1) San Sebastián, O., Franch, M., Montori, A., Richter-Boix, A., Llorente, G. & Sillero, N. 2015. Exploring invasiveness of exotic species at macro-scale *Biological Invasions* (en prep.).

SECCIÓN2. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a mesoescala

Como ya se ha citado con anterioridad la distribución espacial de las especies de anuros en el gradiente de hidroperiodo suele responder a su habilidad a hacer frente a las amenazas o presiones que presenta cada sistema. *D. pictus* selecciona charcas temporales y efímeras como hábitat reproductivo, donde presenta una alta co-ocurrencia con otras especies nativas como *Bufo calamita* y *Pelodytes punctatus* (Escoriza & Boix, 2012; Richter-Boix 2012). El factor limitante en el éxito reproductivo de los anuros que ocupan las charcas efímeras es la desecación. En cambio a medida que alarga su hidroperiodo presentan menor amenaza de desecación y mayor de depredación o competencia con otras especies.

En esta sección se analiza la respuesta de *D. pictus* a la desecación y la presencia de depredadores con el fin de explorar las capacidades de la especie y entender su estructuración en el territorio. Para ello, se han diseñado una serie de experimentos bajo condiciones controladas de laboratorio distribuidos en diferentes capítulos.

CAPÍTULO 2: Evaluación de la respuesta de *Discoglossus pictus* a la desecación y la restricción de alimento y su efecto en el desarrollo pre- y post-metamórfico

El éxito reproductivo de las especies de anfibios que ocupan charcas efímeras está condicionado a su capacidad de llegar a completar la metamorfosis en el menor tiempo posible con las mayor *fitness* o mejores condiciones físicas. Habitualmente una reducción del tiempo de desarrollo larvario conlleva una reducción en su *fitness* posterior reflejada por ejemplo en los tamaños de los metamórficos o la acumulación de lípidos. A pesar de que muchos factores pueden afectar a este equilibrio (como la densidad larvaria, la temperatura o la presión por depredación), la habilidad de la especie a acelerar su crecimiento y la disposición de recursos suficientes parecen las más importantes. El efecto del tiempo de desarrollo y la dieta sobre el desarrollo larvario ha sido estudiado por separado, sin embargo ambos factores actúan de forma simultánea y en sinergia en la naturaleza. Durante la desecación del punto de reproducción las larvas están obligadas a acelerar su desarrollo mientras se da una reducción progresiva del espacio y los recursos y al mismo tiempo, un aumento de la densidad larvaria y descenso de los recursos disponibles.

El diseño experimental utilizado comprende diferentes grados de desecación y de restricción del alimento. Este trabajo permite entender la capacidad de esta especie

a enfrentarse a los principales problemas de los ambientes ocupados en el área invadida y los costes potenciales en su desarrollo.

(CAPÍTULO2) Enriquez-Urzelai, U., San Sebastián, O., Garriga, N. & Llorente, G. A. 2013. Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia*, 173:117–127.

CAPÍTULO 3: Análisis comparativo de la respuesta de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Pelodytes punctatus* a la presencia de depredadores autóctonos y alóctonos

Otro de los factores clave a la hora de entender la distribución de las especies dentro del gradiente de hidroperiodo es la respuesta a la depredación. Mientras especies que ocupan ambientes poco estables con hidroperiodos cortos tienen que presentar una respuesta efectiva a la desecación, especies que ocupan ambientes con hidroperiodos más largos suelen presentar mejores habilidades frente a la competencia o la depredación. La capacidad de respuesta al riesgo de depredación está relacionada con su comportamiento y morfología pre y post-metamórfica. Las especies nativas desarrollan habilidad de detección y mecanismos de defensa frente al depredador derivados de su co-evolución (Agrawal, 2001). Presumiblemente esta respuesta sería menos efectiva y evidente en especies introducidas recientemente y bajo la presión de depredadores alóctonos.

En este capítulo, hemos evaluado el comportamiento y la respuesta morfológica de *D. pictus* y la especie nativa *P. punctatus* ante los depredadores potenciales más frecuentes de los sistemas acuáticos del Mediterráneo en el área invadida. Los depredadores escogidos fueron: larvas de aeshna de origen nativo (*Anax* sp.) y dos especies alóctonas: gambusia (*Gambusia holbrooki*) y cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*). La respuesta de *D. pictus* a esta amenaza ayudará a entender su establecimiento en el área introducida y su distribución a escala regional.

(CAPÍTULO3) Pujol-Buxó, E., San Sebastián, O., Garriga, N. & Llorente, G. A. 2013. How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators? *Oikos*, 122: 19–29 pp. Doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20617.x

SECCIÓN 3. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a microescala

Habitualmente *D. pictus* y *B. calamita* se encuentran en co-ocurrencia en ambientes efímeros u ocupan ambientes vacíos por separado. Uno de los factores críticos a la hora de entender el establecimiento, éxito y potencial impacto de las especies introducidas es el conocimiento de cómo estas especies gestionan los recursos tróficos e interactúan con las especies nativas. Por un lado por el efecto clave del tipo de dieta sobre el desarrollo de las larvas de anfibios y la *fitness* de los metamórficos, y por otro por el efecto de la introducción de nuevas especies sobre la estructuración natural de las comunidades. La amplitud de nicho o la dieta generalista están frecuentemente relacionados con una alta capacidad invasora, derivado de su capacidad de explotación de diferentes tipos de nicho y por tanto su inherente capacidad de adaptación. Por otro lado la distribución de cada especie dentro del nicho trófico disponible puede llegar a definir su éxito reproductivo. Niveles altos dentro de la jerarquía trófica están relacionados con una mayor calidad de los recursos explotados y mejores resultados o *fitness*.

Estudios previos señalan la existencia de procesos de competencia entre *D. pictus* y la especie nativa *B. calamita* cuando se encuentran en el mismo hábitat reproductivo. Estos trabajos basan estas evidencias en caracteres morfológicos o diseños experimentales que indican una probable similitud en la dieta de ambas especies y una mayor capacidad competitiva de la especie alóctona sobre la autóctona. Si estos resultados se corroboran en condiciones controladas y naturales, *D. pictus* podría estar explotando de forma más efectiva los recursos disponibles y su presencia podría llegar a limitar el éxito de la especie nativa e incluso su supervivencia bajo condiciones desfavorables.

En esta sección se analiza la gestión de los recursos y potencial interacción entre ambas especies a través de dos trabajos (un diseño experimental y un estudio de campo) que se presentan en los siguientes capítulos.

CAPÍTULO 4: Análisis comparativo de la capacidad de explotación de los recursos tróficos de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Bufo calamita* en co-ocurrencia y no ocurrencia.

La cantidad y calidad (en términos de contenido proteico) de los recursos explotados tienen un efecto directo sobre el desarrollo larvario y *fitness* de los anfibios. Se ha estudiado en varias especies que una elevada cantidad o calidad de los recursos aumenta el tamaño final de los metamórficos y permite la reducción

del desarrollo larvario (Kupferberg 1997; Morey & Reznick 2000; Lind & Johansson 2007). En consecuencia, una buena gestión de los recursos permitiría hacer frente a la desecación y mejorar la *fitness* final de los metamórficos entendida como todos aquellos factores que mejoran el éxito de los metamórficos (como una tasa de supervivencia mayor, tamaños más grandes, mejora en la capacidad de locomoción, etc). Se esperaría por tanto que si la especie invasora presenta una gestión de los recursos más efectiva en el hábitat seleccionado que una especie nativa, ésta posea una alta capacidad de establecimiento en el hábitat ocupado. Por otro lado, el estudio de este factor por parte de ambas especies cuando comparten nicho trófico y cuando no lo comparten explicaría en parte el éxito de la especie alóctona en el área invadida y contribuye también a la determinación de su potencial efecto sobre la comunidad de anfibios nativa.

Este capítulo analiza la gestión de los recursos tróficos disponibles realizada por parte de *D. pictus* y la compara con la realizada por una especie nativa con la que co-ocurre habitualmente en los ambientes efímeros, *B. calamita*, así como compara dicha gestión cuando co-ocurren y cuando no lo hacen. La gestión de los recursos ha sido analizada a partir de dos medidas clave: actividad trófica (*feeding activity*) y selección de dieta (*food preference*). La actividad trófica es considerada como una medida de la capacidad de explotación de los recursos y también ha sido relacionada en multitud de trabajos con la capacidad competitiva (Holway, 1999; Smith et al. 2004). Por otro lado, conociendo el efecto de la calidad del alimento en el desarrollo y *fitness* del metamórfico la selección de dieta se trataría de un factor clave en el éxito reproductivo del anfibio invasor. Estos parámetros han sido registrados en dos diseños experimentales: uno que compara la gestión de los recursos de cada especie por separado y otro que lo hace en co-ocurrencia de ambas especies.

(CAPÍTULO4) San Sebastián, O., Pujol-Buxó, E., Garriga, N., Richter-Boix, A & Llorente, G. A. 2015. Differential trophic traits between invasive and native anuran tadpoles. *Aquatic Invasions* 10 (4): 475–484.

CAPÍTULO 5: Estudio de la estructuración de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Bufo calamita* en el nicho trófico de ambientes efímeros y análisis de la potencial interacción entre ambas especies en condiciones naturales

Numerosos estudios han intentado determinar la estructuración de las comunidades de anfibios bajo el punto de vista trófico. Los métodos tradicionales

han aportado resultados interesantes pero presentan grandes limitaciones. El contenido estomacal por ejemplo ha permitido la determinación de algunos items que forman parte de la dieta del animal, sin embargo no permite la detección de otros ni la asimilación que realiza de cada uno. La morfología larvaria por su parte relaciona ciertas características con el tipo de dieta explotada, así separa por ejemplo larvas bentónicas con nectónicas entre otras (McDiarmid & Altig, 1999). Sin embargo a partir de estos métodos no se consigue explorar en profundidad las interacciones entre especies con similitud de dieta (por ejemplo, entre diferentes especies pelágicas) o determinar la jerarquización trófica de cada especie en el nicho trófico disponible. En este sentido el análisis de los isótopos estables (SIA) del carbono y el nitrógeno es una herramienta muy útil y presenta grandes avances en el conocimiento de la ecología trófica de las especies. Su aplicación proporciona una visión integrada del consumo de los recursos realizada por cada especie, identificando estrategias tróficas y determinando la jerarquización trófica de las comunidades. Esta técnica ha demostrado un elevado potencial en amplitud de campos de la ecología como las invasiones biológicas (Gannes et al, 1998; Vander Zanden et al, 1999; Caut et al, 2008; Inger & Bearhop, 2008) y ha sido ampliamente aplicada en comunidades de otros grupos animales (Rubenstein & Hobson, 2004; Ramos & González-Solís, 2012).

Este capítulo tiene como objetivo explorar la estrategia trófica de *D. pictus* cuando comparte charcas efímeras y cuando no lo hace con la especie nativa *B. calamita* en condiciones naturales. Gracias a la aplicación de esta técnica se consigue completar los resultados obtenidos en laboratorio y nos acerca aún más a la realidad de la co-ocurrencia de ambas especies. En definitiva, en este trabajo analizamos la similitud de dieta entre ambas especies, su potencial interacción y determinamos si la introducción de *D. pictus* puede haber desestabilizado la comunidad nativa.

(CAPÍTULO5) San Sebastián, O., Navarro, J., Llorente, G.A. & Richter-Boix, A. 2015. Trophic strategies of a non-native and a native amphibian species in shared ponds. *PLoS ONE* 10 (6): e0130549.

INFORME DE LOS DIRECTORES

Els codirectors, Dr. Gustavo A. Llorente del Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i el i Dr. Àlex Richter-Boix del Department of Ecology and Genetics. Evolutionary Biology Center. Uppsala University fan constar que :

La doctoranda Olatz San Sebastián Mendoza, presenta dins de la seva tesi doctoral titulada: **“Análisis multi-escalar de la capacidad invasora de *Discoglossus pictus auritus* (Amphibia, Anura)”**, 5 treballs originals dels quals 4 estan publicats, i un en preparació. Tots els treballs son d’una gran qualitat científica i estan publicats en revistes de reconegut prestigi (incloses en el Science Citation Index) dins de l’àmbit de la Biologia Evolutiva, Zoologia i Ecologia.

A continuació es detallen els articles referits i els seus factors d’impacte:

1. San Sebastián, O., Franch, M., Montori, A., Richter-Boix, A., Llorente, G. & Sillero, N. 2015. Estimating the invasiveness of an introduced species with ecological niche modeling. *Biological Invasions* (in prep.).
Factor d’impacte (2014-2015) : 2,586
2. Enriquez-Urzelai, U., San Sebastián, O., Garriga, N.& Llorente, G. A. 2013. Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia*, 173:117–127.
Factor d’impacte (2013) : 3,248
3. Pujol-Buxó, E., San Sebastián, O., Garriga, N. & Llorente, G. A. 2013. How does the invasive/native nature of species influence tadpoles’ plastic responses to predators? *Oikos*, 122: 19–29 pp. Doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20617.x
Factor d’impacte (2013): 3,44
4. San Sebastián, O., Pujol-Buxó, E., Garriga, N., Richter-Boix, A & Llorente, G. A . 2015. Differential trophic traits between invasive and native anuran tadpoles. *Aquatic Invasions* 10 (4): 475–484.
Factor d’impacte (2015): 1,61
5. San Sebastián, O., Navarro, J., Llorente, G.A. & Richter-Boix, A. 2015. Trophic strategies of a non-native and a native amphibian species in shared ponds. *PLoS ONE* 10 (6): e0130549
Factor d’impacte (2015): 3,234

La contribució científica de la doctoranda ha estat molt important, com demostra que sigui la primera autora en tres d’ells . Ha participat activament en el disseny, mostreig i anàlisi de les mostres així com en la redacció científica de tots els treballs presentats.

Els co-directors informem que cap dels coautors participants en els articles que componen aquesta tesi han utilitzat implícitament o explícita caps d’aquests treballs per a l’elaboració de la seva propia tesi doctoral a excepció dels articles: Pujol-Buxó, E., San Sebastián, O., Garriga, N. & Llorente, G. A. 2013. How does the invasive/native nature of species influence tadpoles’ plastic responses to predators? *Oikos*, 122: 19–29 pp. Doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20617.x i San Sebastián, O., Pujol-Buxó, E., Garriga, N., Richter-Boix, A & Llorente, G. A . 2015. Differential trophic traits between invasive and

native anuran tadpoles. *Aquatic Invasions* 10 (4): 475–484 dels quals el coautor Eudald Pujol Buxó els utilitzarà en el marc de la seva tesi doctoral que serà presentada el proper any 2017.

Barcelona a 6 de juny de 2016.

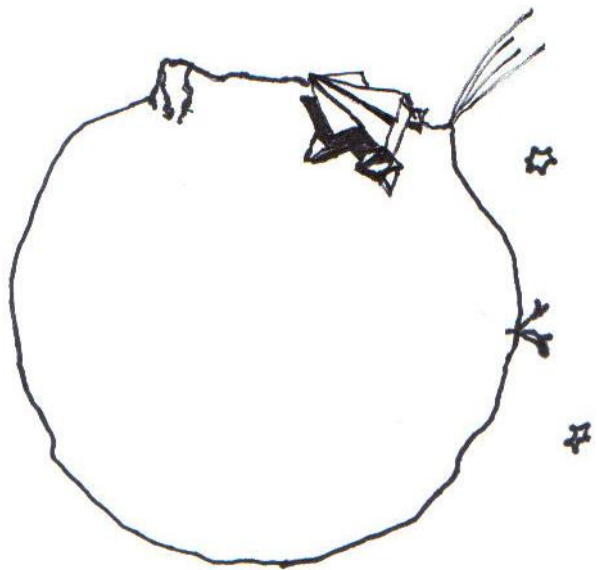
Dr. Gustavo A. Llorente

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia
i Ciències Ambientals
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona.



Dr. Alex Richter -Boix

Department of Ecology and Genetics
Evolutionary Biology Center
Uppsala University



SECCIÓN 1: Capacidad invasora de
***Discoglossus pictus* a macroescala**

Resumen del capítulo 1. Análisis del proceso de invasión y capacidad de expansión de *Discoglossus pictus* en Europa

San Sebastián, O., Franch, M., Montori, A., Richter-Boix, A., Llorente, G. & Sillero, N. 2015. Exploring invasiveness of exotic species at macro-scale *Biological Invasions* (en prep.).

Las especies exóticas invasoras (AIS, del inglés Alien Invasive Species) son una de las principales amenazas para la conservación de la biodiversidad. La capacidad invasora de una especie viene determinada por aquellos factores que aumentan su éxito en el área receptora. A macro-escala destacan principalmente los factores abióticos como el clima o la orografía frente a otros como la interacción con otras especies que actuarían a escalas más reducidas. El estudio de los factores que definen la capacidad invasora de una especie introducida es de elevado interés a la hora de predecir qué especies podrían convertirse en invasoras y cuál podría ser el alcance de su invasión. En Europa se han registrado un gran número de introducciones puntuales de especies alóctonas, aunque sólo algunas han conseguido un éxito real de colonización del territorio y de expansión. Especialmente reducido es el número de especies de anuros introducidos actualmente en expansión. Algunas especies de este grupo han sido ampliamente estudiadas, sin embargo se posee un conocimiento limitado sobre la expansión del sapillo pintojo meridional (*Discoglossus pictus*). Esta especie fue introducida hace más de 100 años en Banyuls de la Marenda (Francia) y hoy día, se encuentra en expansión tanto en Francia como en España, presentando poblaciones con un elevado número de efectivos. Considerando esta especie como modelo, este trabajo propone el análisis de cuatro factores esenciales a la hora de definir la capacidad invasora de una especie: *alcance potencial de su expansión, capacidad de expansión, plasticidad del nicho realizado y progresión de su expansión en un futuro*. Para ello, se han aplicado técnicas de modelación del nicho ecológico (MNE) y de ordenación (análisis de componentes principales). Los resultados obtenidos indican la presencia de hábitats idóneos para la especie en áreas aún no colonizadas por la misma, y por tanto la predicción de una progresión de su expansión en el futuro. *D. pictus* no presentó una reducción de su tasa de expansión en función de las condiciones encontradas, por lo que la fluctuabilidad de su tasa de expansión, podría responder a otros factores que actúan a escalas menores, como la presencia de corredores o hábitats reproductivos favorables. Por otro lado, se observó conservación del nicho climático en su introducción y la progresión de su

expansión, y por tanto una ausencia de plasticidad en el nicho realizado hasta la fecha. Por último se espera una mayor expansión en un futuro hacia hábitats idóneos de Europa, especialmente hacia el norte. Es recomendable una continuidad en el estudio de estos factores que pueden variar especialmente al alcanzar el límite de las áreas con condiciones favorables del área introducida.

Exploring invasiveness of exotic species at macro-scale

Olatz San Sebastián^{1,2,3*}, Marc Franch^{1,2}, Albert Montori¹, Álex Richter-Boix⁴, Gustavo A. Llorente^{1,5} & Neftalí Sillero²

¹ Section of Zoology and Anthropology, Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences. Faculty of Biology University of Barcelona (Spain).

² CICGE – Centro de Investigação em Ciências Geo-Espaciais Observatório Astronómico Prof. Manuel de Barros. University of Porto (Portugal).

³ Department of Herpetology, Aranzadi Zientzia Elkarte-Sociedad de Ciencias Aranzadi. Donostia-San Sebastián (Spain)

⁴ Department of Population Biology and Conservation Biology. Uppsala Universitet. Uppsala (Sweden)

Ecology and Management (F.E.M.) Research Group, Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences. University of Barcelona (Spain).

⁵ Institut de Recerca en Biodiversitat (IRBIO) Faculty of Biology University of Barcelona. Barcelona (Spain)

ARTICLE INFO

Keywords:

Invasiveness, spatial spread, dispersal ability, realized niche plasticity, climate change, ecological niche models, ordination techniques, *Discoglossus pictus auritus*, niche conservatism.

* Corresponding author.

email: olatzsanse@gmail.com

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals. Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 643, 08028 Barcelona, Spain

ABSTRACT

Invasive species are among the major dangers to environmental conservation. The study of species invasiveness is important to predict which of the introduced species are prone to be invasive, and to understand the biological characteristics that contribute to their success. In this work we explored invasiveness of the introduced frog *Discoglossus pictus*. We analyzed four characters of invasive species: *spatial spread, dispersal ability, realized niche plasticity, and the potential increase or decrease of its expansion at future*. For that, we applied ecological niche modeling (ENM) and ordination techniques in order to respond to the question if the species has arrived to its limit of potential distribution, and to define its dispersal ability to expand throughout unsuitable areas and new environmental conditions, showing plasticity on its realized niche. Finally we explored its expansion progression in the future. Our results indicated that *D. pictus* still has numerous suitable areas to colonize, which could increase in the future, mostly to the north, because of climatic change. The species presented good dispersal abilities to expand throughout more unsuitable areas with an expansion pattern described previously on other invasive species. The species introduction accomplished niche conservatism during introduction and relative realized niche plasticity during expansion process. This work, integrating four different methods to analyze invasiveness, highlights the relevance of study invasions as a dynamic process.

1. Introduction

Alien Invasive Species (AIS) are one of the primary current threats to biodiversity conservation (Shine, Williams, & Gündling, 2000; Mack et al. 2000; Clavero & García-Berthou, 2005;). The expansion process of introduced species is divided into three phases: introduction, establishment, and invasion. Only a small proportion of introduced species becomes invasive (Williamson 1993; Williamson and Fitter 1996; Vilà et al. 2008). The ability of each species to become established and be invasive is denominated invasiveness. Many studies have assessed the determinants of invasiveness to elucidate why some species succeed and others fail in establishing themselves and spreading over the range where they have been introduced (Jeschke and Strayer 2006; Richardson and Pyšek 2006; Pyšek and Richardson D. M. 2007; van Kleunen et al. 2010; Mahoney et al. 2015;

Moravcová et al. 2015). Invasiveness is related with the traits of the invading species that make them good colonists and with the recipient environments and communities' susceptibility to establishment by these species (invasibility). The ability of be invasive can be studied at different scales. While the establishment into native community is linked to the abilities for exploiting habitats and managing interactions with native species, colonization and dispersion need a higher scale ranges to explain invasive species distribution and expansion.

The invasion process may be tracked with the application of different methodological approaches (Gido et al. 2004; Brasher et al. 2006; Broennimann et al. 2007; Rödder et al. 2009; Jones et al. 2010). One of these methods is Ecological Niche Modelling (ENMs; (Peterson 2006; Sillero 2011). Concretely, correlative

methods relates known species' occurrences and environmental data (Peterson 2003; Roura-Pascual et al. 2004; Guisan and Thuiller 2005). ENMs are able to define the environmental preferences of species or to predict the probability of occupancy by them in a specific area (Ferrier and Guisan 2006). ENMs are used to predict potential distribution patterns of a species and are very useful to study the potential invasiveness of an introduced species (Roura-Pascual et al. 2004; Ficetola et al. 2009). For example, it is largely applied to determine the most likely areas to invasions (Peterson and Vieglais 2001; Real et al. 2008) and to make predictions for invasion progress in scenarios of future climate change (Fouquet et al. 2010; Bradley et al. 2010). Furthermore nowadays its application together with other techniques made possible to respond questions about dynamic of invasions and to deepen in the particular ecology of these species (Gallien et al. 2012; Petersen 2013). Concretely, ordination techniques are useful to quantify niche changes between different ranges or times (Petitpierre et al. 2012; Callen and Miller 2015; Tingley et al. 2015; Dellinger et al. 2016). These techniques order a set of datapoints (i.e. species occurrences) with respect to one or more axes which represent multiple information (i.e. environmental variables). The distance between datasets or their overlap represent their similitude or dissimilitude. Many ordination techniques exist (e.g. Correspondence Analysis or Non-metric Multidimensional Scaling) but the Principal Components Analysis is extensively applied to biological invasions at present (Guisan and Thuiller 2005; Petitpierre et al. 2012; Broennimann et al. 2012; Guisan et al. 2014).

There are few cases of amphibian species that have been described as invasive with negative impacts on native communities (Bucciarelli et al. 2014). Some punctual amphibian introductions have been reported although few of them reached the invasive phase. In Europe for example, there are several introduced amphibian species and in expansion such as *Lithobates catesbeianus*, *Xenopus laevis*, multiples species of *Pelophylax* (originating from both eastern and north-eastern Europe and Asia) and *Discoglossus pictus* (Pagano et al. 2001; Montori et al. 2007; Ficetola et al. 2007a; Blackburn et al. 2014; Llorente et al. 2015; De

Busschere et al. 2016). While invasion and invasiveness of some of them have been widely documented (McCoid and Fritts 1993; Schmeller et al. 2005; Ficetola et al. 2007a; Ficetola et al. 2010; Rebelo et al. 2010; De Busschere et al. 2016), it is not heretofore that the interest of painted frog (*D. pictus*) has increased (Pujol-Buxó et al. 2013; Richter-Boix et al. 2012; Cayuela et al. 2013; Enriquez-Urzelai et al. 2013; Escoriza et al. 2014). *Discoglossus pictus auritus* Héron-Royer 1888 was introduced at the beginning of the XX century in Banyuls Sur Mer, France (Wintrebert 1908) and currently is increasing its range annually to northeastern of Spain and southeastern of France (Martens and Veith 1987; Franch et al. 2007; Montori et al. 2007; Llorente et al. 2015). Some negative impacts have been identified in species as well (Richter-Boix et al. 2012) and particular traits have been identified to its invasive success at community level (Ruhí et al. 2012; Pujol-Buxó et al. 2013; Enriquez-Urzelai et al. 2013; Escoriza et al. 2014; San Sebastián et al. 2015a; San Sebastián et al. 2015b).

The present work aimed to obtain an integrative approach of *D. pictus* invasiveness at large scale by the application of two methods (ENM and ordination technique) in order to investigate whether *D. pictus* can be considered an invasive species. For this, we explore four aspects that explain the distribution and expansion ability of *D. pictus* in Europe:

(1) **Spatial spread** (Williamson and Fitter 1996). Has *D. pictus* arrived to its limit of distribution or still present available areas in Europe? Invasive species generally show high spatial spread in the introduced range (Kolar and Lodge 2001; Colautti and Macisaac 2004). *D. pictus* occupies 14 squares of the 50 × 50 km UTM European grid (Sillero et al. 2014). During its expansion new presence points outside the species distribution have been observed and one of them seems to turn in a new dispersal focus (Fradet and Geniez 2004; Franch et al. 2007; Montori et al. 2007). New introductions or translocations of introduced species can increase significantly its expansion range as it has been occurred for example with the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) (Carlton 1993; Johnson and Carlton 1996) or cane toad (*Rhinella marina*) in Australia (White and Shine 2009). Therefore exploring

the viability of new potential focus of species dispersion is essential to study their spatial widespread. In this work we aimed to examine whether the painted frog still has suitable areas as well as the potential to expand in the Iberian Peninsula, and the viability of introductions or translocations points as potential new dispersal focus applying ENM (Peterson 2006).

(2) **Dispersal ability** (Sakai et al. 2001). Is the dispersion ability of *D. pictus* affected by environmental conditions?

Which is *D. pictus* dispersal ability in the invaded region? The capacity of introduced species to disperse throughout new habitats is crucial for their invasion success. The dispersal ability can be measured by estimating the dispersal range of species in the invaded area and by testing their aptitude to expand throughout more or less suitable areas. Dispersal limitation often can be explained by range boundary disequilibrium with environmental niches, where populations slow their expansion as quickly as the environment becomes favorable (Tinner and Lotter 2006; Fang and Lechowicz 2006). Only a species with a high adaptable capacity would be able to occupy or expand throughout more unsuitable habitats. *D. pictus* expansion rate was estimated by Montori et al. (2007) until 2006 but nowadays this rate is outdated and there is not a specific study about the dispersion ability of painted frog in the invaded region. In order to determine whether the species has a good dispersal ability we explored the relationship between the habitat suitability of new invaded areas and the species expansion rate to colonize these areas. The species expansion rate was computed by Geographic Information System (GIS hereafter) tools and by the habitat suitability values of new colonized area by temporal periods of invasion modeling (ENM).

(3) **Realized niche plasticity** (Sax et al. 2007). Has the realized niche of *D. pictus* varied during species expansion process? Plasticity applied to different traits (phenotype, behavior, ecological niche, among others) is a character that contributes to the invasiveness of alien species (Baker 1974; Richards et al. 2006; González-Moreno et al. 2015). Biological invasions are dynamical processes and can be associated with variations in their environmental niches

(Broennimann et al. 2007; Urban et al. 2007; Kharouba et al. 2009; Hill et al. 2012). Although these shifts are a controversial issue because the different explanations of them (Petitpierre et al. 2012; Early and Sax 2014), realized niche plasticity can be indicative of their potential ability to colonize new or variable environmental conditions (Holt and Keitt 2005; Fitzpatrick et al. 2007; Pearman et al. 2008). Escoriza et al. (2014) indicated niche conservatism in *D. pictus* introduction but their models obtained contradictory results according to the selected threshold. In order to deepen in species introduction and invasion, we explored the potential variations in the environmental niche occupied by *D. pictus* under different conditions and invasion progression. The analysis was performed applying ordination methods (Broennimann et al. 2014; Guisan et al. 2014), from the perspective of their control distribution (native range) and during invasion process (invaded range).

(4) **Increasing/decreasing expansion of *D. pictus* at the future**. Would it expect a continuation of the expansion in the future? Environmental conditions change over time, and consequently, the spatial invasiveness of introduced species (Roura-Pascual et al. 2004; Pyron et al. 2008). Nowadays temporal change of climate is integrated in mostly future predictions of invasions progress (Jeschke and Strayer 2008a; Fouquet et al. 2010; Capinha et al. 2013). Climate change in the Mediterranean region (current distribution of the studied species) can modify drastically species' distributions (Sala, 2000; Giorgi, 2006). In this work we projected current models (ENM, based in the whole distribution) to future climatic change scenarios (2050 and 2070) and analyzed their differences to know if *D. pictus* will follow its expansion (increasing or decreasing).

The study of these four different aspects (spatial spread, dispersal ability, realized niche plasticity and increasing/decreasing expansion of *D. pictus* at the future) will contribute to better understand patterns and abilities of *D. pictus* invasion.

2. Methodology

2.1. Study species

The painted frog (*Discoglossus pictus*) is a native species to North Africa occurring in northeastern Morocco, northern Algeria and a little extension of Tunisia (Schleich, Kästle, & Kabisch 1996; Haffner 1997; Martínez-Solano 2009). In 1906 the painted frog was detected in a small village in continental Europe (Banyuls Sur Mer, France) (Wintrebert 1908), although the first evidences of its expansion appeared some years later (Knoepffler 1962; Kruyntjens et al. 1979; Geniez and Cheylan 1987; Martens and Veith 1987). According to Montori et al (2007), the distribution of *D. pictus* throughout southern France and northeastern Spain in 2006 was estimated in 7000 km² with a rate of expansion of 1.53 km/year \pm 0.8 km. The new populations were discovered outside its range of expansion in Spain and France that might act as new focus of dispersion (Fradet and Geniez 2004; Franch et al. 2007).

2.2. Study area

The study area selected to explore the *spatial spread*, the *dispersal ability*, the *realized niche plasticity* and the *resilience of expansion* encompassed all records of the species (*total distribution*). It covered *native range* (with Mediterranean and Subdesertic Biogeographical region in Africa and delimited by desert areas) and *introduced range*. The last was defined as a buffer with 200 km ratio from the first registered record of *D. pictus* introduction in Europe (Banyuls Sur Mer, France (Wintrebert 1908)). This mask comprised part of Iberian Peninsula and France, enclosing all species records in Europe. It corresponds to the Mediterranean and Alpine (only Pyrenees) biogeographical regions (defined by the European Environmental Agency). The study area is detailed in *Supplementary Material S1*.

2.3. Species datasets

To model the native distribution of *D. pictus*, we compiled 321 records from private datasets of Phillipe Geniez, Daniel Escoriza and bibliographic support (Bons and Geniez 1996; Brito et al. 2008; Brunet et al. 2009; Vences et al. 2014). In Europe we collected 1890 records from three databases: Spanish Herpetological Association Database, Groupe ornithologique du Roussillon Database, Catalan Herpetological Society Database, and two atlas published by Cheylan et al in

1987 and Geniez et al in 2012 (*Supplementary material, S2*). Distribution data were extracted with a spatial resolution of 1 km square.

All records were introduced in a georeferenced database, and displayed using the GIS ArcMap 9.3. All duplicates were removed. They were reviewed by experts and all records were pooled into different time-limited datasets. To explore the four questions addressed in the introduction, we used different datasets (*Supplementary Material S3*). All records (*total distribution*) of *D. pictus* were used to analyze *spatial spread* (except to calculate habitat suitability values of new potential focus of the species expansion) and to analyze *increasing/decreasing expansion of D. pictus at the future*. *Total distribution* included translocations located in Prat de Llobregat because the expansion was checked (Llorente et al, 2015). To evaluate its *realized niche plasticity* and *dispersal ability*, we pooled chronologically species records to simulate *D. pictus* invasion. To examine the *realized niche plasticity* we divided records in six periods: (1) all records of the species' *native range (time 0)*, (2) records located in the colonized area between the introduction data and 1974 (*News74*), (3) records located in the colonized area between 1974 and 1984 (*News84*), (4) records located in the colonized area between 1984 and 1994 (*News94*), (5) records located in the colonized area between 1994 and 2004 in invaded range (*News04*) and (6) records located in the colonized area between 2004 and 2014 (*News14*).

To explore the *dispersal ability* of *D. pictus*, we used the following datasets: (1) all records collected in the native and introduced ranges until 1964 (*time1*), (2) records collected in the native and introduced ranges until 1974 (*time2*), (3) records collected in the native and introduced ranges until 1984 (*time3*), (4) records collected in the native and introduced ranges until 1994 (*time4*) and (5) records collected in the native and introduced ranges until 2004 (*time5*). Also we used these datasets to estimate habitat suitability values of new potential focus (translocations or new introductions) of the species expansion when we explored *spatial spread* of the species.

We selected the limit of the first subset in the colonized area at 1974 and 1964 in order to have

sufficient numbers of occurrence records to perform PCA and realized models, respectively (Sillero 2010). Also the interval of 10 years between datasets respond to number of records availability. The absence of enough occurrences between first detections and 1964 corresponds to typical lag-phase of introduced species and the small number of observer herpetologists in this period. The first evidence of *D. pictus* presence dates in 1906. From 1906 to 1964, detections were very low, registering only 20 new observations in 58 years. Between 1964 and 1974 only 2 new occurrences were collected. Therefore we not used this dataset to compare between corresponding models (*realized niche plasticity*) but we do when we needed to extract habitat suitability values of some locations (*dispersal ability* or to explore viability of new focus of the species expansion in *spatial spread* aspect).

The last translocations/new introductions records were not included for species modelling.

2.4. Environmental data

The ecogeographical variables (EGVs) used to build the models and PCA included 3 topographical (altitude, aspect and slope) and 19 bioclimatics variables (*Supplementary Material S4*), obtained from the WorldClim database v.1.4 (Hijmans et al. 2005) with 30 arc-seconds resolution (1 km² approximately: www.worldclim.org). We selected variables according to their meaningfulness to the distribution and ecology of the painted frog (based in Montori et al. 2007). We used only variables with a Pearson correlation lower than 0.75 using the Band Collection Statistics tool of ArcToolbox (ESRI 2006).

2.5. Ecological niche models calculation

We generated 6 chronological sets of models using Maxent (Phillips et al. 2004; 2006) which requires presence-only data to explore *spatial spread*, *dispersal ability* and *increasing/decreasing expansion of D. pictus at the future*. Given that absences or pseudo-absences of an invasive species are not certain, techniques using presence-only data are appropriated to model species in expansion (Ficetola et al. 2007b; Rödder et al. 2009; Sillero et al. 2010; Reshetnikov and Ficetola 2011). We modeled total distribution of *D. pictus* and project it to Europe into several future climatic scenarios (*spatial*

spread and increasing/decreasing expansion of D. pictus at the future). In addition, we modeled the temporal sequence of the species' expansion for determinate the *D. pictus dispersal ability* and to calculate suitability of new focus of *D. pictus* (*spatial spread*).

Maximum Entropy is a general-purpose machine learning method (Phillips et al. 2004; Phillips et al. 2006b; Phillips and Dudik 2008; Elith et al. 2011), implemented in MAXENT 3.3.3k software (www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent). Maxent outperforms more established methods, either presence-only methods (BIOCLIM, DOMAIN) or presence-absence methods (GAM, GLM), especially when samples sizes are low (Elith et al. 2006; Hernandez et al. 2006; Wisz et al. 2008; Jeschke and Strayer 2008b). Maxent estimates the range of a species with the constraint that the expected value of each variable (or its transform and/or interactions) should match its empirical average, i.e. the average value for a set of sample points taken from the species-target distribution. Essentially, Maxent chooses the statistical model with the maximum entropy, that one with the most uniform distribution but still infers as accurately as possible the observed data, selecting at random uniformly distributed data from the background pixels. Here, background sample does not mean species absence at the selected sites, but rather provides a spectrum of the available conditions. As Maxent results depend on random background selection, the final model of each species was the average of 10 slightly different models (for a review on consensus models see Marmion et al. 2009). We ran Maxent with autofeatures (for establishing automatically the type of relationships among variables) and without duplicated records (only one sample per 1 km UTM), selecting at random 70% of the presence records as training data and 30% as test data. We tested model results with the area under the curve (AUC) of the receiver operated characteristics (ROC) plots (AUC values range from 0.0 to 1.0, with values of 0.5 considered as random models, over 0.7–0.9 as useful models, and above 0.9 as excellent models) (Liu et al. 2005). Finally, Maxent obtained an average percentage contribution of each environmental factor to the models. Maxent output represents the habitat suitability, ranging from 0.0 to 1.0. To obtain a presence-absence map (0/1, binary

data) we choose a *10 percentile training presence area* threshold used to study other invasive species (Ficetola et al. 2010; Jarnevič and Reynolds 2010; Reshetnikov and Ficetola 2011).

Additionally, we generated the multivariate environmental similarity surface (MESS) with the total distribution model at present and future. These maps let identify the sites where at least one variable has a value that is outside the range of environments over the reference set (Elith et al. 2010). These sites are represented by negative values. In order to improve our predictions, these sites were eliminated from resultant maps.

2.6. Ordination methods

Ordination methods allow projecting a multi-dimensional information corresponding to multiple data points onto two dimensional space where the patterns of data can be analyzed (Pielou 1984). These techniques are recommended to quantify niche overlap over other methods that use geographical projections derived from ecological niche models (Warren et al. 2008; Broennimann et al. 2012). For example, ordination methods for similarity test select random points in environmental space instead of geographical space, correcting potential association with geographical dimension.

To explore variation in *D. pictus* realized niche throughout the time we used the PCA-environmental approach proposed by Broennimann et al. (2012) and the functions and measures available in the *ecospat* R package. We performed a principal component analyses (PCA) that represented the environmental space which included total occurrences of species (*time 6* or *total distribution*).

2.7. Analysis tests

2.7.1. Spatial widespread

We projected the Maxent models with *D. pictus total distribution* to Europe and we calculated the contribution percentage of the environmental variables. The potential limits of the species expansion in Europe were represented by presence/absence habitat suitability maps, applying *10 percentile training presence area* threshold.

Moreover we evaluated the viability of recognized translocations or new introductions as new invasion focus assessing suitability of these located points. Locations with habitat suitability (HS) values higher than this threshold should taking as species new potential focus of the species invasion. Additionally, the sites with negative values in generated MESS were rejected to avoid erroneous conclusions.

2.7.2. Dispersal ability

The chronological expansion ratio of *D. pictus* was calculated as the increase of area occupied by species along years. We spatialized the species' distribution for each dataset drawing the Characteristic Hull Polygon (CHP) with *ArcGis 10.2* (Downs and Horner 2009). To obtain the surface of area gained we calculated graphically differences between CHPs of two consecutive datasets. We divided resulted area between lapsed time of each dataset to get expansion ratio. For example, we estimated expansion ratio of painted frog during 1994-1984 period as (CHP of 1994 – CHP of 1984)/10.

To explore *D. pictus* expansion ability, we applied a Simple Linear Correlation (Pearson r) between average of habitat suitability values of each CHPs and their respective expansion ratio. For this, we used CHP of occupied area in a certain period (CHP of 94, for example) as mask to extract the average of habitat suitability of previous model (generated with occurrences until 1984). We used the values of previous model because they represent the friction of environment to the species expansion throughout this area at the moment of expansion. Thus we supposed here that habitat suitability and permeability are synonyms, and that both are the inverse of ecological cost of expansion (Beier et al. 2007).

2.7.3. Realized niche plasticity

In order to respond if species suffered realized niche shifts during its introduction and expansion processes and if the species has the ability to colonize different habitats in the introduced area, we applied the niche similarity and equivalency tests (Broennimann et al. 2012; Warren et al. 2008) between two set of comparisons: native versus chronologically new invaded areas (e.g. *time 0* versus *News74*). The niche

similarity and equivalency tests evaluate if the observed overlap between two datasets (for example occurrences of native range and invaded range until 84) is similar when we reallocate the species occurrences randomly, merging two datasets. The niche similarity test compares niche overlap between two datasets with the overlap observed between the niche of one and the niches randomly selected in the environmental space occupied by the other (Warren et al. 2008; Broennimann et al. 2012). We performed equivalency and similarity tests using 100 replicates. Additionally, we calculated the Schoener's index (D) (Schoener 1970). This index has values between 0 (for niche completely different) to 1 (for identical niches).

Secondly, to explore the potential niche similarity and variations between native and invaded region (*time 0* versus *News74-News14*), we applied the approach proposed by Guisan et al. (2014). This framework decomposes the various elements of a niche change in quantitative measurements of niche shifts. Within this framework, we explored values of three indexes: *expansion* (E) that represents the proportion of niche occupied by species in introduced range but not in native range, *stability* (S) that represents the proportion of exotic niche overlapping with native ranges, and *unfilling* (U) that represents proportion of the native niche occupied by the species in the native range but still not occupied in the invaded range. For conduct all computations was used the *ecospat* package of R (R Development Core Team 2008) (Broennimann et al, 2014).

2.7.4. Increasing/decreasing expansion of *D. pictus* at the future

To study invasiveness resilience of *D. pictus* throughout the time, we projected to Europe the Maxent models corresponding to the total distribution of the studied species onto future climatic change scenario. Variables were extracted from the WorldClim series (2050 and 2070). As future scenarios, we used the general circulation model HadGEM2-ES, a model developed by the Met Office Hadley Centre, a United Kingdom based institute for climate prediction and research (<http://www.metoffice.gov.uk/climate-guide/science/science-behind-climate-change/hadley>), and the average of two Representative Concentration

Pathways rcp 45 and rcp85. These correspond to 4.5 and 8.5 W/m² radiative forcing values for the average of years between 2041 to 2060 (2050) and between 2061 to 2080 (2070), respectively. The temperatures would increase 1.4 and 1.8°C to rcp45, and 2 and 3.7 °C to rcp85 (corresponding to 2050 and 2070). On the other hand, the sea level would increase between 0.24 and 0.30 m. in 2050 (for two rcp) and 0.47 and 0.63 m. in 2070. Attending to MESS we rejected the sites with negative values as we proceed with *spatial spread* exploration.

3. Results

3.1. Spatial spread

The model for the total distribution of *D. pictus* obtained AUC values higher than 0.90. Mean Diurnal Range and Annual Precipitation variables represented the 42.9 and 30.1% (respectively) of variable contributions. Precipitation Seasonality and Mean Temperature of Coldest Quarter had moderated importance with 10.8 and 9.5 % of contribution. Suitable habitats are characterized by coast influence with stable temperatures and high pluviometry. The most suitable areas for *D. pictus* in the invaded region were found at low Mean Diurnal Range of temperature with values between 4 to 14°C and Annual Precipitation of 400 to 1200 mm.

The MESS indicated as non-analog climate the east of Europe, corresponding to continental, polar and alpine climates.

The total area predicted as suitable in Europe and Northern Africa for *D. pictus* presence was 790740 km². Our results indicated that the painted frog does not occupied all available habitats in Europe. The projection of our model to Europe and Northern Africa showed as potential distribution of *D. pictus* mainly all coastal areas of Mediterranean and Oceanic Biogeographical regions (Fig. 1). It should be absent in high altitudes and continental areas of Iberian, central Italian and Greece peninsulas where there are more extrem temperatures than coastal. Also in Eastern of Great Britain and Ireland there were non suitable climatic conditions to species presence.

All locations associated to translocations or new introductions for *D. pictus* in Europe registered higher

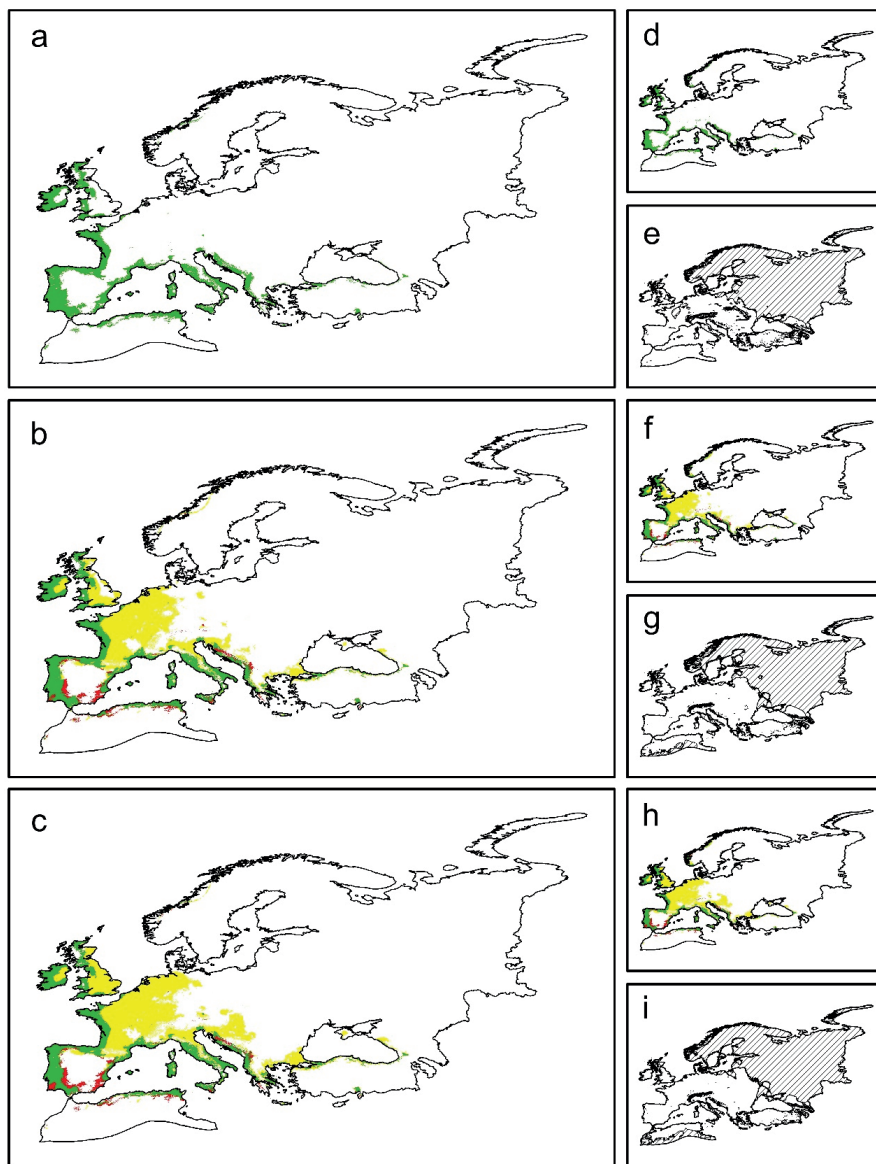


Figure 1. *D. pictus* total distribution models projection to Europe and north of Africa. At left: presence absence maps with non-analogue sites rejected for projection of (a) present, (b) 2050 and (c) 2070 model. At right presence absence maps of (d) present, (f) 2050 and (h) 2070 model. Under these corresponding (e) present model MESS, (g) 2050 model MESS and (i) 2070 model MESS. Black: presence area, white: absence area, dark gray: gained area and light gray: lost area. Diagonal bars represent negative values obtained by MESS.

Table 1. Suitability values and data of records located out of continuous colonized area of *D. pictus*.

LOCATION	DATA OF RECORDS	MODEL	THRESHOLD	MÍNIMUM	
				VALUE OF HS	FORECAST
Sète	1984	<i>time2</i>	0.1975	0.3233	Suitable area
Montpellier and Lattes	2004	<i>time4</i>	0.1654	0.2447	Suitable area
El Prat de Llobregat	2004	<i>time4</i>	0.1654	0.5827	Suitable area
Sète North	2014	<i>time5</i>	0.1618	0.5328	Suitable area

values of habitat suitability (HS) than their corresponding threshold (Table 1), indicating them as new potential focus of *D. pictus* expansion.

3.2. Dispersal ability

A general increase of expansion rate throughout the time was observed (Fig. 2). In the decade of 1964-1974, *D. pictus* was dispersed at rate of 7.98 km²/year while between 1974 and 1984, increased this rate to 21.05 km²/year. The highest increase was registered from 1984 being 147.10 km²/year at decade of 1984-1994 and 171.56 km²/year at decade of 2004-2014. In 1994 the expansion range registered a little decrease (118.91 km²/year) but followed to be high compared with first phase.

The species seems to expand independently of habitat suitability of the occupied area, without a relationship between its expansion rate and habitat suitability of the invaded area ($F_{1,3}=1.85$ $p=0.267$) (Fig. 2).

3.3. Realized niche plasticity

The niche equivalency test obtained significant results in any of the comparisons among native and all chronological invaded niche. The overlap among them were small with values of D comprised in the interval 0.03-0.06 (Table 2). Further, the similarity hypothesis was non rejected in the comparisons of all datasets ($p>0.05$).

The PCA counted for 66.74 % of the total variability in climate of study area (Fig. 3).

The comparisons among the realized niche of native range and the chronological expansion of *D. pictus* in the invaded region indicated that *expansion* index increased with time (from 0 to 0.09) while *stability* decreased (from 0.99 to 0.91). The *unfilling* index was

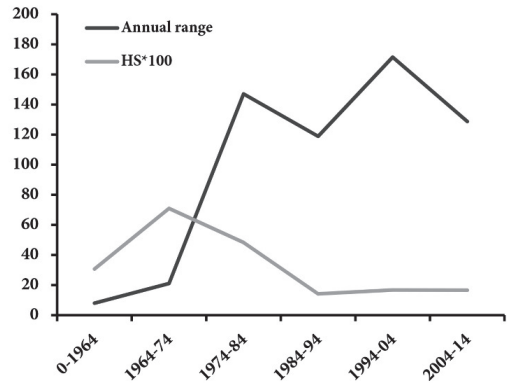


Figure 2. Annual range (km²/year) by each temporal datasets and habitat suitability of corresponding occupied area (HS*100).

high for all comparisons (between 0.91 to 0.73) and decreased with expansion progress (Table 2).

3.4. Increasing/decreasing expansion of *D. pictus* at the future

The MESS indicated as non-analogue the 48% of total studied area for the future. In both, 2050 and 2070, the non-analogue area located in east of Europe and the proximate areas to Sahara desert.

Our future predictions (without non-analogue areas) (Fig. 1) to 2050 and 2070 indicated an increment of suitable areas in Europe and North of Africa. *D. pictus* would gained a 15% of analogue area in 2050. This percentage increase in 2070 to 20% (Table 3).

The most gained area is located in Europe central where the temperatures would increase and be softer. The aridification of Southern Iberian Peninsula and Northern Africa should explain the absence of *D. pictus* in these areas. It seems that the lost locations in the future are also related with the intensification of temperatures and decrease of precipitations, being mainly some zones of Iberian Peninsula nearby to North of Africa.

Table 2. Schoener's index (D), Expansion, Stability and Unfilling indexes values and Equivalence and Similarity Test between invaded datasets and native datasets comparisons.

	D	EXPANSION	STABILITY	UNFILLING	EQUIVALENCY TEST	SIMILARITY TEST	
						2->1	1->2
Native-News74	0.0295	0.0024	0.9976	0.9147	0.0198	0.6139	0.1089
Native-News84	0.0345	0.0009	0.9991	0.8807	0.0198	0.7129	0.0891
Native-News94	0.0614	0.0001	0.9999	0.7892	0.0198	0.6337	0.1287
Native-News04	0.0549	0.0461	0.9539	0.6514	0.0198	0.8614	0.0495
Native-News14	0.0458	0.0918	0.9082	0.7331	0.0198	0.8416	0.0792

Table 3. Prediction of *D. pictus* potential distribution at present and future (2050 and 2070) without non-analogue area.

	ANALOGUE AREA (Km ²)	% OF TOTAL AREA	% OF ANALOGUE AREA
Present			
Absence	5218366	44	47
Presence	5840792	49	53
2050			
Absence	4276452	36	70
Lost area	111384	1	2
Gained area	908202	8	15
Presence	826583	7	14
2070			
Absence	3568209	30	63
Lost area	116827	1	2
Gained area	1146850	10	20
Presence	798189.83	7	14

4. Discussion

4.1. Expansion ability of *D. pictus*.

Does *D. pictus* presented dispersion ability in the invaded region? Our work showed a general increase of *D. pictus* expansion rate during its dispersion and absence of relationship between species expansion rate and environmental suitability of invaded habitat.

The absence of this relationship highlighted the good ability of *D. pictus* to expand throughout less suitable habitats found in the introduced range. However all values of suitability were high for colonized area and probably not offered enough resistance against *D. pictus* expansion. The potential causes of expansion rate variations could find in other factors, namely at smaller: population dynamics of invasions, the precipitation regimen during each dataset or ecological corridors presence, among others. Even so the relationship between expansion rate and habitat suitability/friction of new colonized areas could be a good tool to explain the invasiveness of other species.

D. pictus expansion process followed typical pattern of other invasive species of amphibians as cane toad (*Rhinella marina*). Firstly invasions present *lag-phase* that can be derived of different causes. Mack et al 2000 described four potential factors that can act combined or separated to explain this initial relay: reduced detectability of new population's growth, number and

location of initial introductions, natural selection among newly created genotypes adapted to the new conditions and stochasticity of environmental conditions. After years or decades, populations of a future invader accelerate growth rapidly, in both numbers and areal spread. Initially, invasive species *D. pictus* advanced at around 21 square kilometers for year between 1964 to 1974, while from 2004 to 2014 accelerated this spread to 129 square kilometers for year. Also *R. marina* increased its expansion range of progress of the toad invasion front about fivefold since the toads first arrived through time with initial low speed values and exponential increase of it (Phillips et al. 2006a). Some studies highlighted the higher ability to spread of individuals located in invasion front, increasing their speed through time (Travis and Dytham 2002; Phillips et al. 2008; Perkins et al. 2013). The ecological and evolutionary forces triggering the increment in the dispersal ability of these individuals can be diverse: from natural selection interacting with *spatial sorting* (Shine et al. 2011) that select individuals with high dispersal abilities (Perkins et al. 2013; Brown et al. 2014) to demographic characteristics (Caswell et al. 2003; Ellner and Schreiber 2012). The population at first period has small size which increase exponentially to find climatic, geographic or biologic barrier. Additional genetic and landscape studies are necessary to clarify which are the real causes of this acceleration.

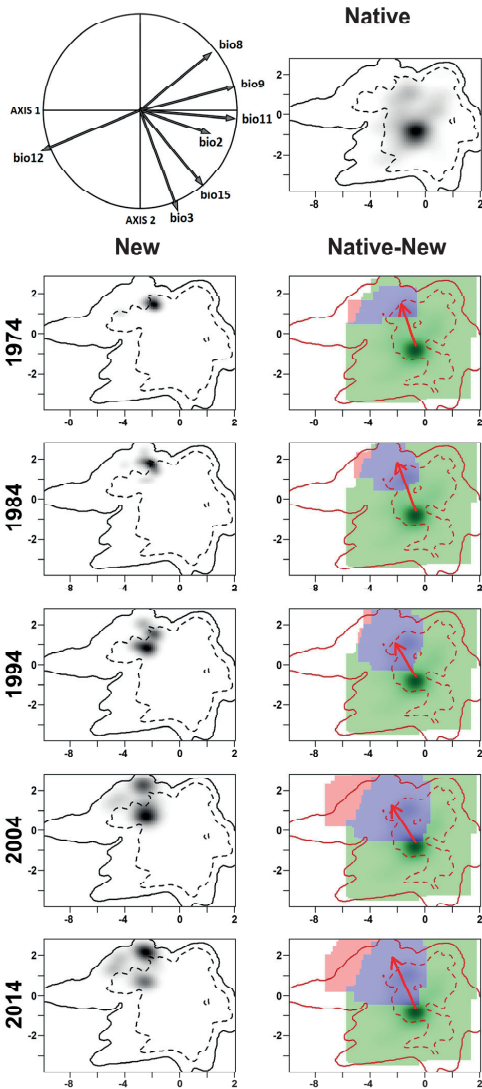


Figure 3. Representation of obtained results in *realized niche plasticity* analysis. The correlation circle illustrates the percentage of inertia explained by the axis and contribution of environmental predictors for loading them in PCA-env axes. Left: the greyscale plots show the occupancy of *D. pictus* (grey gradient) and environmental availability for corresponding dataset (solid line shows 100% of available climates; dashed line shows 50% most frequent available climates). Right: realized niche comparisons between the native and invaded ranges of *D. pictus*. Green pixels indicate the U values (native only), blue pixels the S values (common between native and invasive) and red pixels the E values (invasive only). The arrow indicates the change in the centroid of the niche.

4.2. Realized niche plasticity

Has realized niche of *D. pictus* varied during species expansion process? The results obtained in our study indicated that *D. pictus* invasion in Europe has been associated to general climatic niche conservatism. The application of new quantitative methods improved the exploration of niche variations registered by other methods and promoted great advances in invasions dynamics knowledge (Warren et al. 2010; Broennimann et al. 2012; Guisan et al. 2014). The differences showed by the equivalency tests and low values of overlapping (Schoener's index) per two ranges comparisons, but the absence of these in the similarity tests, highlighted the important influence of background on these differences (Warren 2012). The high values of niche *stability* between the two ranges compared (origin areas and introduce areas) support the hypothesis of niche conservatism initially proposed by Escoriza et al. (2014) for this species introduction.

Niche conservatism has been broadly observed in other invasive species of plants and vertebrates (Stiels et al. 2011; Petitpierre et al. 2012; Alexander 2013; Palaoro et al. 2013; Strubbe et al. 2015). *D. pictus* had been introduced in habitats with conditions few or marginally represented in realized niche of native range but inside it, as it is represented in Fig 2. The centroid was displaced to less frequent conditions but always remaining inside the realized niche. The native and invaded ranges are characterized by the same bioclimatic region (Mediterranean Climate), but with a deviance from *hot-summer Mediterranean climate* habitats to *warm-summer Mediterranean climate* characterized by lower annual thermal oscillations (attending to Köppen-Geiger classification (1990).

In the other hand, when we compared the realized niche of native and introduced range's during invasion progress, the niche expansion values (the proportion of realized niche occupied in the introduced range but not in native range) increased without a high decrease of the unfilling index (the area occupied only by the native model). These results suggest an increasing ability of *D. pictus* to colonize novel climatic habitats through space and time and therefore ecological niche plasticity. The ecological niche conservatism and shifts is a

controversial subject (Peterson et al. 1999; Wiens and Graham 2005; Peterson 2011). Traditionally, there was supposed that species maintained their niche at space and time and therefore invasive species should occupied habitats with similar conditions to their native range (Peterson 2003; Soberón 2007; Early and Sax 2014). Logically, a species introduced in similar conditions may obtain higher success and faster expansion than species introduced in different habitats. In this case, the niche conservatism could be an advantage. But species with realized niche mismatch during invasion are also linked to good colonize ability and high potential invasiveness (e.g. Broennimann et al. 2007; Fitzpatrick et al. 2007; Pearman et al. 2008). The multiple factors that could cause these niche shifts hamper to distinguish between real and unreal variations and to take clear conclusions about this. Despite *D. pictus* obtained low expansion value, we should consider the possibility that the realized niche in the native area represents only a portion of the physiological fundamental niche. The available climate conditions in native range only could encompass a subset of its fundamental niche (Schulte et al. 2012; Broennimann et al. 2012; Guisan et al. 2014). In the case of *D. pictus*, the Mediterranean sea in one side and the Sahara desert extreme conditions on the other, could function as strong geographic barrier reducing the capacity of the species to occupy different fundamental niches. Other biotic factors as predation or interaction with other species, could also limit the distribution of *D. pictus*. The study of the realized niche plasticity of invasive species is an intermediate step which indicate the colonize ability of them. The realized niche expansion detection motivate complementary works which clarify these variations causes, developing physiological or ecological studies to improve the models (Kearney et al. 2009; Kearney and Porter 2009; Jiménez-Valverde et al. 2011; Tingley et al, 2014). On the other hand, we should consider the potential effect of variables selection and number of occurrences used for niche comparisons (Callen and Miller, 2015). Statistical approaches to select variables could ignor relevant information and vary the expansion values registered in our work. The addition of more variables could define better the *D. pictus* niche boundaries and alter our results (Wendel, 1962). We recommended used the results of *D. pictus* expansion

index with caution and contrast them with other analysis.

In summary, we observed relative realized niche plasticity by *D. pictus*, but not a real shift. The good response to marginal climatic conditions available in the introduced range and expansion values suggest the species ability to colonize new areas in introduced range. This work is another evidence of the importance of the chronological studies of invasions. One of the most knowing example of underestimate predictions in anuran invasive species is the Australian cane toad (*R. marina*) (Urban et al. 2007; Tingley et al, 2014). These studies evidence the necessity of review predictive models, which have been generated only with native distributions.

4.3. *D. pictus* spatial spread in Europe and increasing/decreasing expansion of *D. pictus* at the future

Has species arrived to its limit of distribution or still present available areas in invaded area? Would this species follow to expand at the future? Invasive species term includes widespread species whereas non-invasive species should include only relatively localized species around the point of introduction (Kolar and Lodge 2001; Colautti and MacIsaac 2004). An important and necessary approach to define invasiveness of introduced species in certain moment is to distinguish between localized or expansive distributions. Our results showed that *D. pictus* still has suitable areas for its expansion throughout Europe at present. Also, the species potential distribution tends to increase throughout the time. Predictions at present indicated temperate climates with rainy winters as good habitats for its colonization. Future models follow a similar pattern, where *D. pictus* would expand to areas that minimize the effect of climatic changes. Araújo et al. (2011) evaluated the climatic change on potential distribution and conservation status of 292 terrestrial vertebrates of Iberian Peninsula. Concretely, amphibians seems to be specially affected and *D. pictus* would decrease its distribution area (see <http://www.wwf-spainsites.com/adaptacion/#inicio>). Our models showed similar results in the Iberian Peninsula but not at higher level, such as at European level. Despite *D. pictus* could suffer a reduction in their potential distribution in Spain located in the southern

areas of the peninsula, the species have not arrived to them yet and probably will not in the future attending to the estimated expansion rate. In France the number of suitable areas for the species increases to the north. In the rest of Europe these areas also increase as climate change progresses. Most of suitable areas present good connectivity and *D. pictus* seems to present good dispersal ability (as we observed in this work) that presumably would facilitate new areas colonization in the future. On the other hand, although the amount of annual rainfall can be the same or decrease slightly in the future, some authors indicate that the precipitations will be more concentrated and irregular in heavy precipitation events during the 21st century, favoring rain-generated floods emergence (Bates et al. 2008; Colomer et al. 2014) and reproductive activity of opportunistic species as *D. pictus* which occupies ephemeral ponds to complete its larval development. However this species in its native area could suffer a reduction of their suitable areas without connection with other favorable habitats. The models assume niche conservatism and change of species distribution because the climate change can be too fast for species adaptation (Bradshaw and Holzapfel 2006). However invasive species are characterized by fast adaptation to new conditions (Maron et al. 2004) and we need to consider the potential ability of this species to maintain these population despite climate change. Species with tolerance to changes in climatic conditions (e.g., good acclimation response or high temperatures tolerance) or high plasticity (e.g., shifts in their phenology or diurnal activity) could not disappear in this actual distribution (Deutsch et al. 2008; Somero 2010; Arribas et al. 2012). *D. pictus* seems to respond well to milder temperatures and higher precipitations in the invaded range but its response to climate change new conditions is unknown. *D. pictus* native distribution seems to be limited by aridity of Sahara Desert. The future predictions include an increase of general temperatures thus *D. pictus* could respond worse to these changes in the native area. Studies about its tolerance to high temperatures or aridity are recommendable in order to profound about *D. pictus* future.

On the other hand, the painted frog has registered some recent translocations or new introductions near the expansion range which could turn in new dispersal

focus and increase significantly the expansion range (Fradet and Geniez 2004; Franch et al. 2007; Montori et al. 2007). The large number of new locations of species in areas near the limit of expansion and high human pressure in actual distribution of species, could increase the expansion of this. The number and arrangement of translocations or new introductions influence on invasions spread. They proceed faster from among many small and widely separated dispersal focus compared with a single larger one (Moody and Mack 1988). Our results showed that the *D. pictus* dispersion promoted by man and recorded so far are at short distance from the boundary of the expansion which facilitates the climatic similarities and therefore its suitability for growth of the painted frog. On the other hand, the strong human activity of the actual invaded area could facilitate the transport of individuals to other locations or proportionate degraded or empty niches that could occupy easily invasive species (Hulme 2009).

5. Conclusions

5.1. Invasiveness of *D. pictus* in Europe

Our results allow us to respond to the initial questions that characterized the *spatial widespread, dispersal ability, ecological niche plasticity and increasing/decreasing expansion of D. pictus at the future*. In summary, *D. pictus* can still occupy suitable habitats in Europe and our predictions showed that the species could follow their expansion mainly for regions with stable and mild temperatures, and high values of precipitation. We expect that this distribution could increase at the future under a climatic change scenario. Its dispersion may be slow comparing with other anuran invasive species but its expansion range increase progressively, following typical pattern of invasive species expansion process. On the other hand, this species presents good ability to expand through habitats with more or less suitable climatic conditions although the studies at local scale can be necessary to take definitive conclusions. Lastly, *D. pictus* during its invasion has occupied habitats with different conditions throughout invasion progression although they are enclosed into the realized niche of species. Therefore, it has presented niche conservatism during its expansion. In general, species seems to present good abilities to expansion and has found suitable conditions

in invaded range that has allowed to obtain high success and therefore relative high invasiveness at large scale.

The use of historical and current data highlights that invasion is an ongoing dynamic process and demonstrates the necessity to include this factor in studies about invasiveness of species. Our results help better understand patterns, abilities and widespread of painted frog. It can highlight the characters that contribute to invasive denomination for *D. pictus* and approach to this species invasiveness.

Acknowledgements

Special thanks to Geniez, P. and Cheyland, M., and all those people and institutions that have provided records to use in this paper. We thank Santos, X. for comments on an earlier version of this paper and all people of CICGE, CIBIO and University of Porto for their technical support. This research was supported by: scholarship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya (AGAUR) 2011 BE1 00697 and scholarship from Fundació Montcellimar-University of Barcelona APIF2014.

References

Alexander JM (2013) Evolution under changing climates : climatic niche stasis despite rapid evolution in a non-native plant. *Proc R Soc B*. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1446>

Araújo MB, Guilhaumon F, Neto DR, et al (2011) Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático de la biodiversidad española 2. Fauna de vertebrados.

Arribas P, Abellán P, Velasco J (2012) La vulnerabilidad de las especies frente al cambio climático, un reto urgente para la conservación de la biodiversidad. *Rev ...* 21:79–84. doi: 10.7818/ECOS.2012.21-3.10

Baker HG (1974) The Evolution of Weeds. *Annu Rev Ecol Syst* 5:1–24.

Bates BC, Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP (2008) Climate change and water.

Beier P, Majka D, Jenness J (2007) Conceptual steps for designing wildlife corridor, www.corrid.

Blackburn TM, Essl F, Evans T, et al (2014) A unified classification of alien species based on the magnitude of their environmental impacts. *PLoS Biol* 12:e1001850. doi: 10.1371/journal.pbio.1001850

Bons J, Geniez P (1996) Amphibians and reptiles of Morocco (including Western Sahara), biogeographical atlas. Asociación Herpetológica Española, Barcelona

Bradley BA, Wilcove DS, Oppenheimer M (2010) Climate change increases risk of plant invasion in the Eastern United States. *Biol Invasions* 12:1855–1872. doi: 10.1007/s10530-009-9597-y

Bradshaw WE, Holzapfel CM (2006) Evolutionary response to rapid climate change. *Science* 312:1477–1478. doi: 10.1126/science.1127000

Brasher AMD, Luton CD, Goodbred SL, Wolff RH (2006) Invasion Patterns along Elevation and Urbanization Gradients in Hawaiian Streams. *Trans Am Fish Soc* 135:1109–1129. doi: 10.1577/T05-083.1

Brito JC, Feriche M, Herrera T, et al (2008) En los límites de su distribución: anfibios y reptiles paleárticos en el noroeste de Túnez. *Bol la Asoc Herpetol Esp* 19:75–82.

Broennimann O, Treier UA, Müller-Schärer H, et al (2007) Evidence of climatic niche shift during biological invasion. *Ecol Lett* 10:701–709. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01060.x

Broennimann O, Fitzpatrick MC, Pearman PB, et al (2012) Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Glob Ecol Biogeogr* 21:481–497. doi: 10.1111/j.1466-8238.2011.00698.x

Broennimann, O., Petitpierre, B., Randin, C. et al (2014) ecospat: Spatial ecology miscellaneous methods. R package version 1.0

Brown GP, Phillips BL, Shine R (2014) The straight and narrow path: the evolution of straight-line dispersal at a cane toad invasion front. *Proc R Soc B* 281:1–7.

Brunet P, Sanuy D, Oromí N, et al (2009) Anuran studies from Tiaret region, north-west of Algeria. *Boletín la Asoc Herpetológica Española* 20:68 – 72.

Bucciarelli GM, Blaustein AR, García TS, et al (2014) Invasion complexities: the diverse impacts of nonnative species on amphibians. *Copeia* 14:611–632. doi: 10.1643/OT-14-014

Callen ST, Miller AJ (2015) Signatures of niche conservatism and niche shift in the North American kudzu (*Pueraria montana*) invasion. 853–863. doi: 10.1111/ddi.12341

Capinha C, Larson ER, Tricarico E, et al (2013) Effects of climate change, invasive species, and disease on the distribution of native european crayfishes. *Conserv Biol* 27:731–740. doi: 10.1111/cobi.12043

Carlton JT (1993) Dispersal mechanisms of the zebra mussel. In: Schloesser TEN and DW (ed) *Zebra mussels: biology, impact, and control*. Lewis (CRCPress), Ann Arbor, Michigan, USA, pp 677–697

Caswell H, Lensink R, Neubert MG (2003) Demography and dispersal: life table response experiments. *Ecology* 84:1968–1978.

Cayuela H, Besnard A, Joly P (2013) Multi-event models reveal the absence of interaction between an invasive frog and a native endangered amphibian. *Biol Invasions* 15:2001–2012. doi: 10.1007/s10530-013-0427-x

Clavero M, García-Berthou E (2005) Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends Ecol Evol* 20:110. doi: 10.1016/j.tree.2005.01.003

Colautti RI, Macisaac HJ (2004) A neutral terminology to define “invasive” species. *Divers Distrib* 135–141.

Colautti RI, MacIsaac HJ (2004) A neutral terminology to define “invasive” species. *Divers Distrib* 10:135–141. doi: 10.1111/j.1366-9516.2004.00061.x

Colomer MÀ, Montori A, García E, Fondevilla C (2014) Using a bioinspired model to determine the extinction risk of *Calotropis asper* populations as a result of an increase in extreme rainfall in a scenario of climatic change. *Ecol Modell* 281:1–14. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2014.02.018

De Busschere C, Courant J, Herrel A, et al (2016) Unequal contribution of native South African phylogeographic lineages

- to the invasion of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, in Europe. *PeerJ* 4:e1659. doi: 10.7717/peerj.1659
- Dellinger AS, Essl F, Hojsgaard D, et al (2016) Niche dynamics of alien species do not differ among sexual and apomictic flowering plants. *New Phytol* 209:1313–1323. doi: 10.1111/nph.13694
- Deutsch CA, Tewksbury JJ, Huey RB, et al (2008) Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6668–6672. doi: 10.1073/pnas.0709472105
- Downs JA, Horner MW (2009) A characteristic-hull based method for home range estimation. *Trans GIS* 13:527–537. doi: 10.1111/j.1467-9671.2009.01177.x
- Early R, Sax DF (2014) Climatic niche shifts between species' native and naturalized ranges raise concern for ecological forecasts during invasions and climate change. *Glob Ecol Biogeogr* 23:1356–1365. doi: 10.1111/geb.12208
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, et al (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography (Cop)* 29:129–151.
- Elith J, Kearney M, Phillips S (2010) The art of modelling range-shifting species. *Methods Ecol Evol* 1:330–342. doi: 10.1111/j.2041-210X.2010.00036.x
- Elith J, Phillips SJ, Hastie T, et al (2011) A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Divers Distrib* 17:43–57.
- Ellner SP, Schreiber SJ (2012) Temporally variable dispersal and demography can accelerate the spread of invading species. *Theor Popul Biol* 82:283–298.
- Enriquez-Urzelai U, San Sebastián O, Garriga N, Llorente GA (2013) Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia* 173:117–27. doi: 10.1007/s00442-013-2596-9
- Escoriza D, Ben Hassine J, Boix D (2014) Factors regulating the invasive success of an alien frog: a comparison of the ecology of the native and alien populations. *Hydrobiologia* 730:127–138. doi: 10.1007/s10750-014-1827-3
- ESRI (2006) ArcGIS 9.2.
- Fang J, Lechowicz MJ (2006) Climatic limits for the present distribution of beech (*Fagus L.*) species in the world. *J Biogeogr* 33:1804–1819. doi: 10.1111/j.1365-2699.2006.01533.x
- Ferrier S, Guisan A (2006) Spatial modelling of biodiversity at the community level. *J Appl Ecol* 43:393–404. doi: 10.1111/j.1365-2664.2006.01149.x
- Ficetola GF, Coïc C, Detaint M, et al (2007a) Pattern of distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. *Biol Invasions* 9:767–772. doi: 10.1007/s10530-006-9080-y
- Ficetola GF, Maiorano L, Falcucci A, et al (2010) Knowing the past to predict the future: Land-use change and the distribution of invasive bullfrogs. *Glob Chang Biol* 16:528–537. doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.01957.x
- Ficetola GF, Thuiller W, Miaud C (2007b) Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species: the American bullfrog. *Divers Distrib* 13:476–485.
- Ficetola GF, Thuiller W, Padoa-Schioppa E (2009) From introduction to the establishment of alien species: bioclimatic differences between presence and reproduction localities in the slider turtle. *Divers Distrib* 15:108–116. doi: 10.1111/j.1472-4642.2008.00516.x
- Fitzpatrick MC, Weltzin JF, Sanders NJ, Dunn RR (2007) The biogeography of prediction error: why does the introduced range of the fire ant over-predict its native range? *Glob Ecol Biogeogr* 16:24–33. doi: 10.1111/j.1466-822x.2006.00258.x
- Fouquet A, Francesco G, Haigh A, Gemmill N (2010) Using ecological niche modelling to infer past, present and future environmental suitability for *Leiopelma hochstetteri*, an endangered New Zealand native frog. *Biol Conserv* 143:1375–1384. doi: 10.1016/j.biocon.2010.03.012
- Fradet V, Geniez P (2004) La répartition du Discoglossus peint *Discoglossus pictus* Otth, 1837 (Amphibien, Anoures, Discoglossidés) dans le Sud de la France: note sur sa présence dans le département de l'Hérault. *Bull la Société herpétologique Fr Y* 109:35–41.
- Franch M, Llorente A, Montori A, et al (2007) *Discoglossus pictus* beyond its known distributional range. *Herpetol Rev* 38:356–358.
- Gallien L, Douzet R, Pratte S, et al (2012) Invasive species distribution models - how violating the equilibrium assumption can create new insights. *Glob Ecol Biogeogr* 21:1126–1136. doi: 10.1111/j.1466-8238.2012.00768.x
- Geniez P, Cheylan M (1987) Atlas de Distribution des Reptiles et des Amphibiens du Languedoc-Roussillon. Montpellier. Glaw
- Gido KB, Schaefer JF, Pigg J (2004) Patterns of fish invasions in the Great Plains of North America. *Biol Conserv* 118:121–131. doi: 10.1016/j.biocon.2003.07.015
- Giorgi F (2006) Climate change hot-spots. *Geophys Res Lett* 33:L08707.
- González-Moreno P, Diez JM, Richardson DM, Vilà M (2015) Beyond climate: disturbance niche shifts in invasive species. *Glob Ecol Biogeogr* 24:360–370. doi: 10.1111/geb.12271
- Guisan A, Petitpierre B, Broennimann O, et al (2014) Unifying niche shift studies: insights from biological invasions. *Trends Ecol Evol* 29:260–269. doi: 10.1016/j.tree.2014.02.009
- Guisan A, Thuiller W (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecol Lett* 9:993–1009.
- Haffner P (1997) Bilan des introductions récentes d'amphibiens et de reptiles dans les milieux aquatiques continentaux de France métropolitaine. *Bull Fr Pêche Piscic* 344/345:155–163.
- Hernandez PA, Graham CH, Master LL, Albert DL (2006) The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography (Cop)* 29:773–785.
- Héron-Royer (1888) Essai sur la transmission de la coloration chez les Batraciens Anoures. *Bull la Société Zool Fr* 13:205–220.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, et al (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 25:1965–1978. doi: 10.1002/joc.1276
- Hill MP, Hoffmann A a., Macfadyen S, et al (2012) Understanding niche shifts: using current and historical data to model the invasive redlegged earth mite, *Halotydeus destructor*. *Divers Distrib* 18:191–203. doi: 10.1111/j.1472-4642.2011.00844.x
- Holt RD, Keitt TH (2005) Species' borders: A unifying theme in ecology. *Oikos* 108:3–6. doi: 10.1111/j.0030-1299.2005.13145.x

- Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *J Appl Ecol* 46:10–18. doi: 10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x
- Jarnevic CS, Reynolds L V. (2010) Challenges of predicting the potential distribution of a slow-spreading invader: A habitat suitability map for an invasive riparian tree. *Biol Invasions* 13:153–163. doi: 10.1007/s10530-010-9798-4
- Jeschke JM, Strayer DL (2008a) Usefulness of bioclimatic models for studying climate change and invasive species. *Ann of the New York Academy Sci* 1134:1–24.
- Jeschke JM, Strayer DL (2008b) Are threat status and invasion success two sides of the same coin? *Ecography (Cop)* 31:124–130.
- Jeschke JM, Strayer DL (2006) Determinants of vertebrate invasion success in Europe and North America. *Glob Chang Biol* 12:1608–1619. doi: 10.1111/j.1365-2486.2006.01213.x
- Jiménez-Valverde A, Peterson AT, Soberón J, et al (2011) Use of niche models in invasive species risk assessments. *Biol Invasions* 13:2785–2797. doi: 10.1007/s10530-011-9963-4
- Johnson LE, Carlton JT (1996) Post-establishment spread in large scale invasions: dispersal mechanisms of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecology* 77:1686–1690.
- Jones CC, Acker SA, Halpern CB (2010) Combining local- and large-scale models to predict the distributions of invasive plant species. *Ecol Appl* 20:311–326. doi: 10.1890/08-2261.1
- Kadmon, R., Farber, O. & Danin, A. (2003) A systematic analysis of factors affecting the performance of climatic envelope models. *Ecological Applications*, 13, 853–867
- Kearney M, Porter W (2009) Mechanistic niche modelling: Combining physiological and spatial data to predict species' ranges. *Ecol Lett* 12:334–350. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01277.x
- Kearney M, Porter WP, Williams C, et al (2009) Integrating biophysical models and evolutionary theory to predict climatic impacts on species' ranges: the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Australia. *Funct Ecol* 3:528–538.
- Kharouba HM, Algar AC, Derr JT (2009) Historically calibrated predictions of butterfly species' range shift using global change as a pseudo-experiment. *Ecology* 90:2213–2222.
- Knoepfler LP (1962) Contribution à l'étude du genre *Discoglossus* (Amphibiens, Anoures). *Vie Milieu* 13:1–94.
- Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol Evol* 16:199–204.
- Kruyntjens B, Paulissen P, Bank J (1979) Herpetologische waarnemingen in Midden- en Zuid-Frankrijk. *Lacerta* 38:1–8.
- Liu C, Berry PM, Dawson TP, Pearson RG (2005) Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography (Cop)* 28:385–393.
- Llorente GA, Montori A, Pujol-Buxó E (2015) El sapillo pintojo mediterráneo (*Discoglossus pictus*) en la península ibérica. *Bol la Asoc Herpetol Española* 26:15–19.
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, et al (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecol Appl* 10:689–710. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Mahoney PJ, Beard KH, Durso AM, et al (2015) Introduction effort, climate matching and species traits as predictors of global establishment success in non-native reptiles. *Divers Distrib* 21:64–74. doi: 10.1111/ddi.12240
- Marmion M, Parviainen M, Luoto M, et al (2009) Evaluation of consensus methods in predictive species distribution modelling. *Divers Distrib* 15:59–69.
- Maron JL, Vila M, Bommarco R, et al (2004) Rapid evolution of an invasive plant. *Ecol Monogr* 74:261–280. doi: 10.1890/03-4027
- Martens H, Veith M (1987) Considerations on origin and chorology of *Discoglossus pictus* Otth, 1837 in the eastern Pyrenees. In: Van Gelder JJ, Srijbosch H, Bergers PJM (eds) In: Proceedings of the 4th Ord. Gen. Meeting S.E.H. in Nijmegen 1987. pp 267–269
- Martínez-solano Í (2009) Sapillo pintojo mediterráneo – *Discoglossus pictus*. In: Salvador, A., Martínez-Solano I (Eds.). (ed) Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, pp 2–13
- McCoid MJ, Fritts TH (1993) Speculations on colonizing success of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Pipidae), in California. *South African J Zool* 28:59–61.
- Montori A, Llorente GA, Richter-Boix Á, et al (2007) Colonización y efectos potenciales de la especie invasora *Discoglossus pictus* sobre las especies nativas. *Munibe* 25:14–27.
- Moravcová L, Pyšek P, Jarošík V, Pergl J (2015) Getting the right traits: Reproductive and dispersal characteristics predict the invasiveness of herbaceous plant species. *PLoS One* 10:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0123634
- Pagano A, Crochet PA, Graf J, et al (2001) Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Glob Ecol Biogeogr* 10:433–441.
- Palaoro A V., Dalosto MM, Costa GC, Santos S (2013) Niche conservatism and the potential for the crayfish *Procambarus clarkii* to invade South America. *Freshw Biol* 58:1379–1391. doi: 10.1111/fwb.12134
- Pearman PB, Guisan A, Broennimann O, Randin CF (2008) Niche dynamics in space and time. *Trends Ecol Evol* 23:149–58. doi: 10.1016/j.tree.2007.11.005
- Perkins TA, Phillips BL, Baskett ML, Hastings A (2013) Evolution of dispersal and life history interact to drive accelerating spread of an invasive species. *Ecol Lett* 16:1079–1087. doi: 10.1111/ele.12136
- Petersen MJ (2013) Evidence of a climatic niche shift following North American introductions of two crane flies (Diptera; genus *Tipula*). *Biol Invasions* 15:885–897.
- Peterson AT, Soberón J, Sánchez-Cordero V (1999) Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* 285: 1265–1267
- Peterson AT (2006) Uses and requirements of ecological niche models and related distributional models. *Biodivers Informatics* 59–72.
- Peterson AT (2003) Predicting the geography of species' invasions via ecological niche modeling. *Q Rev Biol* 78:419–33. doi: 10.1086/378926
- Peterson AT (2011) Ecological niche conservatism: A time-structured review of evidence. *J Biogeogr* 38:817–827. doi: 10.1111/j.1365-2699.2010.02456.x
- Peterson AT, Vieglais DA (2001) Predicting species invasions using ecological niche modeling: new approaches from

- bioinformatics attack a pressing problem. *Bioscience* 51:363–372. doi: 10.1641/0006-3568(2001)051[0363:PSIUEN]2.0.CO;2
- Petitpierre B, Kueffer C, Broennimann O, et al (2012) Climatic niche shifts are rare among terrestrial plant invaders. *Science* 335:1344–1347.
- Phillips BL, Brown GP, Travis JMJ, Shine R (2008) Reid's paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. *Am Nat* 172 Suppl :S34–48. doi: 10.1086/588255
- Phillips BL, Brown GP, Webb JK, Shine R (2006a) Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature* 439:803. doi: 10.1038/439803a
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006b) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Modell* 190:231–259. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026
- Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography (Cop)* 31:161–175.
- Phillips SJ, Dudík M, Schapire RE (2004) A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: *Twenty-first international conference on Machine learning - ICML '04*. ACM Press, New York, New York, USA, p 83
- Pielou E (1984) *The interpretation of ecological data*. John Wiley & Sons, New York
- Pujol-Buxó E, San Sebastián O, Garriga N, Llorente GA (2013) How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators? *Oikos* 122:19–29. doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20617.x
- Pyron RA, Burbrink FT, Guhier TJ (2008) Claims of potential expansion throughout the U.S. by invasive python species are contradicted by ecological niche models. *PLoS One* 3:e2931. doi: 10.1371/journal.pone.0002931
- Pyšek P, Richardson D. M. (2007) Traits associated with invasiveness in alien plants: where do we stand? In: Nentwig W. (ed) *Biological invasions, Ecological Studies*. Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg, pp 97–125
- Real R, Márquez AL, Estrada A, et al (2008) Modelling chorotypes of invasive vertebrates in mainland Spain. *Divers Distrib* 364–373. doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00419.x
- Rebelo R, Amaral P, Bernardes M, et al (2010) *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), a new exotic amphibian in Portugal. *Biol Invasions* 12:3383–3387. doi: 10.1007/s10530-010-9757-0
- Reshetnikov AN, Ficetola GF (2011) Potential range of the invasive fish rotan (*Perccottus glenii*) in the Holarctic. *Biol Invasions* 13:2967–2980. doi: 10.1007/s10530-011-9982-1
- Richards CL, Bosserdorf O, Muth NZ, et al (2006) Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecol Lett* 9:981–993. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00950.x
- Richardson DM, Pyšek P (2006) Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Prog Phys Geogr* 30:409–431. doi: 10.1191/0309133306pp490pr
- Richter-Boix A, Garriga N, Montori A, et al (2012) Effects of the non-native amphibian species *Discoglossus pictus* on the recipient amphibian community: niche overlap, competition and community organization. *Biol Invasions* 15:799–815. doi: 10.1007/s10530-012-0328-4
- Rödger D, Schmidlein S, Veith M, Lötters S (2009) Alien invasive slider turtle in unpredicted habitat: A matter of niche shift or of predictors studied? *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0007843
- Roura-Pascual N, Suarez A V, Gómez C, et al (2004) Geographical potential of Argentine ants (*Linepithema humile* Mayr) in the face of global climate change. *Proc R Soc London Ser B-Biological Sci* 271:2527–2534. doi: 10.1098/rspb.2004.2898
- Ruhí A, San Sebastián O, Feo C, et al (2012) Man-made Mediterranean temporary ponds as a tool for amphibian conservation. *Ann Limnol - Int J Limnol* 48:81–93.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, et al (2001) The population biology of invasive species. *Annu Rev Ecol Syst* 32:305–32.
- Sala OE (2000) Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* (80-) 287:1770–1774. doi: 10.1126/science.287.5459.1770
- San Sebastián O, Navarro J, Llorente GA, Richter-Boix Á (2015a) Trophic Strategies of a Non-Native and a Native Amphibian Species in Shared Ponds. *PLoS One* 10:e0130549. doi: 10.1371/journal.pone.0130549
- San Sebastián O, Pujol-Buxó E, Garriga N, et al (2015b) Differential trophic traits between invasive and native anuran tadpoles. *Aquat Invasions* 10:475–484. doi: 10.3391/ai.2015.10.4.10
- Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, et al (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Evolution (N Y)*. doi: 10.1016/j.tree.2007.06.009
- Schleich HH, Kästle W, Kabisch K (1996) *Amphibians and reptiles of North Africa: biology, systematic, field guide*, Koeltz Sci. Koenigstein, Germany
- Schmeller DS, Seitz A, Crivelli A, Veith M (2005) Crossing species' range borders: interspecies gene exchange mediated by hybridogenesis. *Proc Biol Sci* 272:1625–1631. doi: 10.1098/rspb.2005.3129
- Schoener TW (1970) Nonsynchronous spatial overlap of lizards in patchy habitats. *Ecology* 51:408–418.
- Schulte U, Hochkirch A, Lötters S, et al (2012) Cryptic niche conservatism among evolutionary lineages of an invasive lizard. *Glob Ecol Biogeogr* 21:198–211. doi: 10.1111/j.1466-8238.2011.00665.x
- Shine C, Williams N, Gündling L (2000) *A guide to designing legal and institutional frameworks on alien invasive species*. Gland, Switzerland Cambridge and Bonn
- Shine R, Brown GP, Phillips BL (2011) An evolutionary process that assembles phenotypes through space rather than through time. 8–11.
- Sillero N (2011) What does ecological modelling model? A proposed classification of ecological niche models based on their underlying methods. *Ecol Modell* 222:1343–1346. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2011.01.018
- Sillero N (2010) Modelling suitable areas for *Hyla meridionalis* under current and future hypothetical expansion scenarios. *Amphibia-Reptilia* 31:37–50.
- Sillero N, Barbosa A, Martínez-Freiría F, Real R (2010) Los modelos de nicho ecológico en la herpetología ibérica: pasado, presente y futuro. ... la Asoc Herpetológica ... 2–24.

- Sillero N, Campos J, Bonardi A, et al (2014) Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia* 35:1–31. doi: 10.1163/15685381-00002935
- Soberón J (2007) Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species.
- Somero GN (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *J Exp Biol* 213:912–920. doi: 10.1242/jeb.037473
- Stiels D., Schidelko K., Engler J.O. et al. (2011) Predicting the potential distribution of the invasive Common Waxbill *Estrilda astrild* (Passeriformes: Estrildidae). *Journal of Ornithology*, 152, 769–780.
- Strubbe D, Beauchard O, Matthysen E (2015) Niche conservatism among non-native vertebrates in Europe and North America. 321–329. doi: 10.1111/ecog.00632
- Tingley R, Vallinoto M, Sequeira F, Kearney MR (2014) Realized niche shift during a global biological invasion. *PNAS* 111:10233–10238. doi: 10.1073/pnas.1405766111
- Tingley R, Thompson MB, Hartley S, Chapple DG (2015) Patterns of niche filling and expansion across the invaded ranges of an Australian lizard. *Ecography (Cop)* 38:1–11. doi: 10.1111/ecog.01576
- Tinner W, Lotter AF (2006) Holocene expansions of *Fagus sylvatica* and *Abies alba* in Central Europe: where are we after eight decades of debate? *Quat Sci Rev* 25:526–549.
- Travis JMJ, Dytham C (2002) Dispersal evolution during invasions. *Evol Ecol Res* 4:1119–1129.
- Urban MC, Phillips BL, Skelly DK, Shine R (2007) The cane toad's (*Chaunus* [Bufo] *marinus*) increasing ability to invade Australia is revealed by a dynamically updated range model. *Proc Biol Sci* 274:1413–9. doi: 10.1098/rspb.2007.0114
- van Kleunen M, Dawson W, Schlaepfer D, et al (2010) Are invaders different? A conceptual framework of comparative approaches for assessing determinants of invasiveness. *Ecol Lett* 13:947–58. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01503.x
- Vences M, Pous P De, Nicolas V, et al (2014) New insights on phylogeography and distribution of painted frogs (*Discoglossus*) in northern Africa and the Iberian Peninsula. *Amphibia-Reptilia* 35:305–320. doi: 10.1163/15685381-00002954
- Vilà M, Valladares F, Traveset A, et al (2008) Invasiones biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid
- Warren DL (2012) In defense of “niche modeling.” *Trends Ecol Evol* 1–4. doi: 10.1016/j.tree.2012.03.010
- Warren DL, Glor RE, Turelli M (2008) Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution (N Y)* 62:2868–2883. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00482.x
- Warren DL, Glor RE, Turelli M (2010) ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography (Cop)* 33:607–611. doi: 10.1111/j.1600-0587.2009.06142.x
- Wendel JG (1962) A problem in geometric probability. *Mathematica Scandinavica*, 11:109–111.
- White AW, Shine R (2009) The extra-limital spread of an invasive species via “stowaway” dispersal: Toad to nowhere? *Anim Conserv* 12:38–45. doi: 10.1111/j.1469-1795.2008.00218.x
- Wiens JJ, Graham CH (2005) Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:519–539. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102803.095431
- Williamson M (1993) Invaders, weeds and the risk from genetically manipulated organisms. *Experientia* 49:219–224.
- Williamson MH, Fitter A (1996) The characters of successful invaders. *Biol Conserv* 78:163–170. doi: 10.1016/0006-3207(96)00025-0
- Wintrebert P (1908) Présence à Banyuls-sur-Mer (Pyrénées-Orientales) du *Discoglossus pictus* Otth. *Bull Soc Zool Fr* 33:54.
- Wisz MS, Hijmans RJ, Li J, et al (2008) Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Divers Distrib* 5:763–773.

Supplementary Material S1. Representation of all compiled records and study area.

Supplementary Material S2. Databases and references of compiled records.

Supplementary Material S3. Methodology and datasets used in each analysis. The number of occurrences of each dataset are detailed in parentheses.

Supplementary Material S4. Ecogeographical variables (EGVs) extracted from WorldClim database v.1.4 (Hijmans et al. 2005) and the variables selected for each method.

Supplementary Material S5. Results of Maxent models of spatial spread.

Supplementary Material S1. Representation of all compiled records and study area. Study area compassed *total distribution* (A) highlighted by dark grey. The translocations or new introductions are detailed in (B): (1) Montpellier and Lattes, (2), Setè North, (3) Setè and (4) Prat de Llobregat.



Supplementary Material S2. Databases and references of compiled records.

Databases

Biodiversity Database of Catalonia (Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya)

<http://biodiver.bio.ub.es/biocat/>

Base de Datos Herpetológica (Amphibians and Reptiles Database of Spain- AHE)

<http://www.herpetologica.es/index.php/programas/base-de-datos-herpetologica>

Servidor de Información de Anfibios y Reptiles de España – SIARE

<http://siare.herpetologica.es/>

Institut Català d'Ornitologia – ICO (Catalan Ornithological Institute Vertebrates Database)

http://www.ornitho.cat/index.php?m_id=1

Societas Europaea Herpetologica – SEH

<http://gorperpignan.pagesperso-orange.fr/>

Groupe Ornithologique du Roussillon – GOR (Ornithological Group of Roussillon)

<http://gorperpignan.pagesperso-orange.fr/>

Société Herpétologique de France – SHF

<http://lash.fr>

References

Geniez P, Cheylan M (2012) Les Amphibiens et les Reptiles du Languedoc-Roussillon et régions limitrophes. Atlas biogéographique. Biotope, Mèze & Muséum national d'Histoire naturelle, Paris (collection Inventaires et biodiversité)

Geniez P, Cheylan M (1987) Atlas de Distribution des Reptiles et des Amphibiens du Languedoc-Roussillon. Montpellier. Glaw

Bons J, Geniez P (1996) Amphibians and reptiles of Morocco (including Western Sahara), biogeographical atlas. Asociación Herpetológica Española, Barcelona

Brito JC, Feriche M, Herrera T, et al (2008) En los límites de su distribución: anfibios y reptiles paleárticos en el noroeste de Túnez. Bol la Asoc Herpetol Esp 19:75–82.

Brunet P, Sanuy D, Oromí N, et al (2009) Anuran studies from Tiaret region, north-west of Algeria. Boletín la Asoc Herpetológica Española 20:68 – 72.

Supplementary Material S3. Methodology and datasets used in each analysis. The number of occurrences of each dataset are detailed in parentheses.

Traits	Methodology	Datasets	Acumulative/ non-acumulative
<i>Spatial spread</i>	Maxent	<i>total distribution</i> (992)	acumulative
<i>Spatial spread - translocations</i>	Maxent	<i>time2</i> (299), <i>time4</i> (519), <i>time5</i> (606)	acumulative
<i>Increasing/decreasing expansion of D. pictus at the future</i>	Maxent	<i>total distribution</i> (992)	acumulative
<i>Dispersal ability</i>	Maxent	<i>time1</i> (297), <i>time2</i> (299), <i>time3</i> (431), <i>time4</i> (519), <i>time5</i> (606)	acumulative
<i>Environmental niche plasticity</i>	Ordination methods (PCA)	<i>time 0</i> (282), <i>News74</i> (17), <i>News84</i> (66), <i>News94</i> (43), <i>News04</i> (62), <i>News14</i> (152)	non-acumulative

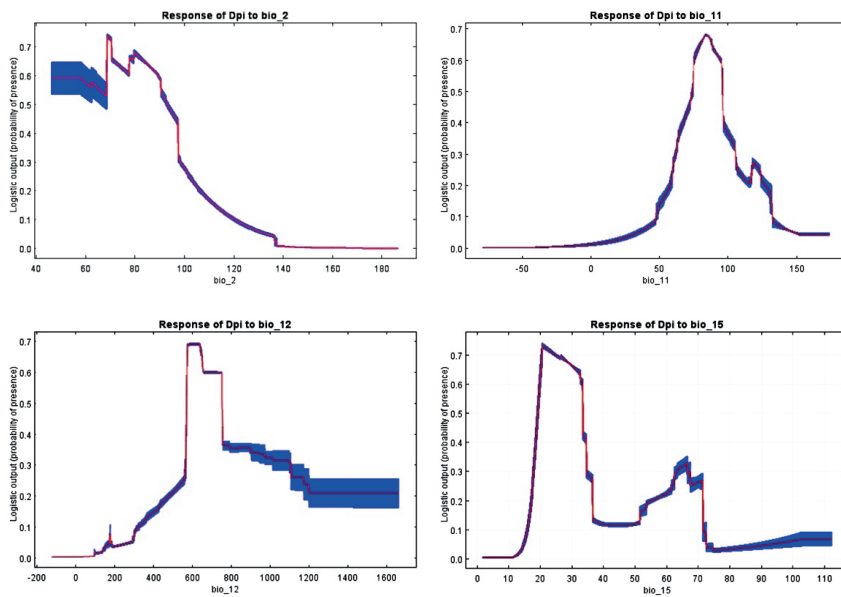
Supplementary Material S4. Ecogeographical variables (EGVs) extracted from WorldClim database v.1.4 (Hijmans et al. 2005) and the variables selected for each method.

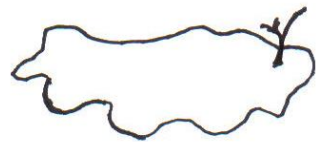
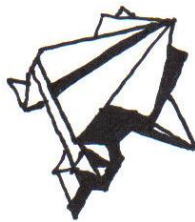
CODE	VARIABLES	UNITS	SELECTION
Climatic			
bio1	Annual Mean Temperature	°C	non-selected
bio2	Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))	°C	<i>selected</i>
bio3	Isothermality (BIO2/BIO7) (* 100)	n.u.	<i>selected</i>
bio4	Temperature Seasonality (standard deviation *100)	°C	non-selected
bio5	Max Temperature of Warmest Month	°C	non-selected
bio6	Min Temperature of Coldest Month	°C	non-selected
bio7	Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)	°C	non-selected
bio8	Mean Temperature of Wettest Quarter	°C	<i>selected</i>
bio9	Mean Temperature of Driest Quarter	°C	<i>selected</i>
bio10	Mean Temperature of Warmest Quarter	°C	non-selected
bio11	Mean Temperature of Coldest Quarter	°C	<i>selected</i>
bio12	Annual Precipitation	millimeter	<i>selected</i>
bio13	Precipitation of Wettest Month	millimeter	non-selected
bio14	Precipitation of Driest Month	millimeter	non-selected
bio15	Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)	millimeter	<i>selected</i>
bio16	Precipitation of Wettest Quarter	millimeter	non-selected
bio17	Precipitation of Driest Quarter	millimeter	non-selected
bio18	Precipitation of Warmest Quarter	millimeter	non-selected
bio19	Precipitation of Coldest Quarter	millimeter	non-selected
Topographic			
alt	Altitude	meters	non-selected
asp	Aspect	radians	non-selected
slo	Slope	grades	non-selected

Supplementary Material S5. Results of Maxent models of spatial spread. Percentage of variable contribution to the model construction, derived from the permutation importance analysis from MaxEnt. The ecological response curves for the model of four variables with higher values of percentage of contribution. Response curves show the ranges in environmental conditions that are more favourable for the distribution of the species. The x-axis of the variables represents their ranges for the complete study area, while the y-axis represents the predicted suitability of the focus variable when all of the other variables are set to their average.

Variable contribution

Models	<i>n</i>	AUC	bio2	bio3	bio8	bio9	bio11	bio12	bio15
Total distribution	992	0.93	42.9	2.3	1.2	3.1	9.5	30.1	10.8





SECCIÓN 2: Capacidad invasora de
***Discoglossus pictus* a mesoescala**

Resumen del capítulo 2: Evaluación de la respuesta de *Discoglossus pictus* a la desecación y la restricción de alimento y su efecto en el desarrollo pre- y post-metamórfico

Enriquez-Urzelai, U., San Sebastián, O., Garriga, N. & Llorente, G. A. 2013. Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia*, 173:117–127.

La disponibilidad de alimentos y la desecación del hábitat reproductivo son dos de los factores con mayor efecto sobre el éxito reproductivo de los anfibios. Una elevada cantidad de recursos permite mantener tasas de crecimiento elevadas y la aceleración del desarrollo larvario de los anfibios. Por otro lado, la capacidad de los anfibios a responder a la desecación de los hábitats reproductivos se encuentra ampliamente estudiada, especialmente para aquellas especies que ocupan ambientes temporales y efímeros. Ambos factores interactúan en la naturaleza. Durante la desecación, la cantidad de recursos *per capita* se reduce considerablemente. En este trabajo se analiza la capacidad de respuesta del sapillo pintojo meridional (*Discoglossus pictus*) bajo diferentes condiciones de disponibilidad de alimento y de desecación del sistema por separado y en interacción. Se observó que la privación de alimentos conduce a una reducción de las tasas de crecimiento en *D. pictus*, retrasando su metamorfosis y produciendo un menor tamaño y peso de los metamórficos. Se confirma una elevada capacidad de respuesta de esta especie a la desecación del sistema, acelerando la metamorfosis pero limitada a la disponibilidad de los recursos. Además, las tasas de desecación lenta producen un estrés en las larvas de la especie, pero no lo suficiente para provocar un acortamiento del período larvario. La interacción de la desecación y la reducción de la disponibilidad de alimento presentaron costes en la morfología y capacidad de salto de los metamórficos. A pesar de ello, las bajas tasas de mortalidad observadas en todos los tratamientos y la adecuada respuesta a la desecación de la especie, indica un elevado potencial invasor de *D. pictus* en su nueva área de distribución mediterránea, donde ocupa principalmente ambientes temporales y efímeros.

Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles

Urtzi Enriquez-Urzelai · Olatz San Sebastián ·
Núria Garriga · Gustavo A. Llorente

Received: 15 December 2011 / Accepted: 11 January 2013 / Published online: 24 January 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Food availability and pond desiccation are two of the most studied factors that condition amphibian metamorphosis. It is well known that, when food is abundant, organisms undergo metamorphosis early and when they are relatively large. The capability of anurans to accelerate their developmental rate in response to desiccation is also common knowledge. These two variables must act together in nature, since we know that, as a pond dries, the per capita resources decrease. We conduct an experiment to evaluate the effects of desiccation and food availability separately and in combination in tadpoles of the painted frog (*Discoglossus pictus*). We demonstrate that food deprivation leads to slow growth rates, which delay metamorphosis and produce smaller size and weight. The capability to accelerate metamorphosis when facing a drying pond is also confirmed, but, nevertheless, with factor interaction (when the pool is drying and resources are scarce) the capacity to respond to desiccation is lost. In addition, slow drying rates are shown to be stressful situations, but not enough to provoke a shortening of the larval period; in fact, the larval period becomes longer. We also demonstrate that the interaction of these factors changes the allometric relationship of different parts of the hind

limb, which has implications for the biomechanics of jumping. Due to low mortality rates and an adequate response to both environmental factors, we expect *D. pictus* to have a great invasive potential in its new Mediterranean distribution area, where lots of temporary and ephemeral ponds are present.

Keywords Phenotypic plasticity · Development · Metamorphosis · Feeding restriction · Drying

Introduction

Amphibians are unique among tetrapods in the complexity of their lifecycles and the degree to which their lifecycles vary in response to environmental conditions. The life history of most anurans is characterized by an abrupt ontogenetic change in morphology, physiology and behavior (Wilbur 1980; Wells 2007). Even so, many studies have shown that the morphology of metamorphs is causally affected by the tadpole environment. The connection between larval and juvenile stages limits the range of adaptive larval phenotypes that can be expressed even though it has a low impact on adult fitness (Van Buskirk and Saxer 2001; Watkins 2001; Richter-Boix et al. 2006).

Although there has long been an interest in the influence of environmental factors on the growth and developmental rates of amphibian larvae (Savage 1952, 1962), the first synthetic theory of the timing of metamorphosis was not postulated until 1973 (Wilbur and Collins 1973; mathematically formalized by Day and Rowe 2002). The Wilbur–Collins model is based in the hypothesis that there is a negative relationship between growth and developmental rate, and the model thus predicts that, if the growth rate of a larva increases, development is retarded to exploit the new

Communicated by Ross Alford.

U. Enriquez-Urzelai (✉) · O. San Sebastián · N. Garriga ·
G. A. Llorente
Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: urtzi.enriquez@gmail.com

O. San Sebastián
Departamento de Herpetología,
Aranzadi Zientzia Elkartea-Sociedad de Ciencias Aranzadi,
Zorroagaina, 11, 20014 Donostia-San Sebastián, Spain

growing conditions to the maximum. In contrast, if the growth rate decreases, development should increase in an attempt to escape a deteriorating environment. The model also establishes that there is a minimum and a maximum body size at which metamorphosis will occur, and the range of possible body sizes will depend on the phenotypic plasticity of the species (Wilbur and Collins 1973). Day and Rowe (2002) mathematically formalized the developmental threshold below which larvae are expected to respond to slow growth rates by lengthening the larval period and above which larvae are thought to accelerate development and expedite metamorphosis. As a consequence, different food levels will produce an L-shaped reaction norm (Plaistow et al. 2004; Lind et al. 2008). Even though the exact mechanisms underlying developmental thresholds remain unclear, endocrinological mechanisms have been suggested (Wilbur and Collins 1973; Hensley 1993). Since the threshold has been demonstrated to evolve (Morey and Reznick 2000, 2004; Lind et al. 2008), it is not surprising to find differences between populations (Lind et al. 2008) and species (Morey and Reznick 2000, 2004). As an alternative to the Wilbur–Collins model, Travis (1984) proposed the “fixed-rate model”. Travis stated that the developmental rate may lose its responsiveness to food supply, metabolic state and growth rate, although remaining responsive to temperature, water level and predators (Travis 1984; Leips and Travis 1994; Rose 2005).

As a very important part of the growth of most amphibians occurs in the terrestrial habitat, Werner (1986) developed a model that includes the terrestrial phase. The predictions of that model were based on an optimal balance between maximizing growth and minimizing mortality in both aquatic and terrestrial habitats. In water, amphibian potential for changes in growth and mortality rates are reflected by phenotypic plasticity (Rudolf and Rödel 2007).

The three models have been extended by many authors in order to include more factors such as time constraints or seasonality (Rowe and Ludwig 1991; Rudolf and Rödel 2007; for more information, see Harris 1999 and Wells 2007), but they are still the main conceptual framework.

A number of biotic and abiotic factors can determine the growing conditions that larvae experience. These factors include changes in larval density (Wilbur and Collins 1973; Tejedo and Reques 1994; Richter-Boix et al. 2004), aquatic predators (Laurila et al. 2002; Benard 2004; Pujol-Buxó et al. 2012), and food availability (Alford and Harris 1988; Morey and Reznick 2000; Lind et al. 2008) as well as a variety of abiotic parameters such as pool temperature (Newman 1998) and desiccation (Richter-Boix et al. 2006; Lind et al. 2008; Márquez-García et al. 2009).

One of the factors that conditions the timing of metamorphosis that has been most studied is food availability. It is known that, if food is abundant, organisms undergo

metamorphosis earlier and when they are larger than they do if food is scarce (Gotthard and Sören 1995; Morey and Reznick 2000; Lind et al. 2008). This could be explained by them reaching the development threshold earlier under abundant food conditions, as they have more energy available to allocate to growth. Furthermore, only a slight delay in maturity after the developmental threshold has been reached will produce a large increase in weight in animals exposed to an abundance of food (Lind et al. 2008).

A major threat for developing tadpoles that has been well studied is pool desiccation (Newman 1992). Many amphibians breed in temporary ponds that are sporadically filled by rain and then dry out at different rates. Such species have evolved adaptive plasticity, including the capacity to accelerate development in response to pond drying; these traits allow successful development (Denver et al. 1998; Leips et al. 2000; Loman and Claesson 2003; Merilä et al. 2004). When the risk of death in the larval environment increases as a function of time, metamorphosis may be favored at a younger age, in spite of the costs associated with a smaller body size (Loman and Claesson 2003; Rudolf and Rödel 2007; Márquez-García et al. 2009).

As ponds dry, tadpole density increases, thus reducing the per capita resources through the reduction of the available foraging range (Leips et al. 2000). Therefore, the two variables affecting the timing of metamorphosis (food availability and pool desiccation) must act together in nature. The effects of each of them are well known on their own and there have been several attempts to unravel the effects of their interaction (Semlitsch 1987; Newman 1989). Nevertheless, we consider the experimental design in the papers addressing the interaction not to be entirely appropriate as the results could have been influenced by other unmeasured factors (e.g., temperature or changes in water chemistry). For instance, Semlitsch (1987) stated that “water temperature in the drying ponds becomes more variable (increase in range during a 24-h period) at the end of the experiment and probably contributed to the overall ‘drying effect’.”

In this study, we evaluate the effects of food availability and pool desiccation, separately and acting together, on the painted frog *Discoglossus pictus* (Otth 1837). The species is native to North Africa, and was introduced into Europe where it is currently expanding (Geniez and Cheylan 1987; Llorente et al. 1995, 2001; Barbadillo et al. 1999; Salvador and García París 2001; Franch et al. 2007; Martínez-Solano 2009). We consider the adaptability that this invasive species shows in its new Mediterranean distribution area, where pond drying is a normal event, to be particularly interesting. We also analyze the plasticity of the life-history traits of this species. Furthermore, we evaluate which metamorphosis timing model best fits our data.

Materials and methods

Study species and populations

Discoglossus pictus is a North African anuran species that was first introduced into Europe in the late nineteenth century, but the introduction was not successful until the early twentieth century (Martínez-Solano 2009). Since then, *D. pictus* has expanded its area of distribution and is now present in the northeast of Spain and the south of France (Geniez and Cheylan 1987; Llorente et al. 1995, 2001; Barbadillo et al. 1999; Salvador and García París 2001). The species breeds in irrigation canals, streams, natural ponds and even in pools of seawater with high salinity (Llorente et al. 1997). *D. pictus* shows a clear preference for ephemeral and temporary ponds (Richter-Boix et al. 2012), representing 70 % of the ponds used (personal data). They usually lay their egg clutches in small ponds (from 20 × 20 cm to 10 × 20 m) and therefore often suffer from high mortality rates owing to pool desiccation (Martínez-Solano 2009).

Experimental procedures

We collected three clutches of eggs from Riudarenes (Girona, Spain) to try to include some variability in the sample, but the specific genetic make-up was not within the scope of the study. The eggs were transported to the laboratory where the experiment was carried out, and each clutch was kept in individual plastic containers with dechlorinated tap water until the larvae reached developmental stage 25 (Gosner 1960).

In order to evaluate the effects of both food availability and desiccation, we designed a 2 × 4 factorial experiment. A “food availability” factor with two levels [ad libitum (A) and restricted (R) food supply] and a “hydroperiod” factor with four levels [constant (C), fast drying (F), variable (V) and slow drying (S)]. Each treatment consisted of 10 randomly selected tadpoles from each of the three egg clutches (240 tadpoles in total) being placed individually in 1-L plastic containers, and all 240 containers were initially filled with 700 mL of dechlorinated tap water. The water was changed every 3 days and the tadpoles were fed with lightly boiled spinach (ad libitum; A) or once every two water changes (restricted food supply; R). The fast drying hydroperiod (F) lasted 30 days, the variable level (V) dried for 23 days at the fast drying rate and then the water column was restored and the slow drying (S) lasted for 60 days. For each water regime, the level was decreased following the curve defined by Wilbur (1987). When the water depth reached the zero level, the bottoms of the plastic containers were covered with wet filter paper, which simulated moist soil. All the treatments were conducted at

the same time, under the same conditions of photoperiod (12L:12D) and at 20–22 °C.

Response variables

The containers were checked daily and the larval period (Gosner stage 25–42) and the time to the end of metamorphosis (Gosner stage 25–46) of each animal were recorded. The time from stage 42 to 46 (tail resorption) was also noted. The tadpoles that did not accomplish metamorphosis before the pond dried were considered dead, and emergence and survival rates were calculated accordingly.

When the toadlets reached the climax of metamorphosis, we measured their hopping performance by placing them into a cage covered with wet filter paper and marking the successive landing points of their jumps until they showed signs of fatigue (Richter-Boix et al. 2006). After that, we analyzed the total distance covered, the length of the longest jump, the average of all the jumps, and the average of the 5 longest jumps. The jumps were measured in centimetres with a ruler.

After jumping performance, the toadlets were sedated using tricaine methane sulphonate (MS-222) and weighed to a precision of 0.001 g. We also took photographs of each specimen and made eight measurements of the body and hind limbs (body length, head width, femur length, femur width, tibio-fibula length, tibio-fibula width, foot length, and phalanx length) using SigmaScan Pro 5.0. All the morphological measurements were taken in millimetres.

The metamorphs were released to their original location after they had been photographed.

Statistical analysis

We analyzed the effects of food availability (FA) and different hydroperiods (H) on life-history traits, morphology and jumping performance using mixed linear models for each of the variables measured. Water regime and food availability were treated as fixed factors and the clutch (Cl) as a random effect. We constructed a full factorial model in order to study the combined effect of food availability and hydroperiod (FA × H), among clutch variation in plastic responses to food availability and hydroperiod (FA × Cl and H × Cl) and all the factors together (FA × H × Cl). Tukey post hoc tests were performed to test for differences among treatments. Tests were conducted using the SPSS 16 for mac statistical package.

In order to test whether the L-shaped reaction norm predicted by the threshold model (Day and Rowe 2002) was indeed produced in *D. pictus* by different food supplies, we plotted the weight at metamorphosis as a function of developmental time. The same was done for the tadpoles fed ad libitum in order to see what was the reaction norm of

the weight in front of distinct hydroperiods. We then adjusted different regression lines to both plots and we chose the quadratic as it showed the highest R^2 value.

To look for differences in metamorph phenotypes in response to food availability and desiccation, we first tested for shared allometry between treatments through common principal component analysis (CPCA) using the `cpcbp` v.0.3.2.1. package (Bolker and Phillips 2011) in R v.2.11.1. (R Development Core Team 2007). This approach allows us to compare the phenotypic covariance matrices of the log-transformed morphological measures between treatments (Flury 1988; McCoy et al. 2006). If a common size axis is present (i.e. if they share their first CPC), the data can be size-corrected and analyzed to observe the size-independent variation in shape. If no common size axis is present, the size correction is not possible (McCoy et al. 2006). We conducted independent CPCA in order to study the effects of food availability (AC vs. RC treatment), desiccation (AC vs. AF vs. AV vs. AS) and the interaction of both (all treatments).

Because CPC1 differed for some of our treatments, we analyzed the allometric growth relationships between morphological measurements in a pairwise fashion (McCoy 2007; Touchon and Warkentin 2011). This kind of relationship is defined by the equation $y = bx^a$, where y and x are the aspects of body shape of interest (log-transformed), b the intercept and a the slope (allometric scaling component) of the regression line (Huxley 1932). We compared the variation of the allometric scaling component as it is known to reflect the relative size of a body measurement versus another, regardless of overall size differences (Touchon and Warkentin 2011). The allometric scaling component was calculated via ordinary least squares regressions.

As the size correction was not possible, we analyzed the allometric scaling component of the regression between the log-transformed longest jump and tibio-fibula length. Although we chose the log-tibio-fibula length (as it has been used in previous studies related to locomotor speed; Llewelyn et al. 2010), similar results were obtained using the femur length and body length (results not shown). This technique was used to help us understand the change of this relationship between treatments, not to provide statistical inference.

Results

Percentage of emergence and survival

The percentage of individuals that survived to metamorphosis ranged from 56.67 to 100 % depending on the treatment. The treatment in which the fewest tadpoles

metamorphosed was the RF (56.67 %), while, in the AF treatment, 86.67 % of tadpoles survived and emerged. All that mortality was due to the failure of tadpoles to metamorphose before complete desiccation. Only one other tadpole, from the AV treatment, died, but that was due to external factors (probably a fungal infection). The other treatments showed 100 % survival.

Life-history traits

The larval period was influenced by food availability ($F_{1, 225} = 2,166.208$, $P < 0.001$), hydroperiod ($F_{3, 225} = 5.934$, $P = 0.031$), and the interaction between them ($F_{3, 225} = 5.498$, $P = 0.037$). No among clutch differences were detected ($F_{2, 225} = 0.3$, $P = 0.766$).

In all the different hydroperiods, the tadpoles fed ad libitum started metamorphosing earlier than those subjected to food restriction. The individuals fed ad libitum responded to pond desiccation by shortening the larval period in the two fast drying treatments (F and V: $P < 0.001$) but not when the desiccation rate was slow ($P = 0.436$). All the tadpoles under food restriction reached Gosner stage 42 at the same time, with the exception of individuals under the slow drying treatment ($P < 0.001$), which metamorphosed later (Fig. 1a; Table 1).

The tadpoles that experienced abundant food completed tail resorption sooner than individuals with reduced food availability ($F_{1, 220} = 117.778$, $P = 0.007$), except in the case of the slow desiccation treatment, where there was no difference between the two food availabilities (AS = 4.733 ± 0.166 ; RS = 4.633 ± 0.337) ($F_{1, 58} = 0.803$, $P = 0.436$). Pool desiccation had no effect on this life-history trait ($F_{3, 220} = 1.671$, $P = 0.268$).

The time until the end of metamorphosis was also affected by food availability ($F_{1, 220} = 8,095.17$, $P < 0.001$), hydroperiod ($F_{3, 220} = 6.334$, $P = 0.027$) and their interaction ($F_{3, 220} = 5.969$, $P = 0.03$). We observed a significant H \times Cl interaction, which means there were among clutch differences for the age at stage 46 due to distinct desiccation levels ($F_{6, 220} = 5.475$, $P = 0.029$). The pattern observed was almost the same as that of the larval period. The only difference is that, as the individuals in the AS treatment took longer to resorb their tails than the rest of the ad libitum treatments, they took longer from the start of the experiment to complete metamorphosis (AS = 29.033 ± 0.277 vs. AC = 27.6 ± 0.459) (see Table 1).

Size and weight at metamorphosis

Size (total body length) and weight at metamorphosis were both significantly lower with the restricted food supply in all water regimes (Tables 1, 2, 3; Fig. 2). Although the hydroperiod did not affect these two traits, we observed

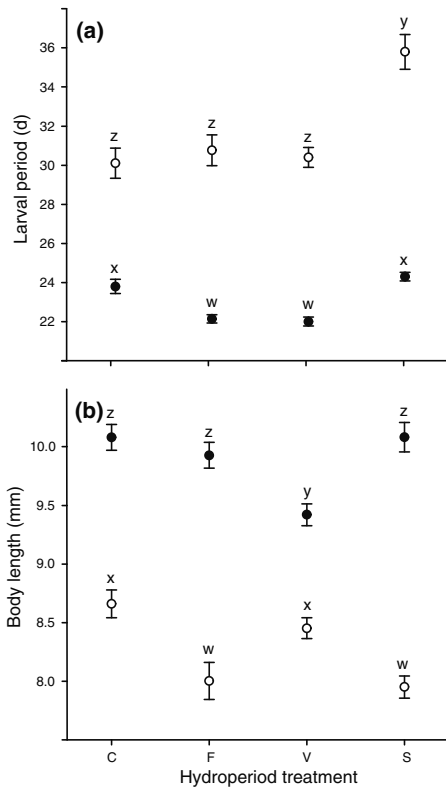


Fig. 1 **a** Larval period and **b** body length (mean ± 1SE) in *Discoglossus pictus* tadpoles fed ad libitum (filled circle) and undergoing food restriction (empty circles) in four different hydroperiod treatments, control (C), fast drying (F), variable (V) and slow drying (S). Different letters above datapoints (z, y, x, w) indicate statistical differences in the post hoc analysis between treatments

that in combination with food availability it had a significant influence. Size was influenced by a clutch factor and the response of the different clutches to the different desiccation treatments turned out to be distinct (Table 2). In the case of weight, we detected a clutch effect, which translated to different responses to food availability (FA × Cl) and pool desiccation (H × Cl) (Table 3).

All the tadpoles under the ad libitum treatments reached the same weight, except the AV which passed to the terrestrial stage at a lower mass. In contrast, the RC and RV tadpoles reached the same size and were larger than the RF and RS treatments. We obtained the same results for size (body length) at the end of metamorphosis (Fig. 1b; Table 1).

There is an inverse relationship between age and weight at the end of metamorphosis. Regardless of hydroperiod, individuals with abundant food reached the juvenile state earlier and bigger than those with less food (Fig. 2a;

$F_{2, 219} = 94.930, P < 0.001, R^2 = 0.4644$). The influence of pool desiccation on this trade-off was evaluated by plotting only the tadpoles fed ad libitum, as these animals only responded to pool desiccation. We observed that the individuals that accelerated or delayed metamorphosis had lower body weights, although the correlation was non-significant (Fig. 2b; $F_{2, 212} = 1.125, P = 0.328, R^2 = 0.0197$).

Morphology of post-metamorphic individuals

We obtained the same results for all the absolute morphological measurements, so only the results for the absolute femur length are commented on (Table 1). The food availability influenced the absolute length of the femur ($F_{1, 220} = 134.229, P = 0.007$) and tadpoles fed ad libitum resulted in metamorphs with longer femurs (Fig. 3a). The influence of the hydroperiod alone on this trait was not significant ($F_{3, 220} = 2.045, P = 0.209$), but we detected a significant effect of the interaction of both factors ($F_{3, 220} = 25.234, P = 0.001$). A clutch component that determined the length of the femur in response to distinct hydroperiods was also detected ($F_{6, 220} = 4.803, P = 0.039$). The pattern observed was the same as that of the weight and size at metamorphosis (Fig. 3a; compare with Fig. 1b).

The CPCA revealed that neither food availability ($P = 0.377$) nor desiccation ($P = 0.343$) produced differences in the body size axis. Interestingly, metamorphs did not share common allometry due to the interaction of factors ($P = 0.021$). Therefore, morphology could not be size-corrected for shape comparisons and we studied the allometric scaling relationships between different biomechanically important aspects (Zug 1972; Choi and Park 1996; Choi et al. 2003; Handrigan and Wassersug 2007). Food restriction resulted in a less steep slope between the femur and body length in the absence of desiccation. However, when any rate of desiccation was present, the differences produced by food availability disappeared and the slope approached 1 (isometry between femur and body length) (Fig. 3b), suggesting an interactive effect of food availability and pond duration. The allometric scaling component of the femur width and femur length was higher in the treatments where tadpoles had been subjected to a slow desiccation rate ($a > 1$). This was true for the tadpoles fed ad libitum, but not for the tadpoles with restricted food supply, as the standard errors between RC and RS overlapped. Therefore, it can be said that, when tadpoles had enough food available and were subjected to slow desiccation rate, they allocated more to femoral musculature relative to femur length. At higher desiccation rates, the scaling component remained near or below isometry (Fig. 3c). The lack of desiccation allowed tadpoles to

Table 1 Mean \pm ISE of the main response variables analyzed

	Ad libitum			Restriction				
	C	F	S	C	F	S		
Larval period (days)	23.8 \pm 0.36	22.143 \pm 0.210	22 \pm 0.227	24.3 \pm 0.215	30.103 \pm 0.776	30.762 \pm 0.793	30.4 \pm 0.513	35.8 \pm 0.892
Tail resorption (days)	3.8 \pm 0.2	3.923 \pm 0.248	3.552 \pm 0.176	4.733 \pm 0.166	5.0 \pm 0.172	5.0 \pm 0.21	5.233 \pm 0.149	4.633 \pm 0.337
Time until the end of metamorphosis (days)	27.6 \pm 0.459	26.154 \pm 0.349	25.552 \pm 0.36	29.033 \pm 0.277	35.233 \pm 0.829	34.588 \pm 0.767	35.633 \pm 0.504	40.433 \pm 0.97
Weight (g)	43.634 \pm 1.494	42.917 \pm 1.419	36.035 \pm 1.014	43.35 \pm 1.5	28.053 \pm 1.193	22.747 \pm 1.224	26.831 \pm 0.709	22.147 \pm 0.711
Body length (mm)	10.08 \pm 0.11	9.926 \pm 0.109	9.421 \pm 0.093	10.082 \pm 0.126	8.66 \pm 0.119	8.003 \pm 0.158	8.452 \pm 0.09	7.952 \pm 0.094
Femur length (mm)	4.578 \pm 0.076	4.567 \pm 0.07	4.2 \pm 0.055	4.604 \pm 0.068	3.794 \pm 0.06	3.431 \pm 0.096	3.742 \pm 0.06	3.424 \pm 0.053
Tibio-fibula length (mm)	4.282 \pm 0.083	4.194 \pm 0.075	3.866 \pm 0.056	4.399 \pm 0.069	3.448 \pm 0.07	3.14 \pm 0.064	3.379 \pm 0.048	3.066 \pm 0.053
Total distance covered (cm)	176.767 \pm 14.284	169.5 \pm 11.419	143.931 \pm 10.066	202.533 \pm 22.831	95.067 \pm 9.116	72.875 \pm 13.508	94.1 \pm 11.977	64.533 \pm 9.018
Longest jump (cm)	11.967 \pm 0.385	11.653 \pm 0.444	10.103 \pm 0.273	11.967 \pm 0.588	7.5 \pm 0.412	6.188 \pm 0.714	7.667 \pm 0.393	5.833 \pm 0.453
Average of all jumps (cm)	5.166 \pm 0.249	5.747 \pm 0.223	5.137 \pm 0.181	5.123 \pm 0.254	3.409 \pm 0.205	3.355 \pm 0.38	3.52 \pm 0.193	2.927 \pm 0.218
Average of the 5 longest jumps (cm)	10.07 \pm 0.365	10.035 \pm 0.334	8.83 \pm 0.272	10.351 \pm 0.517	6.576 \pm 0.378	5.278 \pm 0.665	6.259 \pm 0.368	4.871 \pm 0.412

C Control, F fast drying, V variable, S slow drying

Table 2 Mixed model ANOVAS of the body length at the end of metamorphosis for all treatments

	df	MS	F	P value
(Intercept)	1	16,904.442	2,696.432	0.000*
Food availability (FA)	1	137.03	480.843	0.002*
Hydroperiod (H)	3	2.683	3.107	0.110
Clutch (Cl)	2	6.314	6.787	0.035*
FA \times H	3	4.016	19.874	0.001*
FA \times Cl	2	0.285	1.399	0.312
H \times Cl	6	0.87	4.318	0.049*
FA \times H \times Cl	6	0.201	0.741	0.617

* Significant effect ($P < 0.05$)

Table 3 Mixed model ANOVAS of the weight at the end of metamorphosis for all treatments

	df	MS	F	P value
(Intercept)	1	224,751.347	550.932	0.002*
Food availability (FA)	1	14,238.08	88.709	0.011*
Hydroperiod (H)	3	223.936	1.885	0.233
Clutch (Cl)	2	410.747	1.571	0.304
FA \times H	3	424.154	26.221	0.001*
FA \times Cl	2	161.453	9.725	0.010*
H \times Cl	6	119.648	7.477	0.014*
FA \times H \times Cl	6	16.002	0.479	0.823

* Significant effect ($P < 0.05$)

display near or higher than 1 slope values for the tibio-fibula and femur length regression. This indicates a greater allocation to the distal part of the leg. In the ad libitum treatments, no differences produced by desiccation were detected, with the exception of AV, in which the gradient was lower. With food restriction, in contrast, the fast desiccation rates (RF and RV) resulted in shorter tibio-fibula lengths relative to femur length ($a < 1$) (Fig. 3d).

Hopping performance

Food availability had a significant effect on the total distance covered by metamorphs, but pool desiccation did not. The interaction between the two factors also produced significant differences. Furthermore, a clutch effect was observed that affected capabilities when faced with pond drying (Table 4). Tadpoles fed ad libitum jumped a larger total distance than those with restricted feeding (see Table 1). Feeding, but not desiccation, had a significant effect on the longest jump ($F_{1, 220} = 99.574, P = 0.01$), the average of all the jumps ($F_{1, 220} = 52.144, P = 0.018$) and the average of the 5 longest jumps ($F_{1, 220} = 92.543, P = 0.01$). The FA \times H \times Cl interaction also influenced the average of the 5 longest jumps ($F_{6, 220} = 2.158,$

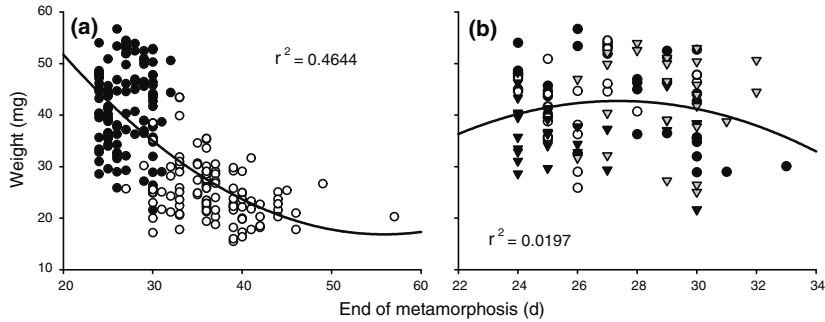


Fig. 2 Age and size at the end of the metamorphosis. **a** The typical L-shaped reaction norm produced by the differential food supply. *Filled circles* represent tadpoles fed ad libitum and empty circles larvae undergoing food restriction. **b** The reaction norm of tadpoles

fed ad libitum with four hydroperiod treatments: control (*filled circles*), fast drying (*empty circles*), variable (*filled triangles*) and slow drying (*gray triangles*). Quadratic regression is shown by the *solid line* in each panel

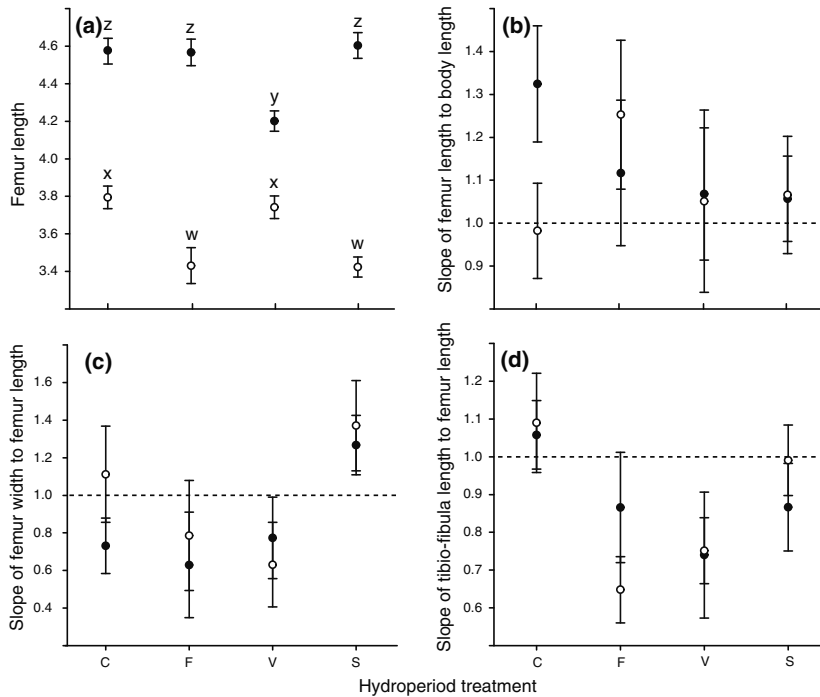


Fig. 3 Food availability and desiccation, as well as their interaction had effects on metamorph morphology. **a** Femure length (mean \pm SE) at the end of metamorphosis for four different hydroperiods, control (C), fast drying (F), variable (V) and slow

drying (S). Pairwise comparisons of **b** femur length and body length, **c** femur width and femur length, and **d** tibio-fibula length and femure length (slope \pm SE of log–log plots, with log base 10). See Fig. 1 for symbols and abbreviations

$P = 0.049$) and the longest jump ($F_{6, 220} = 2.495$, $P = 0.024$). Although the longest jump was always bigger for the tadpoles fed ad libitum than for those undergoing feeding restriction (see Table 1), the slope between the log-transformed longest jump against tibio-fibula length was higher for the animals with a restricted food supply

(Fig. 4). Moreover, the differences became bigger due to the effect of desiccation, as the AC versus RC and AF versus RF treatment comparisons suggest. The feeding treatment did not influence that relationship either in the V or S treatments. The slow drying treatment on its own provoked an increase in the steepness of that relationship slope.

Table 4 Mixed model ANOVAS of the total distance covered in the hopping performance at the end of metamorphosis for all treatments

	df	MS	F	P value
(Intercept)	1	3.290×10^6	391.675	0.002*
Food availability (FA)	1	$4,275.924 \times 10^2$	148.372	0.006*
Hydroperiod (H)	3	4,543.683	0.273	0.843
Clutch (Cl)	2	8,432.159	0.486	0.637
FA × H	3	19,763.186	11.194	0.006*
FA × Cl	2	2,868.044	1.546	0.275
H × Cl	6	16,768.321	9.65	0.007*
FA × H × Cl	6	1,737.613	0.351	0.909

* Significant effect ($P < 0.05$)

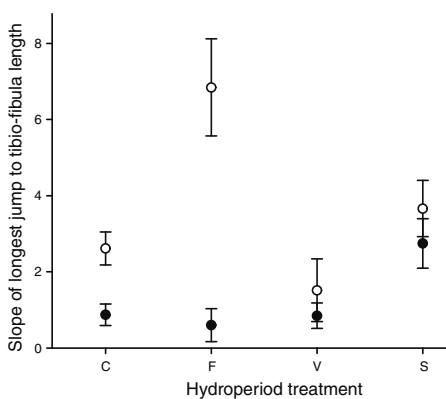


Fig. 4 Comparison between the longest jump and the tibio-fibula length at the end of metamorphosis (slope \pm SE of log–log plots, with log base 10) for four different hydroperiod treatments. See Fig. 1 for symbols and abbreviations

Discussion

As previously reported in other work (Morey and Reznick 2000; Lind et al. 2008), we found an inverse relationship between age and size at metamorphosis under different food availabilities. This relationship is predicted by the threshold proposed in the Wilbur–Collins model (Wilbur and Collins 1973; Day and Rowe 2002), and the predicted L-shaped reaction norm is also confirmed by our data (Fig. 2a). These results support the thesis that slow growth delays metamorphosis as the tadpoles take longer to reach the threshold weight and size. In contrast, fast growth has opposite consequences (Day and Rowe 2002). Unfortunately, our experimental design did not allow us to test whether the growth rate became fixed at some point (Travis 1984) or it continued to be susceptible to change at every moment (Alford and Harris 1988; Leips and Travis 1994).

The capacity to accelerate metamorphosis when faced with a drying pond (Leips et al. 2000; Merilä et al. 2004;

Richter-Boix et al. 2006; Márquez-García et al. 2009) is also confirmed by our results, which demonstrate that pond desiccation provokes a shortening of the larval period. However, it does not influence the time needed to resorb the tail, so the differences detected in the time elapsed until the end of metamorphosis are fully due to the shortened larval period of the tadpoles under drying treatments. Surprisingly, tadpoles under the AS treatment needed more time to resorb the tail than the control tadpoles (AC), so they metamorphosed later, which is in disagreement with the published literature (Márquez-García et al. 2009). We postulate that a slowly drying pond represents stress but not enough to accelerate metamorphosis. The animals under these conditions experienced a cost associated with living in a stressful environment but they were not induced to metamorphose earlier. These specimens slowed tail resorption. This extended time of tail resorption could be hormonally mediated by prolactin secretion (Brodeur et al. 2009), or merely a consequence of reduced energy intake during the larval period (Hourdry and Beaumont 1985). The observed lower weight of the AS metamorphs seems to support the latter explanation.

Although both environmental cues are important in determining the timing of metamorphosis (Wilbur and Collins 1973; Werner 1986; Morey and Reznick 2000; Márquez-García et al. 2009), we think that food availability is probably the more important factor and abundant food is needed to respond to pool desiccation. When well-fed tadpoles are exposed to pond desiccation, they are capable of accelerating metamorphosis, but when food resources are limited, they cannot respond to pond desiccation by increasing their rate of development. In the latter situation, tadpoles receive two cues that work in opposite directions: pond drying pushes them to metamorphose earlier, but food deprivation incapacitates them from doing so. Recently, Kulkarni et al. (2011) have demonstrated that tadpoles invest most of their body fat in order to accelerate metamorphosis when faced with pond drying, supporting our results. Amazingly, the RS tadpoles took longer than the RC tadpoles to start and end metamorphosis. In this case, pond desiccation was not enough to trigger the tadpoles to metamorphose earlier (as in Gervasi and Fofopoulos 2008) but it constituted a stressful situation. So, the animals had lower developmental and growth rates related to food deprivation and, furthermore, they had to pay the energetic cost associated with the stressful situation.

Hence, our results support Werner's model (Werner 1986), but indicate that growth conditions and mortality rates are not equally important. Instead, growth conditions seem to determine the response to increasing mortality risk. Therefore, only the most competitive tadpoles, those that best exploit the resources, are able to respond to a drying pond and successfully metamorphose.

The size and weight at metamorphosis were influenced by food availability but not by the distinct water regimes, as previously indicated by Gervasi and Foufopoulos (2008) (but see Denver et al. 1998; Morey and Reznick 2000; Merilä et al. 2004). However, the AV tadpoles appeared to be smaller and lighter. All this evidence indicates that *D. pictus* is able to increase its rate of development without decreasing its growth rate (Gervasi and Foufopoulos 2008) except in the case of the variable water regime. In that case, the tadpoles accomplished metamorphosis earlier with smaller size and weight. Rudolf and Rödel (2007) underlined the importance of the unpredictability of the environment where the tadpoles grow, and that could be an explanation of our results. When the water volume was restored, the tadpoles did not readjust their accelerated development, but probably suffered from a reduced energy intake due to an unexpectedly high water level. Even though they paid that cost, they had a greater survival rate than those exposed to the fast drying treatment owing to the water level recovery.

The reaction norm that the tadpoles fed ad libitum and subjected to distinct water regimes followed indicates that, although there are no statistically significant differences, the acceleration of metamorphosis resulted in slightly lighter metamorphs (either because of the energetic cost of accelerating metamorphosis or because of the shortened growth period), and that some tadpoles experienced worse growth conditions and, because of that, they delayed the metamorphosis (Fig. 3b).

Size and weight at metamorphosis were also influenced by the interaction between food availability and desiccation. We observed that tadpoles exposed to food restriction and desiccation (either fast or slow) had reduced size and weight (as previously reported in Denver et al. 1998; Morey and Reznick 2000; Merilä et al. 2004). However, although the tadpoles under the variable water regime were subjected to fast drying, the restoration of the water level meant they did not suffer in terms of reduced size and weight. As small metamorphs show reduced survival to maturity (Goater 1994; Newman and Dunham 1994), smaller size at maturity (Smith 1987), and smaller clutch size (Wilbur 1977; Berven 1981; Smith 1987), the costs of living in a pond (drying or not) with low food availability are clear.

Food availability and the interaction of both environmental factors were responsible for differences in the absolute morphological measurements. As suggested by the threshold model of Day and Rowe (2002), the entire toadlets were smaller due to food restriction. The CPCA revealed that metamorphs shared common allometry when they had faced only one of the stimuli in their larval stage, but that the combination of them resulted in differences in the growth axis. Both desiccation and resource availability

had effects on the allometric scaling components of the pairwise comparisons studied. Tadpoles in the AC treatment showed the highest increase in femur length with increasing body size and also higher tibio-fibula length with augmenting femur length (the last statement was also true for the RC treatment). These elements are the most relevant ones involved in the jumping biomechanics; the bigger the hind limb, the higher the jumping capacity. Moreover, it has been demonstrated that strong jumpers have a longer tibio-fibula than femur (Zug 1972; James and Wilson 2008), and therefore we could say that metamorphs from the AC treatment had the most effective morphology for jumping. This, however, was counteracted by desiccation. At any desiccation rate, the slopes of the log–log plots overlapped, and the relationship between femur and body length became more or less isometric, while the relationship between tibio-fibula length and femur length turned to below isometry. Surprisingly, when tadpoles had been subjected to a slow desiccation rate but with enough resource availability, the allocation in femoral musculature (measured as femur width) relative to femur length was higher than in any other treatment (with restricted food supply standard errors overlapped between RC and RS). We hypothesize that, as mentioned above, slow drying represents a stressful situation, which leads to a higher allocation in the musculature involved in jumping at the expense of lower size and weight. Nevertheless, this hypothesis needs to be addressed in more detail.

All the hopping performance variables were affected absolutely by food abundance. This means that as the metamorphs were bigger due to abundant food, their jumping capacity was enhanced (Gomez-Mestre et al. 2010). The interaction of food availability and pond desiccation only affected the total distance covered among the hopping performance variables. This result suggests that, although the average length of the jumps and the longest jump are only determined by the food supply, the total distance covered is somehow dependent on the hydroperiod of the pond where the tadpole grew. We can say that, while the one-off ability of *D. pictus* to escape is not influenced by the hydroperiod, this environmental factor in combination with food availability determines the total distance that can be covered. Since jumping ability is known to have a positive influence on food acquisition (Walton 1988) and predator avoidance (Wassersug and Sperry 1977), underfed tadpoles would have reduced fitness in nature. We also found differences in the slope of the regression between the log-transformed longest jump and log-transformed tibio-fibula length due to food availability. Besides, when combined with desiccation, these differences became greater. Similarly to the femur length, the tibio-fibula was shorter in the tadpoles undergoing feeding restriction, and the greatest difference was observed in the AF versus RF

treatments. Consequently, we argue that the same increase in length for a shorter tibio-fibulas leads to greater improvement in the distance of the longest jump than for longer tibio-fibulas. As we pointed out previously, the animals in the AS treatment showed more femoral musculature relative to femur length, and this seems to be the reason why their increase in longest jump relative to tibio-fibula length was higher.

Finally, we have likewise shown that, within the same population, there are among clutch differences that provide distinct capacities to respond to environmental cues, as previously reported for different populations (Merilä et al. 2004; Lind et al. 2008). However, although the level to which they responded to the factors was not the same, we have to say that all of them did respond to the different environmental conditions and that the direction of their responses was the same.

Our data show that this species is highly adapted to drying water ponds because no tadpoles died when facing only desiccation. However, when food was restricted and the pond dried, the mortality rate increased. Nevertheless, survival continued to be high, which suggests that this species would be a good competitor in nature. So, we think that the invasive strength of this species comes from its capacity to survive even in the most stressful ponds. Therefore, this species is preadapted for the conditions of its new Mediterranean distribution area, which is known to have a lot of temporary ponds.

Acknowledgments We thank the Departament de Medi Ambient i Habitatge of the Generalitat de Catalunya for their support and permission to collect clutches. We also thank Marc Franch for providing the clutches for this study. B. Bolker provided helpful statistical consultation. Francesc Oliva (Departament d'Estadística), Ross Alford (handling editor) and two anonymous reviewers gave helpful comments on the manuscript.

References

- Alford RA, Harris RN (1988) Effects of larval growth history on anuran metamorphosis. *Am Nat* 131(1):91–106
- Barbadillo LJ, Lacomba JI, Pérez-Mellado V, Sancho V, López-Jurado LF (1999) Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. Planeta, Barcelona
- Benard MF (2004) Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35:651–673
- Berven KA (1981) Mate choice in the wood frog *Rana sylvatica*. *Evolution* 35:707–722
- Bolker B, Phillips C (2011) Package “cpcbp”. Available from http://www.math.mcmaster.ca/~bolker/R/src/contrib/cpcbp_0.3.2.1.tar.gz
- Brodeur JC, Svartz G, Perez-Coll CS, Marino DJG, Herkovits J (2009) Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquat Toxicol* 91:161–170
- Choi IH, Park K (1996) Variations in the take-off velocity of anuran amphibians: relation to morphology, muscle contractile function and enzyme activity. *Comp Biochem Physiol* 113A:393–400
- Choi IH, Shim JH, Ricklefs RE (2003) Morphometric relationships of take-off speed in anuran amphibians. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 299:99–102
- Day T, Rowe L (2002) Developmental thresholds and the evolution of reaction norms for age and size at life-history transitions. *Am Nat* 159:338–350
- Denver RJ, Mirhadi N, Phillips M (1998) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology* 79:1859–1872
- Flury B (1988) Common principal components and related multivariate models. Wiley, New York
- Franch M, Llorente GA, Montori A, Richter-Boix A, Carranza S (2007) Discovery of an introduced population of *Discoglossus pictus* beyond its known distributional range. *Herpetol Rev* 38:356–359
- Geniez P, Cheylan M (1987) Atlas de distribution des reptiles et des amphibiens du Languedoc-Roussillon. Laboratoire de Biogéographie et Ecologie des Vertébrés, Montpellier
- Gervasi SS, Foufopoulos J (2008) Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Funct Ecol* 22:100–108
- Goater CP (1994) Growth and survival of postmetamorphic toads: interactions among larval history, density and parasitism. *Ecology* 75:2264–2274
- Gomez-Mestre I, Saccoccio VL, Iijima T, Collins EM, Rosenthal GG, Warkentin KM (2010) The shape of things to come: linking developmental plasticity to post-metamorphic morphology in anurans. *J Evol Biol* 23:1364–1373
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183–190
- Gotthard K, Sören N (1995) Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos* 74:3–17
- Handrigan GR, Wassersug RJ (2007) The anuran *Bauplan*: a review on the adaptive, developmental, and genetic underpinnings of frog and tadpole morphology. *Biol Rev* 82:1–25
- Harris RN (1999) The anuran tadpole: evolution and maintenance. In: McDiarmid RW, Altig R (eds) Tadpoles. The biology of anuran larvae. University of Chicago Press, Chicago, pp 279–294
- Hensley FR (1993) Ontogenetic loss of phenotypic plasticity of age at metamorphosis in tadpoles. *Ecology* 74:2405–2412
- Hourdy J, Beaumont A (1985) Les métamorphoses des amphibiens. Masson, Paris
- Huxley JS (1932) Problems of relative growth. Lincoln MacVeagh Dial, New York
- James RS, Wilson RS (2008) Explosive jumping: extreme morphological and physiological specializations of Australian rocket frogs. *Physiol Biochem Zool* 81(2):176–185
- Kulkarni SS, Gomez-Mestre I, Moskalik CL, Storz BL, Buchholz DR (2011) Evolutionary reduction of developmental plasticity in desert spadefoot toads. *J Evol Biol* 24:2445–2455
- Laurila A, Pakkasmaa S, Crochet PA, Merilä J (2002) Predator-induced plasticity in early life history and morphology in two anuran amphibians. *Oecologia* 132:524–530
- Leips J, Travis J (1994) Metamorphic responses to changing food levels in two species of hylid frogs. *Ecology* 75(5):1345–1356
- Leips J, McManus MG, Travis J (2000) Response of treefrog larvae to drying ponds: comparing temporary and permanent pond breeders. *Ecology* 81:2997–3008
- Lind MI, Persbo F, Johansson F (2008) Pool desiccation and developmental thresholds in the common frog, *Rana temporaria*. *Proc R Soc Lond B* 275:1073–1080
- Llewelyn J, Phillips BL, Alford RA, Schwarzkopf L, Shine R (2010) Locomotor performance in an invasive species: cane toads from

- the invasion front have greater endurance, but not speed, compared to conspecifics from a long-colonised area. *Oecologia* 162:343–348
- Llorente GA, Montori A, Santos X, Carretero MA (1995) Atlas dels amfibis i rèptils de Catalunya i Andorra. El Brau, Barcelona
- Llorente GA, Montori A, Santos X, Carretero MA (1997) *Discoglossus pictus*. In: Pleguezuelos JM (ed) *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*. Asociación Herpetológica Española—Universidad de Granada, Granada, pp 137–139
- Llorente GA, Montori A, Santos X, Carretero MA (2001) *Discoglossus pictus* (Othth 1837). Sapillo pintojo mediterráneo. In: Pleguezuelos JM, Márquez R, Lizana M (eds) *Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp 91–93
- Loman J, Claesson D (2003) Plastic response to pond drying in tadpoles *Rana temporaria*: tests of cost models. *Evol Ecol Res* 5:179–194
- Márquez-García M, Correa-Solis M, Sallaberry M, Méndez MA (2009) Effects of pond drying on morphological and life-history traits in the anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evol Ecol Res* 11:803–815
- Martínez-Solano I (2009) Sapillo pintojo mediterráneo—*Discoglossus pictus* Othth 1837. In: Salvador A, Martínez-Solano I (eds) *Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, pp 1–13. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- McCoy MW (2007) Conspecific density determines the magnitude and character of predator-induced phenotype. *Oecologia* 153:871–878
- McCoy MW, Bolker BM, Osenberg CW, Miner BG, Vonesh JR (2006) Size correction: comparing morphological traits among populations and environments. *Oecologia* 148:547–554
- Merilä J, Laurila A, Lindgren B (2004) Variation in the degree and costs of adaptive phenotypic plasticity among *Rana temporaria* populations. *J Evol Biol* 17:1132–1140
- Morey S, Reznick D (2000) A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology* 81:1736–1749
- Morey SR, Reznick D (2004) The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. *Oikos* 104:172–190
- Newman RA (1989) Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology* 70:1775–1787
- Newman RA (1992) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *Bioscience* 42:671–678
- Newman RA (1998) Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia* 115:9–16
- Newman RA, Dunham AE (1994) Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia* 1994:372–381
- Plaistow SJ, Lapsley CT, Beckerman AP, Benton TG (2004) Age and size at maturity: sex, environmental variability and developmental thresholds. *Proc R Soc Lond B* 271:919–924
- Pujol-Buxó E, San-Sebastián O, Garriga N, Llorente GA (2012) How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators? *Oikos*. doi:10.1111/j.1600-0706.2012.20617.x
- R Development Core Team (2007) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A (2004) Responses to competition effects of two anuran tadpoles according to life-history traits. *Oikos* 106:39–50
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A (2006) Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evol Ecol Res* 8:309–320
- Richter-Boix A, Garriga N, Montori A, Franch M, San Sebastian O, Villero D, Llorente GA (2012) Effects of the non-native amphibian species *Discoglossus pictus* on the recipient amphibian community: niche overlap, competition and community organization. *Biol Invasions*. doi:10.1007/s10530-012-0328-4
- Rose CS (2005) Integrating ecology and developmental biology to explain the timing of frog metamorphosis. *Trends Ecol Evol* 20:129–135
- Rowe L, Ludwig D (1991) Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology* 72:413–427
- Rudolf VHW, Rödel M-O (2007) Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under uncertain time constraints. *Evol Ecol* 21:121–142
- Salvador A, García París M (2001) Anfibios españoles. Identificación, historia natural y Distribución. Esfagnos, Talavera de la Reina
- Savage RM (1952) Ecological, physiological and anatomical observations on some species of anuran tadpoles. *Proc Zool Soc Lond* 122:467–514
- Savage RM (1962) The ecology and life history of the common frog: *Rana temporaria temporaria*. Hafner, New York
- Semlitsch RD (1987) Paedomorphosis in *Ambystoma talpoideum*: effects of density, food, and pond drying. *Ecology* 68:994–1002
- Smith DC (1987) Adult recruitment in chorus frog: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68:344–350
- Tejedo M, Reques R (1994) Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles: the interactive effects of density and pond duration. *Oikos* 71:295–304
- Touchon JC, Warkentin KM (2011) Thermally contingent plasticity: temperature alters expression of predator-induced colour and morphology in a neotropical treefrog tadpole. *J Anim Ecol* 80:79–88
- Travis J (1984) Anuran size at metamorphosis: experimental test of a model based on intraspecific competition. *Ecology* 65:1155–1160
- Van Buskirk J, Saxer G (2001) Delayed costs of an induced defense in tadpoles? Morphology, hopping, and development rate at metamorphosis. *Evol Int J Org Evol* 55:821–829
- Walton M (1988) Relationships among metabolic, locomotor, and field measures of organismal performance in the Fowler's toad (*Bufo woodhousei fowleri*). *Physiol Zool* 61:107–118
- Wassersug RJ, Sperry DG (1977) The relationship of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). *Ecology* 58:830–839
- Watkins TB (2001) A quantitative genetic test of adaptive decoupling across metamorphosis for locomotor and life-history traits in the Pacific tree frog, *Hyla regilla*. *Evol Int J Org Evol* 55:1668–1677
- Wells KD (2007) Complex life cycles and the ecology of amphibian metamorphosis. In: Wells KD (ed) *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press, Chicago, pp 599–644
- Werner EE (1986) Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *Am Nat* 128:319–341
- Wilbur HM (1977) Propagule size, number, and dispersion patterns in *Ambystoma* and *Rana sylvatica*. *Am Nat* 111:43–68
- Wilbur HM (1980) Complex life cycles. *Ann Rev Ecol Syst* 11:67–93
- Wilbur HM (1987) Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond communities. *Ecology* 68:1437–1452
- Wilbur HM, Collins JP (1973) Ecological aspects of amphibian metamorphosis: nonnormal distributions of competitive ability reflect selection for facultative metamorphosis. *Science* 182:1305–1314
- Zug GR (1972) Anuran locomotion: structure and function. I. Preliminary observations on relation between jumping and osteometrics of appendicular and postaxial skeleton. *Copeia* 4:613–624

Resumen del capítulo 3. Análisis comparativo de la respuesta de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Pelodytes punctatus* a la presencia de depredadores autóctonos y alóctono

Pujol-Buxó, E., San Sebastián, O., Garriga, N. & Llorente, G. A. 2013. How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators? *Oikos*, 122: 19–29 pp. Doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20617.x

El impacto ecológico de las invasiones biológicas ha sido ampliamente estudiado, sin embargo es reducido su conocimiento en términos de ecología evolutiva. Tal y como indican estudios previos, la plasticidad fenotípica frente a la depredación es una de las fuerzas ecológicas más importantes en la supervivencia y evolución de la presa frente a nuevos depredadores. Asimismo, las invasiones biológicas representan una oportunidad única en el estudio de la evolución potencial de dicha plasticidad y, por tanto, de respuesta ante los depredadores del sistema receptor. La diferencia en el tiempo de coexistencia entre las especies nativas y las invasoras frente a los depredadores nativos y ante depredadores introducidos, permite explorar el potencial efecto de la naturaleza invasora en la respuesta de las especies y su evolución potencial. Por otra parte, el estudio de la plasticidad fenotípica de las especies invasoras frente a los depredadores del sistema receptor indica el éxito potencial de éstas en el nuevo sistema. Este trabajo analiza la respuesta de un anuro invasor (*Discoglossus pictus*) a diferentes depredadores, así como la de una especie nativa (*Pelodytes punctatus*) a los mismos. Para ello se seleccionaron 3 depredadores potenciales del área de introducción con diferencias en su tiempo de coexistencia con ambas especies: larvas de odonato nativas (*Anax* sp.), y dos especies de depredadores introducidas, la gambusia (*Gambusia holbrooki*) y el cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*). Se observó una marcada respuesta de los renacuajos de ambas especies frente al depredador nativo y una más leve ante los introducidos. Las larvas del anuro nativo (*P. punctatus*) desarrollaron una respuesta morfológica frente al cangrejo rojo americano con el que ha convivido apenas 30 años y una respuesta conductual ante la presencia de gambusia. Por otro lado, *D. pictus* presentó una respuesta conductual ante todos los depredadores y morfológica únicamente ante el depredador nativo. Estos resultados reafirman el carácter específico de esta respuesta destacado en otros estudios, y sugiere una potencial disociación evolutiva entre la plasticidad conductual y morfológica en anfibios. Probablemente la especificidad en la plasticidad de la respuesta y los

costes asociados se deba al nicho ecológico que ocupa cada una y su historia evolutiva. Teniendo en cuenta la velocidad en los cambios evolutivos y su utilidad a la hora de evitar la depredación, estos resultados destacan la importancia de la plasticidad fenotípica en las dinámicas poblacionales durante las invasiones biológicas.



How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators?

Eudald Pujol-Buxó, Olatz San Sebastián, Núria Garriga and Gustavo A. Llorente

E. Pujol-Buxó (eudaldp@hotmail.com), O. San Sebastián, N. Garriga and G. A. Llorente, Depto de Biología Animal, Facultad de Biología, Univ. de Barcelona, Av. Diagonal 643, ES-08028 Barcelona, Spain. OSS also at: Depto de Herpetología, Aranzadi Zientzia Elkarte-Sociedad de Ciencias Aranzadi, Zorroagaina 11, ES-20014 Donostia-San Sebastián, Spain.

Synthesis

Anti-predator phenotypic plasticity is expected to be one of the major ecological forces driving survival and rapid evolution of prey facing new predators. This implies that biological invasions embody a perfect case for studying the tradeoffs and evolution of phenotypic plasticity. Our manuscript reports on high prey–predator specificity in these reactions and an evolutionary dissociation between behavioral and morphological plasticity in anurans. Each species displayed a particular set of tradeoffs between plastic responses and their costs, but interestingly we also detected mild patterns in combinations using introduced predators. Given the speed at which these evolutionary changes become noticeable and their potential in reducing predation risk, the role of antipredator phenotypic plasticity is expected to be crucial for population dynamics during biological invasions.

Although the purely ecological impacts of biological invasions have been well studied, a less thorough effort has been made in terms of their evolutionary ecology. Previous studies show that anti-predator phenotypic plasticity may be one of the major ecological forces driving survival and rapid evolution of prey facing new predators. In turn, this means that biological invasions embody a perfect case for studying the tradeoffs and evolution of phenotypic plasticity per se. Here, we studied the plastic responses of native (*Pelodytes punctatus*) and invasive (*Discoglossus pictus*) anurans facing a native (dragonfly *Anax* sp.) and two invasive (fish *Gambusia holbrooki* and crayfish *Procambarus clarkii*) predators. Marked responses were reported against the native predator from both the native and the invasive anuran, but they both responded mildly to the exotic predator as well. Native *P. punctatus* displayed a morphological reaction to invasive *P. clarkii* after scarcely 30 years of coexistence with this predatory crayfish and responded behaviorally to the invasive fish *G. holbrooki*. Invasive *D. pictus* reacted behaviorally to all predators, but unexpectedly only reacted morphologically to native *Anax* sp. All these results support high prey–predator specificity in these reactions and an evolutionary dissociation between behavioral and morphological plasticity in anurans. Each species displayed a particular set of tradeoffs between plastic responses and their costs, which is probably due to differences in ecological niche and evolutionary history, but interestingly we usually detected unexpected patterns in combinations using introduced predators. This suggests that perhaps singular plastic shifts usually occur when tadpoles face recently introduced species. Given the speed in which these evolutionary changes become noticeable and their potential in avoiding predation risk, this study supports that phenotypic plasticity might play an important role in population dynamics during biological invasions.

Of all the possible interactions between species in a community, predation often constitutes the major force that affects prey population dynamics, possibly triggering considerable cascade effects (Shurin et al. 2002). Accordingly, prey commonly evolve several ways of avoiding and reducing predation risk, ranging from permanent structures and behavior to morphological and behavioral plasticity (Agrawal 2001). However, introduced predator species may come from remote biotas. In such cases, there is no previous contact with the native community and the naïve prey is initially more vulnerable, what may give invasive predators a considerable advantage. Although various cases of prey extinction have been reported (Gurevitch and Padilla

2004), rapid evolutionary change, which usually involves inducible defenses, can enhance the ability of prey populations to respond to and survive novel predators (Phillips and Shine 2006, Fisk et al. 2007). Consequently, some studies have modeled adaptive phenotypic plasticity as a key evolutionary force opposing species invasions (Peacor et al. 2006, Latta et al. 2007). An assessment of these fast evolutionary changes in novel predator–prey interactions is essential to predict the long-term ecological impact of biological invasions (Strauss et al. 2006). Given the growing presence of invasive species interacting in the same food webs, in this field it is also becoming necessary to work on possibilities such as interaction among invasive species,

considering all the evolutionary changes that may be happening at once.

Mediterranean anuran tadpoles represent common prey in ponds and show anti-predator adaptive plastic responses (Richter-Boix et al. 2007). These responses are triggered by chemical cues coming from predators and from injured prey during predation events (Petranka et al. 1987, Schoeppner and Relyea 2005, Fraker et al. 2009). According to previous studies, reducing general levels of activity is a common behavioral change when anuran tadpoles are exposed to known cues from potential predators or from predation events. This shift is usually interpreted as a way to avoid being perceived as prey (Anholt and Werner 1995, Relyea 2001b).

On the other hand, the most commonly reported morphological response to frequent arthropod predators such as dragonfly naiads is an increase in the height of tail fins. Given that these morphological changes do not seem to enhance swimming performance (Van Buskirk and McCollum 2000, Wilson et al. 2005), this can be interpreted as an effective lure to attract predator strikes to body surfaces on which an attack may not be lethal (Van Buskirk et al. 2003). Interestingly, further studies with various predators show that different anti-predator reactions are displayed confronting different threats (Relyea 2001b). Thus, reactions may be predator-specific, depending mainly on the effectiveness of each behavioral–morphological set in reducing predation risk (Wilson et al. 2005, Touchon and Warkentin 2008). However, it is obvious that these advantageous inducible changes must have limits and that they are linked to some costs. Some studies have shown that they can cause tadpoles to grow and develop more slowly (Relyea 2002), and that their costs are not only linked to larval development, but also to subsequent stages in ontogeny (Tejedo et al. 2010).

If we properly consider the responses to different native and invasive predators with different times of coevolution and the positive and negative aspects of these responses, invasion events serve as a perfect occasion to address the costs, limits and all other aspects driving the evolution of phenotypic plasticity. Hence, in recent years, some studies have addressed issues related to tadpoles' inducible defenses against invasive predators, with divergent results. While some studies clearly demonstrate a lack of response to invasive predators in certain anuran species (Smith et al. 2007, Polo-Cavia et al. 2010, Gomez-Mestre and Díaz-Paniagua 2011), other works report varied combinations of behavioral and morphological responses in other species after a relatively short period of coexistence with the invasive predator (Kiesecker and Blaustein 1997, Griffiths et al. 1998, Chivers et al. 2001, Pearl et al. 2003, Cruz and Rebelo 2005, Almeida et al. 2011, Gonçalves et al. 2011). This suggests that no single rule can be made for these events. Thus, when confronting this complex topic, aspects like the frequency of co-occurrence, the recognition and importance of chemical cues, and each species' use of microhabitat or ecological niche need to be taken in consideration.

Here we tested the plastic responses of a native (common parsley frog *Pelodytes punctatus*) and an invasive (Mediterranean painted frog *Discoglossus pictus*) anuran species acting as prey in front of three different predators,

two of them invasive (crayfish *Procambarus clarkii* and fish *Gambusia holbrooki*) and the other native (dragonfly larvae *Anax* sp.). We expected an effective plastic behavioral and morphological response when native prey were exposed to native predators and some novel responses in the other combinations. The nature and the degree of these initial responses (and even their sole presence or absence) should be related with the time of coevolution, several ecological factors and the hypothetical effectiveness of each reaction in each case. Finally, we expected a set of reactions to induce a predictable set of costs. Hence, the chosen list of species gives us the opportunity to test native and invasive prey responses in front of native and invasive predators, while indeed testing utterly real interactions that take place in nature.

Material and methods

Study species

Since its recent introduction from Algerian specimens (Francesca and Roberta 2006) in around 1906 in Banyuls-sur-Mer, *Discoglossus pictus auritus* has expanded approximately 130 km northwards, 140 km southwards and 60 km inland. This species now occupies a wide coastal strip from the River Orb in France to the River Tordera in Spain (Montori et al. 2007) and all published material confirms and predicts continuing expansion of this species. These populations show great versatility in their choice of reproduction points, but prefer temporary and ephemeral ponds in open spaces, overlapping niche chiefly with the natives *Bufo calamita* and *Pelodytes punctatus* (Montori et al. 2007). We chose *Pelodytes punctatus* out of these two native species because it is highly plastic and is the most likely to face all three selected invasive species at some point, given its reproductive adaptability using the entire pond permanency gradient (Richter-Boix et al. 2007). As native predator, we chose larval Aeshnid dragonflies (*Anax* sp.). These species are proven predators of tadpoles and commonly occur together with *P. punctatus* and *D. pictus* larvae in ponds within the study area (Richter-Boix et al. 2007), and they are usually used in inducible defenses experiments (Peacor and Werner 1997, Van Buskirk et al. 2003). We chose *Gambusia holbrooki* as an introduced fish predator present in the same area. This species was first reported in the Iberian Peninsula in 1921, when it was introduced to control mosquito populations in order to fight malaria. Since then, the approach became quickly common to cope with mosquitoes all over the peninsula (Elvira 2001), so this species could also be deemed a recent introduction. Some studies have confirmed this species' ability to predate tadpoles and interfere drastically with the reproductive dynamics of amphibian populations in permanent pond communities (Kats and Ferrer 2003). The third predator chosen was the American red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. First citations of this invasive species in the same study zone date from the start of the 1980s. It became a widely extended species in the area before 1990 (M. Franch pers. comm.), so it is a very recent introduction. It is well adapted to live in areas with seasonal fluctuations in water

levels, where survives the dry season in simple burrows. Therefore, it can potentially colonize most water bodies except the most ephemeral ones (Cruz and Rebelo 2005). Several studies have reported that this species predated the spawn, larvae and adults of local amphibians (Cruz et al. 2006a), and some indicate that *Procambarus clarkii* is a key factor in inducing the decadence of amphibian populations in the Iberian Peninsula and Europe (Cruz et al. 2006b, Gherardi and Acquistapace 2007), which makes an in-depth study of its predatory relationship with larval anurans highly desirable.

General experimental design

The morphological and behavioral anti-predator responses of *Pelodytes punctatus* and *Discoglossus pictus* to the three chosen predators were tested in two equivalent short-term laboratory experiments in consecutive years (2008 and 2009 respectively for *P. punctatus* and *D. pictus*). We reproduced precisely the same controlled conditions for both species, even using exactly the same material and experimental venue, which makes the results completely comparable. The clutches and predators used in each experiment were collected from natural ponds within each species' natural range. We took five clutches of *P. punctatus* from the Garraf massif (Barcelona, northeastern Spain) and four clutches of *D. pictus* from Riudarenes (Girona, northeastern Spain). We collected several larvae of *Anax* sp., median size individuals of *P. clarkii* (8–10 cm body length) and several adults of *G. holbrooki* each year to act as predators. All predators were captured in the same ponds as the clutches or from nearby ponds with registered amphibian reproductive activity. Each collected clutch was brought to the laboratory and placed in an individual container (1.20 × 0.45 × 0.40 m) filled with 30 l of dechlorinated water. Once tadpoles had achieved Gosner stage 25 (Gosner 1960), they were transferred to the treatment tanks. These tanks had the same conditions and dimensions as the hatching containers and contained 20 tadpoles each. According to previous studies, these larval densities cannot trigger plastic anti-competition reactions (Relyea 2004).

To avoid uncontrolled effects due to possible particularities in single clutches, we selected tadpoles in the same proportions from the different spawns. Thus, we consider that possible effects of the presence of predators or competitors prior to our manipulation of the spawns or the deleterious particularities of a concrete spawn were leveled in all tanks. The experiments were performed in a climate room (21–23°C, photoperiod 14L:10D) at Univ. of Barcelona laboratories. After a week, we placed the predator specimens in perforated cylindrical cages (diameter 11 cm) submerged in the tanks, with a double net bottom (mesh size 2 mm). The cages prevented the predators from capturing the tadpoles, but allowed water to flow through (a similar arrangement as in Richter-Boix et al. 2007). Thus, the 20 anuran larvae were in chemical but not physical contact with the chosen predators. The experimental design consisted of four treatments (treatment C, control treatment: 20 tadpoles + 2 empty cages per tank; treatment A: 20 tadpoles + 2 caged larvae of *Anax* sp. per tank; treatment P: 20 tadpoles + 2 caged individuals of *P. clarkii* per

tank; treatment G: 20 tadpoles + 4 caged individuals of *G. holbrooki* per tank) each replicated five times, making a total of 20 experimental tanks. We used twice as many predators in the G treatment to avoid extremely mismatching predator biomasses between treatments. Tadpoles were fed ad libitum the same amount of commercial rabbit pellets, three times a week. Predators consumed tadpoles of the same species tested in each running experiment in order to simulate natural predation of siblings in the pond. Since variations in tadpole consumption by predators can affect the availability of chemical cues and alter the responses during the experiment (Schoeppner and Relyea 2005, Peacor 2006, Fraker et al. 2009), each cage of predators received a constant rate of one tadpole per day as food.

Response variables and acquisition of raw data

Throughout the experiment, we checked tadpole survival and stage daily. Survival was defined as the proportion of tadpoles that reached Gosner stage 42 in each tank. Once a tadpole had achieved Gosner stage 42, it was numbered and placed in an individual cage with some water and an absorbent cloth to keep moist until it had achieved Gosner stage 46. Thus, we could report their larval period (days from hatching to attaining Gosner stage 42), tail resorption time (days from reaching Gosner stage 42 to attaining Gosner stage 46), and time to complete metamorphosis (the addition of the two former variables). However, owing to problems in the sampling of juveniles during the *D. pictus* experiment, the only data available in this latter case was the larval period.

We monitored levels of tadpole activity using the proportion of active tadpoles (i.e. larvae that were swimming or feeding, as in Relyea 2004) seen two times per day in each tank at the moment it was first viewed. The proportion of active specimens (level of activity) was the number of active tadpoles divided by the total number of tadpoles observed at first glance (similar to Peacor and Werner 1997, Relyea 2002). These measures were taken on five days spread from the second week of the experiment to the start of extensive metamorphosis.

Three weeks after the experiment was initiated, we measured larval morphologies by tracing a lateral photograph of each larva using Sigma Scan Pro 5.0 software. We took six linear measures (similarly to Relyea 2001b): body length, body height, tail length, fin height, fin length and musculature height (from now on musculature). We obtained values of total larval length by adding body length and tail length. After tail resorption (Gosner stage 46), we took seven measurements of juveniles following the same methodology as in tadpoles. The juveniles' measures were also those normally used in these cases (similar to Relyea and Hoverman 2003): body length, body width, femur length, muscular femur width (from now on femur width), tibia-fibula length, muscular tibia-fibula width (from now on tibia-fibula width) and foot length.

Statistical analyses

Proportions of survival and tadpole activity were all arcsin transformed and analyzed using linear model ANOVAs.

Timing data were non-normal and were analyzed using Kruskal–Wallis ANOVAs. Total length in tadpoles and body length in juveniles were tested using linear model ANOVAs and were taken as individual size indicators in all morphologic analyses that were run. Because all the morphologic reactions displayed by tadpoles are not independent from each other, we explored the multivariate effects on tadpole shape of treatment and interaction between size and treatment using MANCOVAs, including all morphological variables except body length. This variable was excluded to avoid redundancy, given that it is the counterpart of tail length when using tadpole total length as covariate. Once the multivariate effects of interaction were confirmed or rejected by the exploratory MANCOVAs, we ran factorial or one-way MANCOVAs respectively. Multivariate differences in juvenile morphology were tested using the same methodology. Once general multivariate divergences in morphology had been confirmed, we tested the effects of treatment and interaction between size and treatment on single morphologic traits. Once the interaction was confirmed or rejected according to previous exploratory ANCOVAs, we applied respectively separate or homogeneous slopes linear model univariate analyses of covariance (ANCOVAs) with the size indicators as a covariate and followed by Scheffé post hoc tests. As multivariate exploratory techniques we conducted canonical and discriminant analyses using the residuals of regressions of each morphologic measure against total length (body length for juveniles) as size-corrected variables of shape, excluding again tadpole body length to avoid redundancy. Thus we obtained a percentage of classification that was understood as a rough numerical indication of the morphologic divergence of each treatment from the others and a multivariate graphic support (not shown) for interpreting these results. These same size-corrected variables were used to produce the figures in this manuscript. All statistical tests were conducted using Statistica 8 software.

Results

Survival and developmental timing

We found highly significant differences in the overall levels of mortality between species ($F_{1,38} = 76.82$, $p < 0.0001$): *Pelodytes punctatus* had a mean mortality of 46% and *Discoglossus pictus* had a mean mortality of 5%. In addition, each species responded differently to the four treatments ($F_{3,32} = 4.42$, $p = 0.0103$). Significant differences occurred among treatments in *P. punctatus* ($F_{3,16} = 4.94$, $p = 0.0129$). Treatment A had a mortality of 66%, while a level of approximately 40% was maintained in the other three treatments (all $p < 0.05$ when compared to the rest of treatments). This was not reported in *D. pictus* ($F_{3,16} = 0.39$, $p = 0.7618$), which had a low and nearly constant level of mortality in all treatments.

In the *P. punctatus* experiment, no significant differences existed between treatments in the time to complete metamorphosis (Kruskal–Wallis $H_{3,211} = 0.69$, $p = 0.8748$) or in the larval period (Kruskal–Wallis $H_{3,211} = 0.46$, $p = 0.9278$). However, we found significant differences in tail resorp-

tion time (Kruskal–Wallis $H_{3,211} = 19.06$, $p = 0.0003$): *P. punctatus* larvae that were in chemical contact with *Anax* sp. took two days more on average to reabsorb their tail (between six and seven days in total) than the specimens from the rest of treatments (with very similar durations of four or five days, on average). In contrast, *D. pictus* larvae exposed to *Anax* sp. chemical cues showed a significant lengthening of the larval period (Kruskal–Wallis $H_{3,378} = 23.59$, $p < 0.0001$), as they took approximately four days more to leave the water (roughly 46–47 days) than the rest of individuals (which had very similar results among treatments of 42 days approximately).

Behavior: levels of activity

Overall levels of activity diverged significantly between species ($F_{1,298} = 41.33$, $p < 0.0001$, Fig. 1) and between treatments for both species ($F_{3,96} = 14.58$, $p < 0.0001$ for *P. punctatus*, and $F_{3,96} = 9.16$, $p < 0.0001$ for *D. pictus*). *Pelodytes punctatus* larvae in chemical contact with *Anax* sp. naiads had a noticeable behavioral response in comparison to the control ($p < 0.0001$), with approximately 54% lower general levels of activity. We observed a more moderate reaction in *Gambusia holbrooki* tadpoles ($p = 0.0099$), in which activity levels dropped by approximately 30%. Although mean activity levels were lower in *Procambarus clarkii* tadpoles than in the control, no significant overall differences were reported between these two treatments ($p = 0.4649$). *Discoglossus pictus* larvae displayed a significant behavioral response to all predators in the experiment, with 35 and 40% less activity than the control in all cases ($p < 0.05$ for A, G and P treatments).

Larval morphology of *Pelodytes punctatus*

No significant divergence was observed in total length of *P. punctatus* tadpoles among treatments ($F_{3,190} = 1.395$, $p = 0.2456$), but marked morphological divergence among treatments was found according to multivariate analyses ($F_{15,15,5} [\text{Treat} \times \text{Total length}] = 604.57$, $p < 0.0001$, and $F_{15,15,5} [\text{Treat}] = 1.91$, $p = 0.0195$). All measures showed significant differences ($p < 0.05$ either in the interaction or the treatment effect, Table 1), except fin length ($p = 0.0537$). Invasive crayfish tadpoles were relatively larger bodied than all other tadpoles and consequently had relatively shorter tails (all $p < 0.0001$ for body height and length, tail length and fin length). All predator treatments displayed an affinity to growing higher fins than control tadpoles, with highly significant differences in native dragonfly and invasive crayfish tadpoles ($p < 0.0001$ in both cases), but no significant differences in *G. holbrooki* tadpoles ($p = 0.1821$). There was also a tendency to grow more musculature in all predator treatments, but differences were again only significant in native dragonfly and invasive crayfish tadpoles in post hoc analyses ($p = 0.0041$ and $p < 0.0001$ when compared to control). Fins tended to be longer in native dragonfly and invasive crayfish tadpoles, but only invasive crayfish tadpoles had significantly longer fins according to post hoc analyses ($p < 0.0001$ when compared to the control). Discriminant and canonical analyses indicate that native dragonfly treatment was the

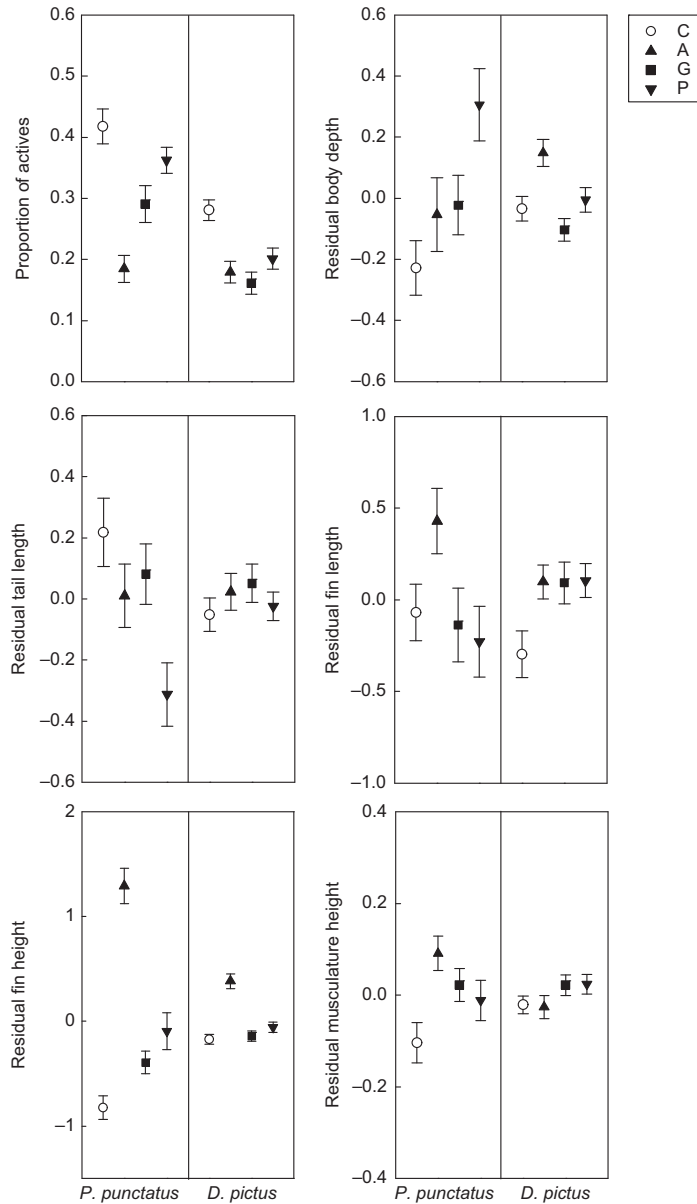


Figure 1. Larval behavior and morphology (according to the size-corrected variables used to run multivariate tests) in both species. C = Control treatment, A = *Anax* sp. treatment, G = *Gambusia holbrooki* treatment, P = *Procambarus clarkii* treatment. Results of predator treatments are positioned more rightwards in the figure as predators' presence is more recent in the study zone. Error bars refer to standard error.

only to use a clearly different morphological space: while *Anax* sp. was visibly separate from the rest of the treatments (71.4% of correct classifications), these remain mixed and unclassifiable in multivariate analyses (correct classification percentages of 45.8% in the control treatment, 38.8% in *G. holbrooki* treatment and 45.8% in *P. clarkii* treatment).

Larval morphology of *Discoglossus pictus*

Differences in total length of *D. pictus* tadpoles ($F_{3,193} = 3.2672$, $p = 0.0224$) lacked a clear pattern and all disappeared in post hoc analyses. However, clear morphologic divergences occurred according to multivariate analyses

Table 1. Linear model ANCOVAs (with and without the interaction term) for effects of treatment on tadpole morphology in both species.

	MS (Treat × Size)	MS (Treat)	F _{4,3,86} (Treat × Size)	F _{4,3,186} (Treat)	F _{1,3,189} (Treat) ^Δ	p (Treat × Size)	p (Treat)
<i>P. punctatus</i>							
Body length	819,7974	0,9024	1593,1170	1,7540		0.0000	0.1576
Body height		2,4319			4,3650		0.0053
Tail length	2818,2760	0,9020	5476,7710	1,7540		0.0000	0.1576
Fin length		4,2500			2,5980		0.0537
Fin height	408,9896	2,6580	420,8731	2,7353		0.0000	0.0450
Musc. height	39,3042	0,3720	533,7756	5,0521		0.0000	0.0022
<i>D. pictus</i>							
Body length	50,9408	0,6406	340,0057	4,2754		0.0000	0.0060
Body height	12,9486	0,2984	171,3419	3,9492		0.0000	0.0092
Tail length	224,0040	0,6406	1495,1190	4,2750		0.0000	0.0060
Fin length		1,9320			3,3600		0.0199
Fin height	20,5759	0,3092	150,0024	2,2254		0.0000	0.0835
Musc. height		0,0357			1,5055		0.2144

Δ, tests using models without interaction.

(F_{15,15,5} [Treat × Total length] = 614.53, p < 0.0001 and F_{15,15,5} [Treat] = 1.74, p = 0.0402) (Table 1). Body height differences were insignificant in post hoc analyses, but each treatment displayed a singular ratio between body and tail length (all p < 0.05 tail length post hoc analyses), having control tadpoles the relatively shortest tails. All predator treatments had also longer fins than the control treatment (Fig. 1), but according to post hoc tests these differences were only significant in *G. holbrooki* (p < 0.05) and *Anax* sp. (p < 0.0001) tadpoles when compared to control treatment. Interestingly, only *Anax* sp. tadpoles displayed markedly higher fins than control (p = 0.0093). Discriminant and canonical analyses showed that treatment *Anax* sp. treatment was the only one that was distinctive from the others, with a correct classification of 70.8%, while the rest remain largely unclassified (correct classifications of 51.0% for control, 42.0% for *G. holbrooki* tadpoles, and 24.0% for *P. clarkii* tadpoles).

Juvenile morphology of *Pelodytes punctatus*

Although significant differences were found in absolute body length of *P. punctatus* juveniles, these were only held

between *G. holbrooki* and *P. clarkii* treatments (p = 0.0048), and no clear pattern was observed. However, there was a highly marked divergence among treatments according to multivariate analyses (F_{18,6} [Treat] = 568.99, p < 0.0001) and significant divergence was found in all univariate morphologic analyses (Table 2). Variation in relative body width showed a seemingly clear pattern (Fig. 2), decreasing along predator treatments as predators were more recently introduced, falling to the lowest values in *P. clarkii* juveniles. In this case, all combinations gave significant post-hoc results (p < 0.001), except differences between *Anax* sp. treatment and control (p = 0.9961) and differences between *P. clarkii* and *G. holbrooki* treatments (p = 0.2604). The model for the hind limb seems clear as well: while juveniles from both invasive treatments tended to have slightly more powerful hind limbs than the control treatment, native dragonfly juveniles had clearly weaker (both shorter and thinner) hind limbs than the rest. Discriminant analysis classified quite correctly control (62.3%) and *P. clarkii* (65.5%) juveniles, but performed feebly in *Anax* sp. (48.4%) and incorrectly in the *G. holbrooki* treatment (31.1%). However, despite the correct classifications, canonical analysis showed a high overlap between all treatments.

Table 2. Linear model ANCOVAs (with and without the interaction term) for effects of treatment on juvenile morphology in both species.

	MS (Treat × Size)	MS (Treat)	F _{4,3,203} (Treat × Size)	F _{4,3,203} (Treat)	F _{1,3,206} (Treat) ^Δ	p (Treat × Size)	p (Treat)
<i>P. punctatus</i>							
Body width		3,2193			30,1505		0.0000
Femur length		4,2097			22,9893		0.0000
Femur width		0,1543			2,7931		0.0415
Tibiofibula length		0,8611			5,0999		0.0020
Tibiofibula width		0,1099			5,3105		0.0015
Foot length		0,0004			6,2629		0.0004
<i>D. pictus</i>							
Body width		0,0459			1,3087		0.2712
Femur length		0,0148			0,2234		0.8801
Femur width		0,1183			4,3753		0.0048
Tibiofibula length	19,0972	0,2064	310,2306	3,3525		0.0000	0.0191
Tibiofibula width	2,1361	0,0860	90,7082	3,6519		0.0000	0.0128
Foot length		0,1418			1,0764		0.3590

Δ, tests using models without interaction.

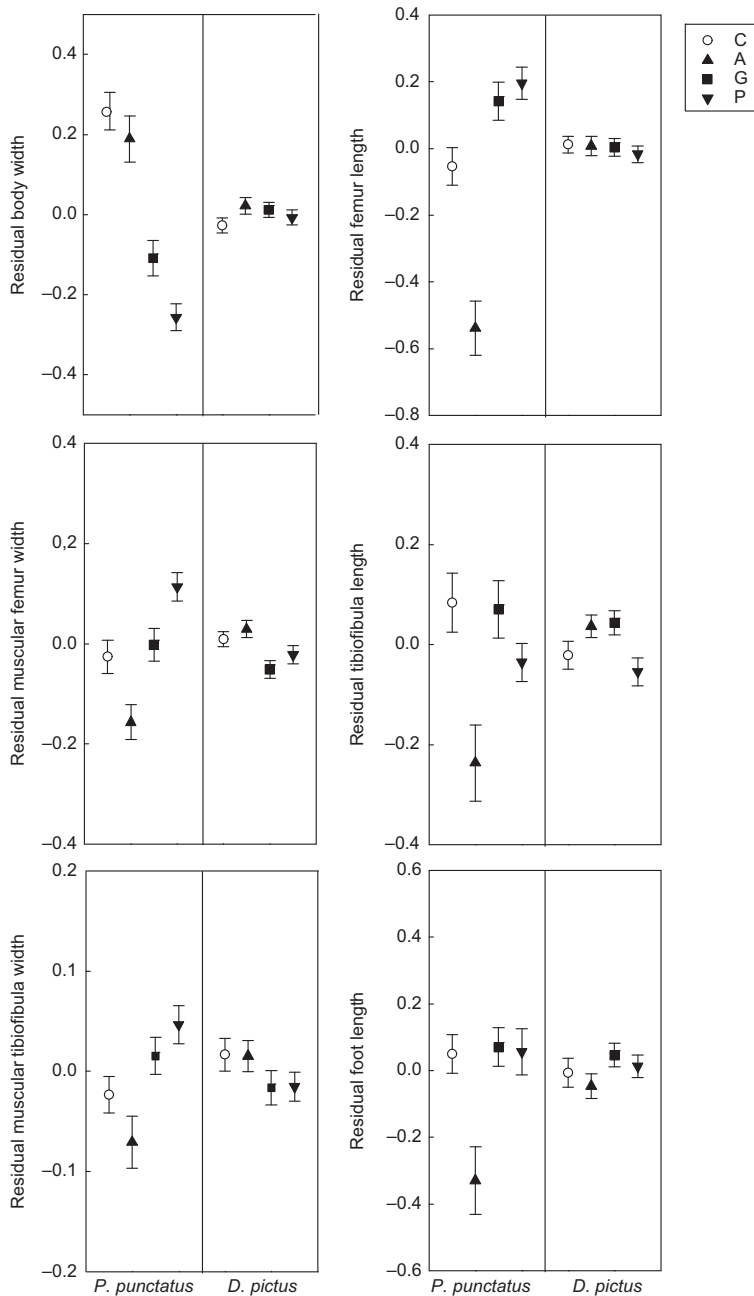


Figure 2. Juvenile morphology in both species according to the size-corrected variables used to run multivariate tests. C = Control treatment, A = *Anax* sp. treatment, G = *Gambusia holbrooki* treatment, P = *Procambarus clarkii* treatment. Results of predator treatments are positioned more rightwards in the figure as predators' presence is more recent in the study zone. Error bars refer to standard error.

Juvenile morphology of *Discoglossus pictus*

Clear multivariate differences ($F_{18,18,6}$ [Treat \times Total length] = 41.81, $p < 0.0000$ and $F_{18,18,6}$ [Treat] = 2.31,

$p = 0.0014$) and highly significant variation in absolute body length ($F_{3,373} = 10.12$, $p < 0.0001$) was found in *D. pictus* juveniles. All predator treatments yielded significantly longer juveniles than the control ($p < 0.0001$ for

native dragonfly tadpoles, $p = 0.0244$ for invasive fish tadpoles, $p = 0.0029$ for invasive crayfish tadpoles), and the variation among predator treatments was not significant ($p > 0.15$). Although there were some differences in the relative femur width and tibia–fibula length and width (Table 2), there was no clear pattern in hind limb morphology in this case (Fig. 2). Discriminant and canonical analyses support the lack of a clear pattern of relative morphologic divergence among treatments, since no treatment achieved the threshold of 50% correct classification (correct classifications of 30.2% for control, 42.6% for *Anax* sp. tadpoles, 48.4% for *G. holbrooki* tadpoles, 28.3% for *P. clarkii* tadpoles).

Discussion

As expected from the literature (Richter-Boix et al. 2006, 2007), local dragonfly predators clearly triggered behavioral and morphological responses in *Pelodytes punctatus* larvae. However, we observed only behavioral responses against the invasive fish and only morphological responses against the invasive crayfish, in both cases milder than the reactions against the local predator. This opposite pattern of reactions from *P. punctatus* to both introduced predators reminds the results observed in some similar other studies (Wilson et al. 2005, Touchon and Warkentin 2008) and strongly supports that the expression of morphological and behavioral responses are not necessarily linked (Van Buskirk and McCollum 2000).

This means, in turn, that it must be possible to evolve each response separately as well. While reduced activity is usually considered a way to avoid detection (Anholt and Werner 1995, Relyea 2001b), induced higher fins diminish the probability of a lethal attack by growing fragile surfaces that act as a lure and can easily be torn off without fatal consequences (Van Buskirk et al. 2003). Given that amphibian prey can detect the chemical cues emitted by specific predators (Relyea 2003, Pearl et al. 2003), a precise combination of these responses in front of each predator could be easily favored (Van Buskirk 2001).

Invasive fish *Gambusia holbrooki* normally attacks in group and stalks tadpoles until they are totally consumed, this fish being much faster than tadpoles (unpubl.). As only a slight chance exists of a tadpole escaping once it has been detected by fish, high fins might be useless against this type of predator (Wilson et al. 2005, Touchon and Warkentin 2008), and a more effective plastic reaction would be to avoid recognition, that is, behavioral changes. Therefore, the mild behavioral reactions we observed in *P. punctatus* could be a microevolutionary midpoint to more drastic avoidance tactics against introduced *G. holbrooki*. This results, however, could also be explained as a generalized moderate response to fish cues (Ferrari et al. 2007), or even as an indicator of a still unspecific response to an unknown but detected predatory risk (Schoepfner and Relyea 2005).

On the other side, invasive crayfish *Procambarus clarkii* is an active seeker that mainly uses the bottom of water bodies (Cruz and Rebelo 2005). It does not usually pursue its victims, relying on explosive attacks and a firm grip once prey have been detected, even adopting a sit-and-wait strat-

egy (Gherardi et al. 2001). The lack of a clear behavioral reaction of *P. punctatus* to *P. clarkii* may indicate that is not useful, being inactive tadpoles at the bottom of ponds equally or even more at risk of predation than active individuals. This is the case in Cruz and Rebelo (2005), where this reaction was detected in some anuran species, but failed to increase survival. However, survivors escaping crayfish's first attack might not be stalked and hence not consumed, which could explain why morphological reactions similar to that displayed against local dragonflies can potentially lead to increased survival confronting *P. clarkii* (Gomez-Mestre and Diaz-Paniagua 2011). Although we clearly observed significant morphological reactions in a substantial subset of individuals of *P. punctatus*, they didn't occur in a large proportion of tadpoles, which may indicate that more time of coevolution is needed for a clear and general reaction. This contrasts with the lack of reactions in southwestern Iberian Peninsula green frogs against the same invasive crayfish (Gomez-Mestre and Diaz-Paniagua 2011). Given the ancient presence of a similar crayfish species (*Austropotamobius pallipes*) in our area (being southwestern Iberian Peninsula devoid of native crayfish), the presence of mild reactions after scarcely 30 years of coexistence could be explained arguing that cues have been co-opted or generalized (Ferrari et al. 2007) in our area. The different predatory habits and forced allopatry of the two crayfish species (Gherardi et al. 2001, Gil-Sánchez and Alba-Tercedor 2002), in addition to the importance of chemical communication within each species of crayfish (Rose 1986, Zulantz Schneider et al. 1999, Zulantz Schneider and Moore 2000) discards that *P. punctatus* tadpoles take invasive crayfish as an identical predator, but at the same time makes the possibility of co-option slightly remote. Hence, probably the best explanation could be superior plastic abilities in *P. punctatus* (Richter-Boix et al. 2007).

Invasive *Discoglossus pictus* responded similarly to all predators reducing its activity and increasing fin and tail length, but only tadpoles confronting native dragonfly displayed the typical antipredator high fins as well. Known that several Aeshnidae dragonfly species inhabiting northern Algeria are shared with the European areas occupied by *D. pictus* (Aguilar and Dommanget 1998), these results imply that similar encounters in its original biota already triggered a fin height increase, being dragonfly cues co-opted when introduced *D. pictus* populations met local Aeshnidae. This should explain why invasive *D. pictus* reacts so clearly against native *Anax* sp. individuals, being an interesting example of co-option of cues in anti-predator plasticity. Assuming that invasive *D. pictus* recognized only *Anax* sp. as a known predator, the observed pattern of reactions in this species matches with the results in Schoepfner and Relyea (2005), where only a full combination of alarm and consumption cues and known predator kairomones induced the full suite or magnitude of antipredator traits, while other mild responses were observed when some of these cues lacked. Hence, it clearly seems that the similar responses observed against all predators were triggered by alarm or consumption cues, while only the addition of known predator kairomones could induce the extra reaction (increase of fin height) in the tadpoles confronting local dragonflies.

Interestingly, despite this morphological reaction is clear, it is also markedly less exaggerated than the response observed

in native *P. punctatus* tadpoles exposed to the same dragonfly predator. Similar studies with known Algerian predators are required to know whether the milder nature of these morphological reactions in *D. pictus* are the result of a still improving co-opted response or due to poorer morphological plasticity in this invasive anuran.

Similar is the case in all behavioral reactions of this invasive anuran, which are proportionally similar to *P. punctatus* reactions confronting the invasive fish *G. holbrooki*. Although it could seem that the lower levels of control activity may limit *D. pictus*' behavioral reactions, being tadpoles obviously constrained to feed over sustainable minimums, this option should be discarded because *D. pictus* juveniles from the predator treatments arose significantly larger than control individuals. Thus, concerning behavior the best explanation clearly seems to be the existence of a particularly exhaustive response from native *P. punctatus* to native *Anax* sp. larvae.

We attribute the widespread high mortality rates observed in *P. punctatus* to a reduced viability in one of the collected spawns. Thanks to the initial balanced merging of clutches, we consider that this fact does not alter any interpretation of the results because all treatments had the same basal mortality. Hence, the additional mortality observed in native dragonfly *P. punctatus* tadpoles seems a noticeable cost of higher stress levels caused by detecting the known predator. This stress was manifestly important and even synergistically lethal in several studies (Relyea 2005, Relyea and Mills 2001, Relyea and Hoverman 2003). Albeit the high mortalities in this treatment (66%), we discard any predatory risk differences due to differential density because all initial densities were already low and all other treatments had a high mortality as well (40%). We observed noticeable metamorphosis delays in this same native versus native combination (longer resorption time) and when *D. pictus* was confronted to local dragonflies. These were the combinations with more exaggerate behavioral or morphological responses in both anurans, supporting the tradeoff between manifest anti-predator reactions and diminished growth and developmental rates in tadpoles (Relyea 2002). Neither mortality nor timing costs were observed confronting *P. punctatus* to introduced predators, confirming this linkage and a differential state of strain in larvae detecting known predator cues.

Concerning juveniles, body length and width are closely related to total mass, which in turn is an important character defining individual fitness in this developmental stage of anurans (Smith 1987). *Pelodytes punctatus* juveniles arose equally longer, but were significantly thinner as the predator was more recently introduced. This unusual pattern may account for a delayed cost that emerged after reacting to unknown predators, which may trigger responses that still require improvement and thus lead to uncommon costs. Conversely, invasive *D. pictus*' juveniles from all predator treatments were longer than control juveniles. Given the lower levels of activity in all predator treatments and the ad libitum feeding, the outcome might have been that these less active tadpoles had more energy to employ in growth. However, in natural conditions, such as in temporary or ephemeral ponds (commonly inhabited by this species), this unexpected additional gain could lack due

to limited food supplies, what seems to be a crucial point to consider in this species (Enriquez-Urzelai 2011).

It is known that relatively shorter hind limbs decrease jumping performance and consequently affect the fitness of juveniles (Wassersug and Sperry 1977, Walton 1988). This statement is even more reasonable in *P. punctatus* if we add that native dragonfly juveniles' hind limbs were not only shorter but also thinner. This results further support a possibly widespread tradeoff between immediate benefits of anti-predator plasticity in larvae and linked costs as relatively shorter hind limbs in juvenile stages (Tejedo et al. 2010). The advantageous sizes of hind limbs in *G. holbrooki* and *P. clarkii* tadpoles when compared to the control could add to the fact that the mild novel reactions against less known predators lead to atypical consequences for juveniles, even creating advantageous morphologies. However, perhaps these beneficial consequences are not restricted to reactions against invasive species (Relyea 2001a). The relative divergences in *D. pictus* juveniles did not show any clear pattern, suggesting that clear morphological costs might be unimportant or lack in invasive *D. pictus*, at least when faced with these three predators.

Thus, the usual tradeoffs between anti-predator responses in larval stages and juvenile fitness are only reported in native *P. punctatus*. Having already mentioned that all responses were milder in invasive *D. pictus*, we can hypothesize that these reactions may not yet have achieved the threshold for developing delayed costs. The other possibility is that *D. pictus* escapes such costs by naturally displaying more limited larval anti-predator plasticity. Some studies suggest that a particular use of the pond permanency gradient shapes the possibilities of evolving different plastic responses (Richter-Boix et al. 2007), so it is fairly likely that the marked use of temporary and ephemeral ponds with few predators fails to select strong anti-predatory adaptations in *D. pictus*. The use of several typologies of pond, regardless of low or high predator densities, could explain why *P. punctatus* exhibits more exaggerated anti-predator induced morphologies. Hence, as already mentioned, even though it seems that *D. pictus* is a globally less plastic species compared to *P. punctatus*, studies confronting *D. pictus* with Algerian predators are needed to confirm or reject this possibility.

On the other hand, the consistency of our estimations regarding gains and costs of all listed responses is limited because we could not evaluate the real effectiveness in reducing predation of all the observed anti-predator responses. For example, predation on tadpoles by invasive predators has been described as potentially catastrophic (Cruz and Rebelo 2005). Therefore, probably most tadpoles from our invasive predator treatments would not have had the chance to become 'advantageous' juveniles in nature. Besides, once accepted the high predator-prey specificity, some important features of tadpoles in the less studied predator-prey combinations may be misinterpreted or overlooked to some extent. This suggests that a better assessment of the real effectiveness of plasticity could be very interesting in future experiments that address the evolution of these reactions against invasive species. Although a lot of drawbacks of plasticity indeed exist, it is widespread in anuran lineages. It follows that gains must usually surpass costs, and rapid

changes observed affirms once again the adaptive nature of these traits, suggesting an important influence of phenotypic plasticity in the ecological and evolutionary outcomes of biological invasions.

Conclusions

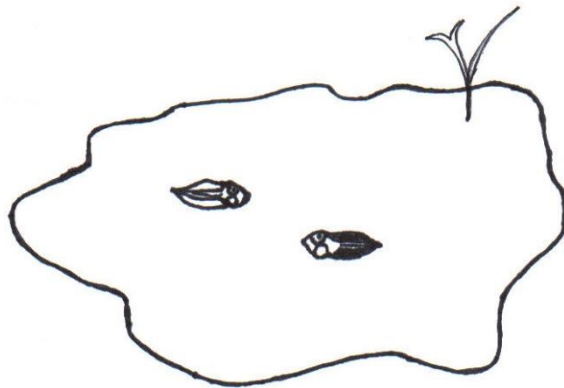
This study supports that tadpoles' plastic responses can be highly prey–predator specific and that each reaction may evolve singularly, with particular benefits and costs. Discordance among behavioral and morphologic reactions was widespread, and the observed combinations of reactions in several cases seem to match the different requirements facing each predator species according to the biology of each prey species. Responses were strongest against the native predator for both anurans, although they both responded mildly to the exotic predators. Interaction with the less known predators usually led to unusual or unexpected patterns of responses and costs. These mild and uncommon patterns of reactions and costs could be a rule when plastic responses against novel predators are still being improved or unspecific. Given the speed at which these evolutionary changes become noticeable and their potential in reducing predation risk, we believe that the role of antipredator phenotypic plasticity might be crucial in the population dynamics during biological invasions.

Acknowledgements – We would like to thank Guillem Pascual for his help in the lab work, Urtzi Enriquez for useful comments and help, and Marc Franch for helping in collecting the animals used in the experiments and useful unpublished data. Permission to capture was granted by the Dept de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya.

References

- Agrawal, A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. – *Science* 294: 321–326.
- Aguilar, J. d' and Dommange, J. L. 1998. Guide des libellules d'Europe et d'Afrique du Nord (Omega, Ed.). – Omega.
- Almeida, E. et al. 2011. Antipredator responses of two anurans towards native and exotic predators. – *Amphibia–Reptilia* 32: 341–350.
- Anholt, B. R. and Werner, E. E. 1995. Interaction between food availability and predation mortality mediated by adaptive behavior. – *Ecology* 76: 2230–2234.
- Chivers, D. P. et al. 2001. Avoidance response of juvenile Pacific treefrogs to chemical cues of introduced predatory bullfrogs. – *J. Chem. Ecol.* 27: 1667–1676.
- Cruz, M. J. and Rebelo, R. 2005. Vulnerability of southwest Iberian amphibians to an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*. – *Amphibia–Reptilia* 26: 293–303.
- Cruz, M. J. et al. 2006a. Predation by an exotic crayfish, *Procambarus Clarkii*, on natterjack toad, *Bufo calamita*, embryos: its role on the exclusion of this amphibian from its breeding ponds. – *Copeia* 2006: 274–280.
- Cruz, M. J. et al. 2006b. Effects of an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, on the distribution of southwestern Iberian amphibians in their breeding habitats. – *Ecography* 29: 329–338.
- Elvira, B. 2001. Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of the 21st century. – *J. Fish Biol.* 59: 323–331.
- Enriquez-Urzelai, U. 2011. Effects of food availability and pool desiccation in the fitness of *Discoglossus pictus* (Orth, 1837). – Thesis, Univ. de Barcelona.
- Ferrari, M. C. O. et al. 2007. Generalization of learned predator recognition: an experimental test and framework for future studies. – *Proc. R. Soc. B* 274: 1853–1859.
- Fisk, D. L. et al. 2007. Rapid evolution in response to introduced predators. I. Rates and patterns of morphological and life-history trait divergence. – *BMC Evol. Biol.* 7: 22.
- Fraker, M. E. et al. 2009. Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. – *Hormones Behav.* 55: 520–529.
- Francesca, Z. and Roberta, C. 2006. Genetic relationships of the western Mediterranean painted frogs based on allozymes and mitochondrial markers: evolutionary and taxonomic inferences (Amphibia, Anura, Discoglossidae). – *Biol. J. Linn. Soc.* 87: 515–536.
- Gherardi, F. and Acquistapace, P. 2007. Invasive crayfish in Europe: the impact of *Procambarus clarkii* on the littoral community of a Mediterranean lake. – *Freshwater Biol.* 52: 1249–1259.
- Gherardi, F. et al. 2001. Crayfish predation on tadpoles: a comparison between a native (*Austropotamobius pallipes*) and an alien species (*Procambarus clarkii*). – *Bull. Français Pêche Pisciculture* 361: 659–668.
- Gil-Sánchez, J. M. and Alba-Tercedor, J. 2002. Ecology of the native and introduced crayfishes *Austropotamobius pallipes* and *Procambarus clarkii* in southern Spain and implications for conservation of the native species. – *Biol. Conserv.* 105: 75–80.
- Gomez-Mestre, I. and Diaz-Paniagua, C. 2011. Invasive predatory crayfish do not trigger inducible defences in tadpoles. – *Proc. R. Soc. B*, in press.
- Gonçalves, V. et al. 2011. Behavioral responses of Iberian midwife toad tadpoles (*Alytes cisternasii*) to chemical stimulus of native (*Natrix maura* and *Squalius pyrenaicus*) and exotic (*Procambarus clarkii*) predators. – *Basic Appl. Herpetol.* 25: 55–64.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. – *Herpetologica* 16: 183–190.
- Griffiths, R. et al. 1998. Behavioural responses of Mallorcan midwife toad tadpoles to natural and unnatural snake predators. – *Anim. Behav.* 55: 207–214.
- Gurevitch, J. and Padilla, D. K. 2004. Are invasive species a major cause of extinctions? – *Trends Ecol. Evol.* 19: 470–474.
- Kats, L. B. and Ferrer, R. P. 2003. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. – *Divers. Distrib.* 9: 99–110.
- Kiesecker, J. M. and Blaustein, A. R. 1997. Population differences in responses of red-legged frogs (*Rana aurora*) to introduced bullfrogs. – *Ecology* 78: 1752–1760.
- Latta, L. C. et al. 2007. Rapid evolution in response to introduced predators. II. The contribution of adaptive plasticity. – *BMC Evol. Biol.* 7: 21.
- Montori, A. et al. 2007. Colonización y efectos potenciales de la especie invasora *Discoglossus pictus* sobre las especies nativas. – *Munibe* 25: 14–27.
- Peacor, S. D. 2006. Behavioral response of bullfrog tadpoles to chemical cues of predation risk are affected by cue age and water source. – *Hydrobiologia* 573: 39–44.
- Peacor, S. D. and Werner, E. E. 1997. Trait-mediated indirect interactions in a simple aquatic food web. – *Ecology* 78: 1146–1156.
- Peacor, S. D. et al. 2006. Phenotypic plasticity opposes species invasions by altering fitness surface. – *PLoS Biol.* 4: e372.
- Pearl, C. A. et al. 2003. Behavioral responses of anuran larvae to chemical cues of native and introduced predators in the Pacific Northwest United States. – *J. Herpetol.* 37: 572–576.

- Petranka, J. et al. 1987. Predator–prey interactions among fish and larval amphibians: use of chemical cues to detect predatory fish. – *Anim. Behav.* 35: 420–425.
- Phillips, B. L. and Shine, R. 2006. An invasive species induces rapid adaptive change in a native predator: cane toads and black snakes in Australia. – *Proc. R. Soc. B* 273: 1545–1550.
- Polo-Cavia, N. et al. 2010. Predator recognition of native but not invasive turtle predators by naïve anuran tadpoles. – *Anim. Behav.* 80: 461–466.
- Relyea, R. A. 2001a. The lasting effects of adaptive plasticity: predator-induced tadpoles become long-legged frogs. – *Ecology* 82: 1947–1955.
- Relyea, R. A. 2001b. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. – *Ecology* 82: 523–540.
- Relyea, R. A. 2002. Costs of phenotypic plasticity. – *Am. Nat.* 159: 272–282.
- Relyea, R. A. 2003. How prey respond to combined predators: a review and an empirical test. – *Ecology* 84: 1827–1839.
- Relyea, R. A. 2004. Fine-tuned phenotypes: tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. – *Ecology* 85: 172–179.
- Relyea, R. A. 2005. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 351–357.
- Relyea, R. A. and Mills, N. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). – *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 2491–2496.
- Relyea, R. A. and Hoverman, J. T. 2003. The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. – *Oecologia* 134: 596–604.
- Richter-Boix, A. et al. 2006. Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. – *Evol. Ecol. Res.* 8: 309–320.
- Richter-Boix, A. et al. 2007. A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. – *Hydrobiologia* 583: 43–56.
- Rose, R. D. 1986. Chemical detection of ‘self’ and conspecifics by crayfish. – *J. Chem. Ecol.* 12: 271–276.
- Schoepfner, N. M. and Relyea, R. A. 2005. Damage, digestion, and defence: the roles of alarm cues and kairomones for inducing prey defences. – *Ecol. Lett.* 8: 505–512.
- Shurin, J. B. et al. 2002. A cross-ecosystem comparison of the strength of trophic cascades. – *Ecol. Lett.* 5: 785–791.
- Smith, D. C. 1987. Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. – *Ecology* 68: 344–350.
- Smith, G. R. et al. 2007. Behavioral responses of American toad and bullfrog tadpoles to the presence of cues from the invasive fish, *Gambusia affinis*. – *Biol. Invas.* 10: 743–748.
- Strauss, S. Y. et al. 2006. Evolutionary responses of natives to introduced species: what do introductions tell us about natural communities? – *Ecol. Lett.* 9: 357–374.
- Tejedo, M. et al. 2010. Contrasting effects of environmental factors during larval stage on morphological plasticity in post-metamorphic frogs. – *Climate Res.* 43: 31–39.
- Touchon, J. C. and Warkentin, K. M. 2008. Fish and dragonfly nymph predators induce opposite shifts in color and morphology of tadpoles. – *Oikos* 117: 634–640.
- Van Buskirk, J. 2001. Specific induced responses to different predator species in anuran larvae. – *J. Evol. Biol.* 14: 482–489.
- Van Buskirk, J. and McCollum, S. A. 2000. Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles: morphology and behaviour influence mortality risk from predation. – *J. Evol. Biol.* 13: 336–347.
- Van Buskirk, J. et al. 2003. The lure effect, tadpole tail shape, and the target of dragonfly strikes. – *J. Herpetol.* 37: 420–424.
- Walton, M. 1988. Relationships among metabolic, locomotory and field measures of organismal performance in the Fowler’s toad (*Bufo woodhousei fowleri*). – *Physiol. Zool.* 61: 107–118.
- Wassersug, R. J. and Sperry, D. G. 1977. The relationships of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). – *Ecology* 58: 830–839.
- Wilson, R. S. et al. 2005. Predator-specific changes in the morphology and swimming performance of larval *Rana lessonae*. – *Funct. Ecol.* 19: 238–244.
- Zulandt Schneider, R. A. and Moore, P. A. 2000. Urine as a source of conspecific disturbance signals in the crayfish *Procambarus clarkii*. – *J. Exp. Biol.* 203: 765–771.
- Zulandt Schneider, R. A. et al. 1999. Recognition of dominance status by chemoreception in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. – *J. Chem. Ecol.* 25: 781–794.



SECCIÓN 3: Capacidad invasora de
***Discoglossus pictus* a microescala**

Resumen del capítulo 4. Análisis comparativo de la capacidad de explotación de los recursos tróficos de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Bufo calamita* en co-ocurrencia y no ocurrencia.

San Sebastián, O., Pujol-Buxó, E., Garriga, N., Richter-Boix, A & Llorente, G. A. 2015. Differential trophic traits between invasive and native anuran tadpoles. *Aquatic Invasions* 10 (4): 475–484.

Un factor clave a la hora de entender el éxito de las especies invasoras es la gestión que realiza de los recursos disponibles en el ambiente. Para las larvas de las especies de anfibios que ocupan sistemas acuáticos efímeros, la capacidad de explotación de los recursos y la selección en la calidad de la dieta son especialmente importantes ya que durante eventos de desecación del sistema, la densidad larvaria incrementa al mismo tiempo que los recursos *per capita* disminuyen pudiendo alterar las tasas de crecimiento y desarrollo de los individuos, y con ello su supervivencia. La alta cantidad y calidad de los recursos explotados por las larvas de anfibios permiten reducir el tiempo de desarrollo, así como aumenta el tamaño final del metamórfico incrementando su *fitness*. El objetivo de este trabajo fue el análisis de la gestión de los recursos de las larvas de la especie invasora *Discoglossus pictus*, en comparación con la de la especie nativa *Epidalea calamita* bajo condiciones controladas de laboratorio. Se registró la actividad trófica y la selección de dieta realizada por cada una de las dos especies ante dos tipos de calidad de dieta (una alta en proteínas y otra baja en proteínas), tanto por separado como en co-ocurrencia. *D. pictus* fue capaz de modificar su actividad y la selección de la dieta ante diferente disponibilidad de los recursos (dieta de alta calidad proteica, de baja calidad proteica y con ambos tipos), mientras *E. calamita* no presentó una respuesta diferencial a los tratamientos. Tanto en co-ocurrencia como en ocurrencia, la especie alóctona registró una mayor tasa de actividad y una selección del tipo de dieta. Además cuando ambas especies compartían sistema y recursos bajo condiciones de alta densidad larvaria, los resultados obtenidos señalaron un potencial desplazamiento de la especie nativa hacia los recursos de menor calidad proteica, sugiriendo una mayor capacidad competidora de la especie invasora por los recursos de mayor calidad. *D. pictus* presentó una gestión de los recursos que representa una ventaja en su invasión y que podría limitar el éxito reproductivo de *E. calamita* cuando los recursos son limitados o existe riesgo de desecación intensa.

Research Article

Differential trophic traits between invasive and native anuran tadpoles

Olatz San Sebastián^{1,2,3*}, Eudald Pujol-Buxó¹, Núria Garriga¹, Álex Richter-Boix⁴ and Gustavo A. Llorente¹

¹Departament de Biologia Animal (Vertebrats), IRBIO; Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 643, 08028 Barcelona, Spain

²CICGE - Centro de Investigação em Ciências Geo-Espaciais, Observatório Astronómico Prof. Manuel de Barros, Alameda do Monte da Virgem, 4430-146, Vila Nova de Gaia, Portugal

³Aranzadi Zientzia Elkarte-Sociedad de Ciencias Aranzadi, Zorroagaina, 11, 20014 Donostia-San Sebastián, Spain

⁴Department of Ecology and Genetics, Uppsala Universitet, Norbyvägen 18 D, 752 36 Uppsala, Sweden

E-mail: olatzsanse@gmail.com (OSS), epujolbuxo@ub.edu (EPB), ngarrigarovira@gmail.com (NG), richterboixalex@gmail.com (ARB), glllorente@ub.edu (GAL)

*Corresponding author

Received: 16 December 2014 / Accepted: 28 July 2015 / Published online: 28 August 2015

Handling editor: Vadim Panov

Abstract

How trophic resources are managed is a key factor in our understanding of the success of invasive species. In amphibians that usually occupy ephemeral ponds, the capacity to acquire resources and food selection are especially important because as a pond dries, the larval density increases and food resources are limited. Abundant and high-quality food can increase the final size and reduce the duration of development of amphibians. The aim of this work was to assess the trophic traits of tadpoles of the invasive (originally North African) anuran *Discoglossus pictus* compared to those of native European *Epidalea calamita* tadpoles under laboratory conditions. Food of two different levels of quality was supplied, and the feeding activity and food preference of the two species were analysed alone and in co-occurrence. *D. pictus* was capable of modifying its behaviour and food preferences; while *E. calamita* displayed much milder differences between treatments. Both alone and in co-occurrence with the native species, the invasive tadpoles obtained higher feeding activity values and showed a stronger preference for high-quality food. Additionally, when high densities of the two species shared food resources, the feeding activity results indicated potential displacement of the native tadpoles to low-quality resources. *D. pictus* thus presents trophic traits that are favourable for invasion and could limit the fitness of *E. calamita* when resources are limited or there is a risk of pond desiccation.

Key words: diet quality, feeding activity, food preference, *Discoglossus pictus*, invasiveness, anuran tadpoles

Introduction

Invasion by alien species is one of the most important threats to the balance of ecosystems and community structure, and the second most significant cause of biodiversity loss on the global scale (Levine et al. 2003). Approximately ten new species of living organisms become established in Europe each year (Hulme et al. 2009); however, only a small fraction of introductions (20%–30% worldwide) result in invasion (Pimentel et al. 2001). The success of a species in a novel environment is likely to depend on several factors, including the abiotic physical environment, biological interactions and the traits of the introduced

species (Shea and Chesson 2002; Duncan et al. 2003; Blackburn et al. 2009). The availability of resources and the capacity of an invasive species to exploit them are critical factors for its survival and reproduction (Thébaud et al. 1996; Tilman 2004).

When an alien amphibian species is introduced, its efficiency at exploiting the available resources during larval stages can be a key factor for the successful establishment of the species and may therefore define its invasiveness, because of the vulnerability during this phase and the crucial effect of food on the development of tadpoles and the subsequent development of toadlets (Werner 1986; Scott 1994; Tejedo et al. 2000). The larval period is considered the most vulnerable phase for amphibians since it is when

the highest mortality rate is registered, especially for species that occupy temporary ponds (Calef 1973; Wilbur 1980; Newman 1987; Denver 1998). On the other hand, the effects of diet on the breeding success and metamorphic fitness of amphibians have been repeatedly documented (Kupferberg 1997; Babbitt et al 2000; Álvarez and Nicieza 2002; Jefferson 2014). Both food quantity and food quality are crucial for their development: tadpoles cannot fully develop under desiccated conditions when food is scarce (Enriquez-Urzelai et al. 2013), or low in protein content (Nathan and James 1972; Steinwascher and Travis 1983; McCallum and Trauth 2002; Richter-Boix et al. 2007). Moreover, when food is abundant or highly proteic, tadpoles are capable of accelerating their growth and development (Gotthard and Nylin 1995; Morey and Reznick 2000; Lind and Johansson 2007). Therefore, optimal exploitation of available resources by tadpoles ensures fast growth and high performance, thus favouring the establishment and spread of introduced amphibian species.

Discoglossus pictus auritus (Otth, 1837) is an anuran species introduced from Algeria to Banyuls-sur-Mer (France) around 100 years ago (Wintrebert 1908). Its population is currently increasing and its range expanding annually to areas of north-eastern Spain and south-eastern France (Martens and Veith 1987; Montori et al. 2007; Franch et al. 2007). It mostly occupies ephemeral wetlands that are characterized by their low species richness and the low occurrence of potential predators. At the local level, the use of such ponds can be an advantage for the success of this species in the invaded area because in this way it avoids competition and predation risks. However, at the community level, ephemeral pond use leads to spatial limitations on larval development derived from inevitable pond drying (Babbitt et al. 2000; Newman 1987). Traits that favour short developmental periods and high growth rates improve success in colonising this type of ponds.

Often *D. pictus* shares breeding ponds with the native species *Epidalea calamita* Laurenti, 1768. Ephemeral freshwater environments are closed systems with limited resources that intensify interactions between organisms (Wilbur 1980). Competitive superiority in direct interactions or better exploitation of available resources can increase the survival or fitness of one species over that of another when the two share such environments. The greater capacity of the introduced species to take up and use nutrient resources in ephemeral ponds, is a positive biological trait for

its establishment and spread, despite the shared habitat. Both *D. pictus* and *E. calamita* exhibit explosive breeding characterized by a high number of eggs per clutch, which leads to high densities of tadpoles in ponds and this intensifies their interactions. Also, *D. pictus* and *E. calamita* present high similarities in the exploitation of their trophic niche, both in larval morphology and from the analysis of digesta (Díaz-Paniagua 1985; Escoriza and Boix 2012; Richter-Boix et al. 2012; San Sebastián et al. 2015).

The aim of this study is to evaluate the capacity of the invasive species (*D. pictus*) to exploit resources, and compare this with the native species. The capacity to exploit resources is evaluated via two measurements: the percentage of tadpoles feeding (feeding activity) and rate of selection of high-quality food (food preference). In order to obtain these measurements, we designed two experiments. The first evaluated whether the invasive species adopts a better strategy to exploit nutrient resources than the native species when they do not co-occur. The second analysed the capacity of the two species to exploit resources in aquariums shared at low and high densities. We expect greater success in the wild of the amphibian species that better exploits high quality resources and/or has a higher activity rate.

Methods

Animals and rearing conditions

Two experiments were conducted in different years (2011 and 2013) but with the same experimental laboratory conditions of temperature (19°C–20°C) and photoperiod (12D:12L). The tadpoles used in each experiment were collected as eggs on the 24th and 25th March 2011 (*D. pictus* and *E. calamita*, respectively) and on the 8th April 2013, from 3–4 clutches for each species and year, near to Girona (northeast Spain). The same procedure was followed in each experiment. Clutches of each species were transported to the laboratory in separate containers of dechlorinated water. Eight days after hatching, the tadpoles were mixed together to avoid genetic biases and were then held in plastic containers. The tadpoles were reared and fed with rabbit food until the start of the experiment. The experiments started on 5th April 2011 and 10th April 2013 (day 0) when the tadpoles reached Gosner stage 25 (Gosner 1960). All the individuals were released to their original location after the experiments finished.

Experimental design

Experimental units consisted of 30 L tanks containing dechlorinated water ($1.2 \times 0.45 \times 0.40$ m). The tadpoles were randomly allocated to the experimental treatments. The water was changed every two days to prevent eutrophication and the accumulation of lethal levels of metabolic products. We used two food types in the feeding trials that differed in composition: (LP) a commercial rabbit food, which has a low-protein and high-carbohydrate content (16% protein, 3% lipids, 17% carbohydrates, 10% ash); and (HP) the commercial fish food Sera O-nip, which is rich in protein (46% protein, 22% lipids, 2% carbohydrates, 9% ash). Food was supplied *ad libitum* during the experiments. In all the treatments and experiments, the food was available in two small Petri dishes placed randomly in the corners of the containers to avoid learning effects and ensure selection by tadpoles according to diet quality.

The first experiment on the differential selection of diet quality by *D. pictus* and *E. calamita* consisted of three treatments for each species, each replicated six times. All the containers had the same density of tadpoles (10 larvae per container). To evaluate the dietary selection of each species, there were two treatments with one food type (LP or HP) and one treatment with both food types (HLP) for each species: *D. pictus* with HP food (DHP), LP food (DLP), and HP + LP food (DHLP); and *E. calamita* with HP food (BHP), LP food (BLP), and HP + LP food (BHLP).

The second experiment involved two treatments, both containing HP and LP food, and tadpoles at either low density (LD) or high density (HD). The LD treatment consisted of a total of 10 tadpoles, at the same density as in the first experiment, but with five larvae of *D. pictus* and five larvae of *E. calamita*. The HD treatment was designed to increase potential interactions between the species in a more realistic scenario, with 20 larvae of *D. pictus* and 20 larvae of *E. calamita*.

Response variables

Throughout the experiments, we checked each tank daily and we fed the tadpoles with variable frequency to ensure *ad libitum* feeding conditions. For each tank, we checked tadpole behaviour once 5 minutes after food administration, to avoid potential disturbances after dish manipulation. The average number of registers was 16 per aquarium in the first experiment and 23 in the

second experiment (more details in Appendix 1). We stopped collecting activity data when 30% of the larvae in the aquarium underwent metamorphosis, to avoid recording behavioural changes as a consequence of reduced tadpole density.

The resource exploitation capacity of *D. pictus* and *E. calamita* were analysed via two variables: feeding activity and food preference. Feeding activity is considered to be a measure of the capacity a species has for resource exploitation, and thereby of competitive capacity (Smith et al. 2004); while food preference helped us to determine whether the tadpoles of each species followed indiscriminate or random foraging, or had a preference for one of the food types.

Feeding activity was calculated as the number of tadpoles feeding (in dishes with HP food, dishes with LP food or two types of food HLP) divided by the total number of tadpoles in each aquarium and then expressed as a percentage, as observed at first glance (Peacor and Werner 1997; Relyea 2002; Pujol-Buxó et al. 2013). Food preference was estimated as the proportion of tadpoles consuming each kind of food divided by the total number of tadpoles in feeding attitude in treatments with both types of food: HP and LP. While feeding activity was calculated including zero activity records, to estimate food selection, we only used counts with tadpole activity higher than zero.

Statistical analysis

Firstly, we compared feeding activity between the species and treatments, and tested their interaction. Then feeding activity in each treatment and food type was explored between species and within the same species. Secondly, the food preference was analysed for each species only in treatments with two types of food (HLP in the first experiment, and LD and HD in the second experiment). Given the presence of a certain amount of zero values and that most assumptions needed to perform classic parametric or non-parametric analyses of variance were not met (McElduff et al. 2010), differences in feeding activity between treatments, species and food types were explored via non-parametric randomization ANOVA (NP-R-ANOVA). We used percentages as the dependent variable and tested the differences applying the function *aovp* from the package *lmPerm* (Wheeler 2010). Potential random variations between aquariums were considered including aquarium as an error in the model. The function *aovp()* assumes a model of the form: $Y = Xb + Zg + e$, where X is the incidence matrix for fixed effects,

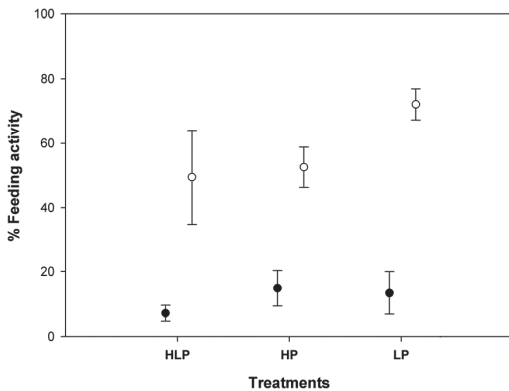


Figure 1. Mean (\pm SE) feeding activity of *D. pictus* (white circle) and *E. calamita* (black circle) in each treatment.

and Z is the incidence matrix for random effects, with columns representing the different error strata. The algorithm projects Y into strata creating a single error term in each case while X is also projected so that the model in this stratum becomes $P(Y)=P(X)bi+ei$. This way the model accounts for the lack of independence of the data within each experimental unit.

Our p and F values were calculated after 1,000 permutations, and the level of significance was set at values of p lower than 0.05.

For the food preference analysis, we excluded records with no activity and used only the percentage of feeding larvae in the HP treatment (real distribution). In this case, we generated a new distribution (simulated distribution) that represented our null hypothesis of non-preference for both types of food. This simulated data was generated using a binomial distribution with a "success" probability of 0.5 (that is, an average of 50% tadpoles in each side as null hypothesis: given no preference, half of the active larvae should be eating HP food and the other half LP food) with the standard deviation of the real distribution for each species. This probability was applied on a simulated number of active tadpoles (=events) which followed a Poisson distribution with the same parameters of the real distribution. We simulated the same number of null hypothesis data as the number of real data, and then differences between these two distributions were tested using the same procedures as applied to feeding activity. All the analysis were conducted in R (Development R Core Team 2013).

Results

Experiment 1: Differential food selection by D. pictus and E. calamita

Feeding activity: species, treatments and diet quality

We found differences in feeding activity between the species ($F_{1,29}=337.92$ $p<0.001$), treatments ($F_{2,29}=7.95$ $p=0.001$) and an interaction between the two ($F_{2,29}=6.87$ $p<0.005$). *D. pictus* showed higher feeding activity than *E. calamita* in treatments with one ($F_{DHP-BHP\ 1,176}=124.46$ $p<0.001$; $F_{DLP-BLP\ 1,203}=319.03$ $p<0.001$) and two types of food ($F_{DHLP-BHLP\ 1,151}=41.76$ $p<0.001$). The feeding activity of *D. pictus* ranged from 25% to 72%, while that of *E. calamita* did not exceed 20% in any treatment.

Within species, feeding activity levels varied between treatments. *D. pictus* showed significantly more activity in tanks with LP food (DLP) than in DHP ($F_{1,166}=38.31$ $p<0.001$) or DHLP treatments ($F_{1,161}=14.43$ $p<0.005$), with no significant difference between DHP and DHLP ($F_{1,151}=0.33$ $p=0.5$) (Figure 1). When we compared the feeding activity on each type of food between treatments, we obtained similar results. There were no significant differences in the feeding activity on HP food between the DHP and DHLP treatments ($F_{1,151}=5.18$ $p<0.05$). However, the feeding activity of tadpoles on the LP food was lower in the DHLP treatment than in the DLP treatment ($F_{1,161}=697.50$ $p<0.001$). Although *D. pictus* showed higher activity in the DLP treatment (72% \pm 4.8%), when it had two types of diet available (DHLP) it showed 41% \pm 12% feeding activity on HP food and 9% \pm 3% on LP ($F_{1,166}=38.30$ $p<0.001$).

The feeding activity of *E. calamita* was low in all treatments (Figure 1). Levels of activity were similar in the BHP and BLP treatments ($F_{1,213}=0.14$ $p=0.7$), and in the BHLP and BLP treatments ($F_{1,193}=5.80$ $p=0.05$). However, we observed higher feeding activity in the BHP treatment than in the BHLP treatment ($F_{1,176}=9.68$ $p=0.01$) (Figure 1). When we compared feeding activity on each type of diet, we detected differences between feeding activity on HP food between the BHLP and BHP treatments ($F_{1,176}=19.17$ $p=0.001$), and on LP food between the BHLP and BLP treatments ($F_{1,193}=14.64$ $p<0.005$). The percentage of *E. calamita* tadpoles eating HP food in the BHLP treatment was lower than in BHP, being 5% \pm 1% and 15% \pm 5% respectively. Also, the BHLP treatment registered lower values of feeding activity on LP food than the BLP treatment. The

BHLP treatment showed $3\% \pm 2\%$ of tadpoles eating LP food while BLP registered $13\% \pm 6\%$. In the BHLP treatment, the native species showed similar feeding activity on the different diets ($F_{1,213} = 0.14$ $p = 0.7$).

Food preference

D. pictus showed preferential selection in treatments with two types of food ($F_{1,133} = 47.37$ $p < 0.001$). On average, 81% of tadpoles were observed feeding on HP food, and only 19% on LP food. However, *E. calamita* displayed no food preference in this treatment ($F_{1,58} = 1.31$ $p = 0.5$), with 60% feeding on HP food and 40% on LP (Figure 2).

Experiment 2: Competitive or opportunistic strategy by D. pictus co-occurring with E. calamita (LD and HD)

Feeding activity: species, treatments and diet quality

When the species co-occurred in the same environment, *D. pictus* showed higher feeding activity in both the LD and HD treatments ($F_{LD\ 1,255} = 32.04$ $p < 0.001$; $F_{HD\ 1,303} = 97.13$ $p < 0.001$) (Figure 3). Moreover, in both treatments, the feeding activity of *D. pictus* was higher on the HP food ($F_{LD\ 1,255} = 33.60$ $p < 0.001$; $F_{HD\ 1,303} = 206.2$ $p < 0.001$). Although feeding activity on the LP food was similar for the two species at LD, ($F_{1,255} = 0.75$ $p = 0.4$), higher *E. calamita* feeding activity was recorded on this food at HD ($F_{1,303} = 5.36$, $p = 0.02$) (Figure 3).

Density had a significant effect on the feeding activity of the two species (*D. pictus*: $F_{1,274} = 12.16$, $p = 0.005$; *E. calamita*: $F_{1,274} = 27.76$, $p < 0.001$), which was higher under HD conditions than LD (Figure 3). Analysis of the type of food and species revealed that increased density provoked an activity gain of 8% on HP food ($F_{1,274} = 8.04$ $p = 0.01$) and 3% on LP food ($F_{1,274} = 20.03$ $p = 0.001$) for *D. pictus*; and a gain of only 1% on HP food and 6% on LP food for *E. calamita*. The proportion of *E. calamita* larvae feeding on the HP food did not vary between density treatments ($F_{1,274} = 0.41$ $p = 0.5$); whereas for the LP food there was an increase in feeding activity in HD conditions ($F_{1,274} = 72.819$ $p < 0.001$).

Differences in feeding activity between types of diet were evident for *D. pictus* ($F_{LD\ 1,255} = 67.76$ $p < 0.001$, $F_{HD\ 1,303} = 253.34$ $p < 0.001$). At all densities the invasive species showed higher feeding activity on HP food than on LP (LD: 18% vs. 2%; HD: 26% vs. 5%). However, the native *E. calamita* only showed higher feeding activity on HP food compared to LP food under LD conditions ($F_{1,255} = 17.14$ $p < 0.001$; 6% vs. 1%). In the HD

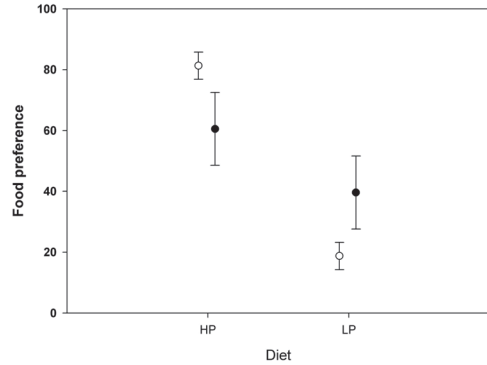


Figure 2. Mean (\pm SE) food preference for both species in treatments with two types of food. *D. pictus* (white circle) and *E. calamita* (black circle).

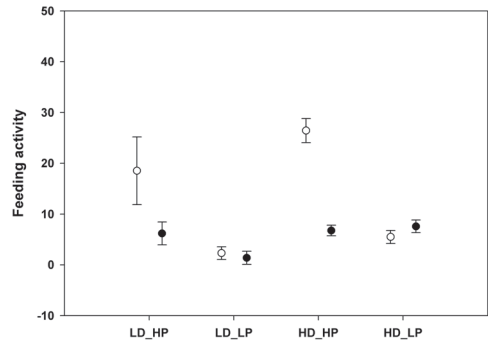


Figure 3. Mean (\pm SE) feeding activity of *D. pictus* (white circle) and *E. calamita* (black circle) at each density (LD or HD) and quality of diet (LP or HP).

conditions, the feeding activity of *E. calamita* on the two diets was similar ($F_{1,303} = 0.65$ $p = 0.42$; 8% LP food vs. 7% HP food).

Food preference

In this experiment we detected a preference for type of food by *D. pictus*. More active *D. pictus* chose HP food than LP food in the LD ($F_{1,135} = 42.95$ $p < 0.001$) and HD treatment ($F_{1,277} = 224.62$ $p > 0.001$). A total of 88% and 85% of active larvae of *D. pictus* selected HP food over LP, in the LD and HD treatments respectively. Despite the level of activity recorded for *E. calamita*, it showed no dietary selection in terms of quality of diet. The preference for HP or LP food was similar under LD ($F_{1,67} = 1.75$ $p = 0.3$) and HD ($F_{1,243} = 0.65$ $p = 0.7$) conditions. Sixty-one per

cent of active *E. calamita* larvae were observed feeding on HP food under LD and 51% under HD conditions.

Discussion

The present study suggests that trophic traits could favour the success of *D. pictus* in the invaded area. *D. pictus* presented higher feeding activity and selection of high-quality food resources, contrasting with the lower feeding activity and apparent non-food selection of the native species either when co-occurring or when alone. As found in other species (Kupferberg 1997; Niecieza and Álvarez 2002) the capacity of amphibian species to exploit resources could predict fast development, high reproductive success and the increased fitness of its metamorphs; especially advantageous for invasive species and with potential negative effects for less competitive species.

Resource exploitation capacity of the invasive and the native species

It is widely documented, in both the field and the laboratory, that food quality is of primary importance in mediating interspecific differences in amphibian reproductive success and performance (for a review see Kupferberg 1997). These effects have been confirmed in *E. calamita* and in *Discoglossus galganoi* (Capula, Nascetti, Lanza, Bullini and Crespo 1985) (in Griffiths et al. 1993; Niecieza and Álvarez 2002; Martins et al. 2013), among other species (Schiesari 2006; Pandian and Marian 1985; Richter-Boix et al. 2007). Those studies show that high-protein food increases the final size and reduces the time required for development in amphibians. These features are directly associated with post-metamorphosis survival rates, a reduction of mortality risk in drying ponds, juvenile performance, enhanced fecundity and presumably juvenile dispersion capacity (Howard 1980; Smith 1987; Babbitt et al. 2000; Tejedo et al. 2000; Martins et al. 2013). Accordingly, high-quality food selection could favour and ensure short-term reproductive success and indirectly enhance the invasive capacity of introduced amphibian species. The results of the present study indicate differential selection of food quality by the invasive species (*D. pictus*) while the native species (*E. calamita*) seems to follow a random feeding pattern, with no clear dietary selection when in isolation.

Although some species seem to show indiscriminate feeding behaviour (Jenssen 1967; Diaz-Paniagua 1985; Diaz-Paniagua 1989; Hoff et al. 1999), tadpole diets can vary under different

environmental conditions (Kupferberg 1996; Taylor et al. 1995; Babbitt et al. 2000; de Sousa et al. 2014). *Pelodytes punctatus*, for example, shows no preference in the absence of stress factors but becomes selective under stress factors such as competition, predation, and pond desiccation risk (Richter-Boix et al. 2007). This species is another native anuran of invaded areas with high co-occurrence with *D. pictus* and *E. calamita* in ephemeral ponds (Montori et al. 2007; Escoriza and Boix 2012; Richter-Boix et al. 2012). While the native species (*E. calamita* and *P. punctatus*) apparently show no dietary quality selection in conditions without unfavourable factors, either in laboratory experiments or in nature (Diaz-Paniagua 1985; Diaz-Paniagua 1989), invasive *D. pictus* always shows a preference for high-quality food. This preference could be due to the intrinsic behaviour of the species or to particular stimuli or stress linked to its introduction and process of expansion. It is possible that invasive populations have already undergone an adaptive selection favouring some traits (Phillips et al. 2006). In fact, it has been documented that some invasive species present traits linked to their expansion, with higher competitive capacity (Blossey and Notzold 1995; Müller-Schärer et al. 2004), higher growth rates (Davis 2005; Mason et al. 2008) and changes in food preference or diet that ensure rapid development and improve reproductive success (Lach et al. 2000; Bøhn et al. 2004).

Additionally, *D. pictus* seems to be capable of modifying its behaviour to achieve more favourable outcomes. It selected HP food when two types of food were available; but when only low-quality (LP) food was available, the species increased its feeding activity with respect to the DHP and DHLP treatments. As the quantity of food has similar effects on larval development as the quality of the food (Morey and Reznick 2000; Lind et al. 2008; Enriquez-Urzelai et al. 2013), the observed increase in activity in the low-quality treatment suggests active compensation by the species for the low quality of the food available via a higher intake. Therefore, it seems that even in an environment free of threats and under *ad libitum* feeding conditions, the invasive tadpoles maximize resources by consuming either higher-quality food or more. Additional comparative studies between the native and invaded ranges could establish whether the invasive species has these specific trophic traits (favouring its success in recipient systems) in their home ranges also, or whether this behaviour is a consequence of its introduction (Moloney et al. 2009).

Resource exploitation capacity of the invasive and the native species under co-occurrence

D. pictus presented similar trophic traits when it was in co-occurrence with the native species and when it was alone. As found in other invasive species (Petren and Case 1996; Holway 1999; Byers 2000), *D. pictus* showed a greater capacity to exploit available resources than did the native residents. *D. pictus* registered higher feeding activity than *E. calamita* and a preference for high-protein food under both LD and HD conditions. Moreover, the increase in the activity of the two species under HD conditions and some changes in feeding activity of the native species suggested an increase in interactions and indeed competitive processes between the two species.

Feeding activity is a trait associated with competitive capacity and capacity for resource exploitation. The introduction of more competitive species often has negative consequences on native species with less competitive capacity. More active individuals are often more competitive and can expropriate resources from less active individuals (Woodward 1982; Werner 1992; Laurila 2000; Dayton and Fitzgerald 2001). *D. pictus* showed higher feeding activity than *E. calamita* in all the treatments. Our results are also consistent with those of Richter-Boix et al. (2012), who reported a higher competitive capacity of *D. pictus* when it co-occurred with *E. calamita*. That study showed that the survival, body mass, and activity of the native species decreased and the time to metamorphosis suffered an increase, in the presence of the invasive species. In summary, it seems that *D. pictus* not only shows good resource exploitation, but it could also have negative consequences on *E. calamita* when the two co-occur.

The results obtained for food preference seem to corroborate the hypothesis that *D. pictus* has a higher competitive capacity. When the invasive and native species co-occurred (under both LD and HD conditions), the invasive species showed a clear preference and selection for high-protein food, whereas the native species showed no preference. In all habitat types, including those with no other kind of threat, competitive interaction is one of the factors that leads to differential dietary selection in amphibians (Griffiths et al. 1993). Although the native species showed no food preference, its feeding activity experienced some changes. When the two species co-occurred at LD, the feeding activity of *E. calamita* was slightly higher on high-protein food than on

low-protein food, which could indicate a mild response to a stress factor such as the presence of another species. At HD, the native species significantly increased its total feeding activity only on low-protein food; while its level of feeding activity on high-protein food was maintained. In view of the preference for HP food shown by *D. pictus*, the increase in feeding activity on LP food by *E. calamita* could suggest a reclusion of the native species to the lower-quality food. *E. calamita* could be exploiting those resources, since they are less used by the alien species. Recently, these laboratory results have been corroborated in nature (San Sebastián et al. 2015). Patterns of displacement and trophic niche partitioning have also been detected in ephemeral ponds occupied by *D. pictus* and *E. calamita*. Despite the similarity in diet of the two species (Díaz-Paniagua 1985; Escoriza and Boix 2012), the hierarchy of the communities seems to be repeated in both experimental and field experiments.

As with other invasive species (Fausch and White 1981; Holway 1999), *D. pictus* seems to present a higher competitive capacity than the native species with which it frequently shares its habitat, thereby favouring invasion in the recipient area.

Conclusion

Our conclusions are consistent with other studies conducted on this invasive species: *D. pictus* presents favourable traits that provide it with a high invasive capacity (see Enriquez-Urzelai et al. 2013; Pujol-Buxó et al. 2013; San Sebastián et al. 2015). In this work, this invasive species was found to show a preference for high-quality food and to modify its levels of activity according to the quality of diet available, which could ensure rapid larval development and good performance of metamorphs. It also displayed good resource exploitation capacity when sharing nutrients with its most common competitor in nature, *E. calamita*, suggesting high success rates in ephemeral ponds. This invasive species even seems to exhibit a higher competitive capacity than the native one, which could trigger a reduction in the metamorphic fitness and even in the recruitment success of the native species due to the presence of *D. pictus* under stress factors such as pond desiccation. Studies that explain the coexistence of the two species from different points of view such as scale (population and individual behaviour) or skills (physiological capacity, types of food) should be conducted.

Acknowledgements

We would like to thank M. Franch for his field and logistical support as well as A. Nicieza and U. Enriquez-Urzelai for their useful comments. Special thanks to anonymous reviewers that greatly improved the last version of the manuscript. Permission and special scientific authorisation for field handling of clutches was issued by the *Departament de Medi Ambient i Habitatge* of the *Generalitat de Catalunya* that granted the permission to collect clutches.

References

- Babbitt KJ, Meshaka WE, Ross ST (2000) Benefits of eating conspecifics: effects of background diet on survival and metamorphosis in the cuban treefrog (*Osteopilus septentrionalis*). *Copeia* 2: 469–474, [http://dx.doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)000\[0469:BOECEQ\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1643/0045-8511(2000)000[0469:BOECEQ]2.0.CO;2)
- Blackburn TM, Lockwood JL, Cassey P (2009) Avian invasions: the ecology and evolution of exotic birds. Oxford University Press, Oxford
- Blossey B, Notzold R (1995) Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *The Journal of Ecology* 83: 887–889, <http://dx.doi.org/10.2307/2261425>
- Bøhn T, Sandlund OT, Amundsen P, Primicerio R (2004) Rapidly changing life history during invasion. *Oikos* 106: 138–150, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13022.x>
- Byers J (2000) Competition between two estuarine snails: implications for invasions of exotic species. *Ecology* 81: 1225–1239, [http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[1225:CBTESI\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[1225:CBTESI]2.0.CO;2)
- Calef GW (1973) Natural mortality of tadpoles in a population of *Rana aurora*. *Ecology* 54: 741–758, <http://dx.doi.org/10.2307/1935670>
- Davis HG (2005) r-Selected traits in an invasive population. *Evolutionary Ecology* 19: 255–274, <http://dx.doi.org/10.1007/s10682-005-0912-5>
- Dayton GH, Fitzgerald LA (2001) Competition, predation, and the distributions of four desert anurans. *Oecologia* 129: 430–435, <http://dx.doi.org/10.1007/s004420100727>
- De Sousa VTT, Nomura F, Venesky MD, Rossa-Feres DC, Pezzuti TL, Andrade GV, Wassersug RJ (2014) Flexible feeding kinematics of a tropical carnivorous anuran tadpole. *Journal of Zoology* 293: 204–210, <http://dx.doi.org/10.1111/jzo.12135>
- Denver RJ, Mirhadi N, Phillips M (1998) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology* 79: 1859–1872, <http://dx.doi.org/10.2307/176694>
- Diaz-Paniagua C (1985) Larval diets related to morphological characters of five anuran species in the biological reserve of Doñana (Huelva, Spain). *Amphibia-Reptilia* 6: 307–322, <http://dx.doi.org/10.1163/156853885X00317>
- Diaz-Paniagua C (1989) Larval diets of two anuran species, *Pelodytes punctatus* and *Bufo bufo*, in SW Spain. *Amphibia-Reptilia* 10: 71–75, <http://dx.doi.org/10.1163/156853889X00304>
- Duncan RP, Blackburn TM, Sol D (2003) The ecology of avian introductions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 71–98, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132353>
- Enriquez-Urzelai U, San Sebastián O, Garriga N, Llorente GA (2013) Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia* 173: 117–127, <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-013-2596-9>
- Escoriza D, Boix D (2012) Assessing the potential impact of an invasive species on a Mediterranean amphibian assemblage: a morphological and ecological approach. *Hydrobiologia* 680: 233–245, <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-011-0936-5>
- Fausch KD, White RJ (1981) Competition between brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and brown trout (*Salmo trutta*) for positions in a Michigan stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 1220–1227, <http://dx.doi.org/10.1139/f81-164>
- Franch M, G. Llorente A, Montori A, Richter-Boix A, Carranza S (2007) *Discoglossus pictus* beyond its known distributional range. *Herpetological Review* 38: 356–358
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183–190
- Griffiths ARA, Denton J, Wong AL (1993) The effect of food level on competition in tadpoles: interference mediated by protothecan algae? *Journal of Animal Ecology* 62: 274–279, <http://dx.doi.org/10.2307/53358>
- Hoff K, Blaustein AR, McDiarmid RW, Altig R (1999) Behavior: Interactions and their consequences. In: McDiarmid RW, Altig R (eds) Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae. Chicago: The University of Chicago press, pp 215–239
- Holway DA (1999) Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive Argentine ant. *Ecology* 80: 238–251, [http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[0238:CMUTDO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[0238:CMUTDO]2.0.CO;2)
- Hulme PE, Pysvek P, Nentwig W, Vilà M (2009) Will threat of biological invasions unite the European Union? *Science* 324: 40–41, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1171111>
- Howard RD (1980) Mating behaviour and mating success in woodfrogs, *Rana sylvatica*. *Animal Behaviour* 28: 705–716, [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472\(80\)80130-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472(80)80130-8)
- Jefferson DM, Hobson KA, Demuth BS, Ferrari MCO, Chivers DP (2014) Frugal cannibals: how consuming conspecific tissues can provide conditional benefits to wood frog tadpoles (*Lithobates sylvaticus*). *Naturwissenschaften* 101: 291–303, <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-014-1156-4>
- Jenssen TA (1967) Food habits of the green frog, *Rana clamitans*, before and during metamorphosis. *Copeia* 1967: 214–218, <http://dx.doi.org/10.2307/1442196>
- Kupferberg S (1997) The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoologist* 159: 146–159, <http://dx.doi.org/10.1093/icb/37.2.146>
- Kupferberg SJ (1996) The ecology of native tadpoles (*Rana boylei* and *Hyla regilla*) and the impacts of invading bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in a northern California river. University of California, Berkeley
- Lach L, Britton DK, Rundell RJ, Cowie RH (2000) Food preference and reproductive plasticity in an invasive freshwater snail. *Biological Invasions* 2: 279–288, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011461029986>
- Laurila A (2000) Competitive ability and the coexistence of anuran larvae in freshwater rock-pools. *Freshwater Biology* 43: 161–174, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00533.x>
- Levine JM, Vilà M, D'Antonio CM, Dukes JS, Grigulis K, Lavelle S (2003) Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *Proceedings of the Royal Society, Series B* 270: 775–81, <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2003.2327>
- Lind MI, Johansson F (2007) The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 20: 1288–1297, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01353.x>
- Lind MI, Persbo F, Johansson F (2008) Pool desiccation and developmental thresholds in the common frog, *Rana temporaria*. *Proceedings of the Royal Society Series B* 275: 1073–80, <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.1737>
- Mason RAB, Cooke J, Moles AT, Leishman MR (2008) Reproductive output of invasive versus native plants. *Global Ecology and Biogeography* 17: 633–640, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1466-8238.2008.00402.x>

- Martens H, Veith M (1987) Considerations on origin and chorology of *Discoglossus pictus* Otth, 1837 in the eastern Pyrenees. In: Van Gelder JJ, Strijbosch H, Bergers PJM (eds), Proceedings of the 4th Ordinary General Meeting Societas Europaea Herpetologica in Nijmegen 1987, Faculty of Science, Nijmegen, pp 267–269
- Martins FMS, Oom MDM, Rebelo R, Rosa GM (2013) Differential effects of dietary protein on early life-history and morphological traits in natterjack toad (*Epidalea calamita*) tadpoles reared in captivity. *Zoo Biology* 32: 457–462, <http://dx.doi.org/10.1002/zoo.21067>
- McCallum ML, Trauth SE (2002) Performance of Wood frog tadpoles (*Rana sylvatica*) on three soybean meal–corn meal rations. *Podarcis* 3: 78–85
- McElduff F, Cortina-Borja M, Chan SK, Wade A (2010) When t-tests or Wilcoxon-Mann-Whitney tests won't do. *Advances in Physiology Education* 34: 128–133, <http://dx.doi.org/10.1152/advan.00017.2010>
- Moloney KA, Holzapfel C, Tielbörger K, Jeltsch F, Schurr FM (2009) Rethinking the common garden in invasion research. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11: 311–320, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ppees.2009.05.002>
- Montori A, Llorente GA, Richter-Boix Á, Villero D, Franch M, Garriga N (2007) Colonización y efectos potenciales de la especie invasora *Discoglossus pictus* sobre las especies nativas. *Munibe* 25: 14–27
- Morey S, Reznick D (2000) A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology* 81: 1736–1749, [http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)0081\[1736:ACAOPJ\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658(2000)0081[1736:ACAOPJ]2.0.CO;2)
- Müller-Schärer H, Schaffner U, Steinger T (2004) Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 417–422, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2004.05.010>
- Nathan AJM, James VG (1972) The role of protozoa in the nutrition of tadpoles. *Copeia* 1972: 669–679, <http://dx.doi.org/10.2307/1442727>
- Newman RA (1987) Effects of density and predation on *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Oecologia* 71: 301–307, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00377299>
- Nicieza A, Álvarez D (2002) Effects of induced variation in anuran larval development on postmetamorphic energy reserves and locomotion. *Oecologia* 131: 186–195, <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-002-0876-x>
- Pandian TJ, Marian MP (1985) Predicting anuran metamorphosis and energetics. *Physiological Zoology* 58: 538–552
- Peacor SD, Werner EE (1997) Trait-mediated indirect interactions in a simple aquatic food web. *Ecology* 78: 1146–1156, [http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658\(1997\)078\[1146:TMIIIA\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[1146:TMIIIA]2.0.CO;2)
- Petren K, Case TJ (1996) An experimental demonstration of exploitation competition in an ongoing invasion. *Ecology* 77: 118–132, <http://dx.doi.org/10.2307/2265661>
- Phillips BL, Brown GP, Webb JK, Shine R (2006) Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature* 439: 803, <http://dx.doi.org/10.1038/439803a>
- Pimentel D, McNair S, Janecka J, Wightman J, Simmonds C, O'Connell C, Wong E, Russel L, Zern J, Aquino T, Tsomondo T (2001) Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 84: 1–20, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00178-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00178-X)
- Pujol-Buxó E, San Sebastián O, Garriga N, Llorente GA (2013) How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators? *Oikos* 122: 19–29, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0706.2012.20617.x>
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- Relyea RA (2002) Costs of phenotypic plasticity. *The American Naturalist* 159: 272–282, <http://dx.doi.org/10.1086/338540>
- Richter-Boix A, Garriga N, Montori A, Franch M, San Sebastián O, Villero D, Llorente GA (2012) Effects of the non-native amphibian species *Discoglossus pictus* on the recipient amphibian community: niche overlap, competition and community organization. *Biological Invasions* 15: 799–815, <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-012-0328-4>
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A, Garcia J (2007) Tadpole diet selection varies with the ecological context in predictable ways. *Basic and Applied Ecology* 8: 464–474, <http://dx.doi.org/10.1016/j.baec.2006.09.009>
- San Sebastián O, Navarro J, Llorente GA, Richter-Boix A (2015) Trophic strategies of a non-native and a native amphibian species in shared ponds. *PLoS ONE* 10(6): e0130549, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130549>
- Schiesari L (2006) Pond canopy cover: a resource gradient for anuran larvae. *Freshwater Biology* 51: 412–423, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01497.x>
- Scott DE (1994) The effect of larval density on adult demographic traits in *Ambystoma opacum*. *Ecology* 75: 1383–1396, <http://dx.doi.org/10.2307/1937462>
- Shea K, Chesson P (2002) Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 170–176, [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02495-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02495-3)
- Smith DC (1987) Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68: 344–350, <http://dx.doi.org/10.2307/1939265>
- Smith GR, Dingfelder HA, Vaala DA (2004) Asymmetric competition between *Rana clamitans* and *Hyla versicolor* tadpoles. *Oikos* 105: 626–632, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12841.x>
- Steinwascher K, Travis J (1983) Influence of food quality and quantity on early growth of two anurans. *Copeia* 1983: 238–242, <http://dx.doi.org/10.2307/1444720>
- Taylor CL, Altig R, Boyle CR (1995) Can anuran tadpoles choose among foods that vary in quality? *Alytes* 13: 81–86
- Tejedo M, Semlitsch RD, Hotz H (2000) Covariation of morphology and jumping performance in newly metamorphosed water frogs: effects of larval growth history. *Copeia* 2: 448–458, [http://dx.doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)000\[0448:COMAJP\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1643/0045-8511(2000)000[0448:COMAJP]2.0.CO;2)
- Thébaud CA, Finzi C, Affre L, Debussche M, Escarre J. 1996. Assessing why two introduced *Conyza* differ in their ability to invade Mediterranean old fields. *Ecology* 77: 791–804, <http://dx.doi.org/10.2307/2265502>
- Tilman D (2004) A stochastic theory of resource competition, community assembly and invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 10854–10861, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0403458101>
- Werner EE (1992) Competitive interactions between wood frog and northern leopard frog larvae: the influence of size and activity. *Copeia* 1992: 26–35, <http://dx.doi.org/10.2307/1446532>
- Wheeler RE (2010) lmp: Permutation Tests for Linear Models. R package version 1.1-2. 1–36
- Wilbur HM (1980) Complex life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 67–93, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000435>
- Wintrebert P (1908) Présence à Banyuls-sur-Mer (Pyrénées Orientales) du *Discoglossus pictus* Otth. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 33: 54
- Woodward BD (1982) Tadpole competition in a desert anuran community. *Oecologia* 54: 96–100, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00541115>

Appendix 1. Number of registers for each aquarium and treatment.

Experiment	Treatment	Species	Registers	Average*	Minimum	Maximum
I	CHLP	<i>E. calamita</i>	83	17	15	19
	CHP	<i>E. calamita</i>	104	17	15	21
	CLP	<i>E. calamita</i>	121	20	14	23
	CHLP	<i>D. pictus</i>	79	13	8	15
	CHP	<i>D. pictus</i>	84	14	14	14
	CLP	<i>D. pictus</i>	94	16	15	17
II	LD	<i>E. calamita</i> - <i>D. pictus</i>	131	22	20	24
	HD	<i>E. calamita</i> - <i>D. pictus</i>	155	26	25	26

*Average per aquarium

Resumen del capítulo 5. Estudio de la estructuración de *Discoglossus pictus* y la especie nativa *Bufo calamita* en el nicho trófico de ambientes efímeros y análisis de la potencial interacción entre ambas especies en condiciones naturales.

San Sebastián, O., Navarro, J., Llorente, G.A. & Richter-Boix, A. 2015. Trophic strategies of a non-native and a native amphibian species in shared ponds. *PLoS ONE* 10 (6): e0130549.

El establecimiento, invasión de las especies introducidas y su potencial efecto sobre las comunidades nativas depende en gran parte de la gestión de recursos que realiza dentro del nicho trófico disponible. Existen dos tipos de estrategias a la hora de adquirir los recursos: estrategia de competición o estrategia oportunista. El objetivo de este trabajo fue identificar la estrategia seguida por las larvas del anuro alóctono *Discoglossus pictus* y su potencial impacto sobre la especie nativa, *Bufo calamita*. Se analizó si *D. pictus* explota recursos similares a la especie nativa (hipótesis de competición) o alternativos (hipótesis oportunista). Para ello se desarrolló un estudio aplicando el análisis de isótopos estables de nitrógeno y carbono en comunidades larvianas naturales de ambas especies en co-ocurrencia y no ocurrencia. La similitud en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ entre ambas especies cuando no comparten ambientes acuáticos, en contraste con la jerarquización trófica observada en co-ocurrencia y la partición de nicho, indicaron interacción competitiva entre ambas. La explotación de recursos con mayores valores de $\delta^{15}\text{N}$ por parte de la especie alóctona frente a los de la nativa y el incremento del SEA de *B. calamita* en co-ocurrencia con *D. pictus* parece indicar una mayor capacidad competitiva por parte de la especie alóctona y un desplazamiento de la nativa a recursos de menor calidad en condiciones naturales. Por otro lado, *D. pictus* mostró una amplitud de nicho mayor en todas las condiciones analizadas, lo cual se relaciona con la capacidad invasora de las especies dada su habilidad de explotación de diferentes tipos de recursos. A pesar de las importantes limitaciones del presente trabajo (derivadas principalmente de la potencial variación de la señal isotópica de cada sistema acuático), estos resultados coinciden con anteriores trabajos realizados experimentalmente en el laboratorio. Todos ellos indicaron interacción competitiva entre *D. pictus* y *B. calamita* por los recursos con potenciales efectos negativos sobre la especie nativa.

RESEARCH ARTICLE

Trophic Strategies of a Non-Native and a Native Amphibian Species in Shared Ponds

Olatz San Sebastián^{1,2,3*}, Joan Navarro⁴, Gustavo A. Llorente¹, Álex Richter-Boix⁵

1 Departament de Biologia Animal (Vertebrats), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 643, 08028, Barcelona, Spain, **2** CICGE-Centro de Investigação em Ciências Geo-Espaciais, Observatório Astronómico Prof. Manuel de Barros, Alameda do Monte da Virgem, 4430–146, Vila Nova de Gaia, Portugal, **3** Departamento de Herpetología, Aranzadi Zientzia Elkarte-Sociedad de Ciencias Aranzadi, Zorroagagaina, 11, 20014, Donostia-San Sebastián, Spain, **4** Department of Conservation Biology, Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Avda. Américo Vespucio s/n, Sevilla, 41092, Spain, **5** Department of Ecology and Genetics, Uppsala Universitet, Norbyvägen 18 D, 752 36, Uppsala, Sweden

* olatzsanse@gmail.com



CrossMark
click for updates

Abstract

One of the critical factors for understanding the establishment, success and potential impact on native species of an introduced species is a thorough knowledge of how these species manage trophic resources. Two main trophic strategies for resource acquisition have been described: competition and opportunism. In the present study our objective was to identify the main trophic strategies of the non-native amphibian *Discoglossus pictus* and its potential trophic impact on the native amphibian *Bufo calamita*. We determine whether *D. pictus* exploits similar trophic resources to those exploited by the native *B. calamita* (competition hypothesis) or alternative resources (opportunistic hypothesis). To this end, we analyzed the stable isotope values of nitrogen and carbon in larvae of both species, in natural ponds and in controlled laboratory conditions. The similarity of the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values in the two species coupled with isotopic signal variation according to pond conditions and niche partitioning when they co-occurred indicated dietary competition. Additionally, the non-native species was located at higher levels of trophic niches than the native species and *B. calamita* suffered an increase in its standard ellipse area when it shared ponds with *D. pictus*. These results suggest niche displacement of *B. calamita* to non-preferred resources and greater competitive capacity of *D. pictus* in field conditions. Moreover, *D. pictus* showed a broader niche than the native species in all conditions, indicating increased capacity to exploit the diversity of resources; this may indirectly favor its invasiveness. Despite the limitations of this study (derived from potential variability in pond isotopic signals), the results support previous experimental studies. All the studies indicate that *D. pictus* competes with *B. calamita* for trophic resources with potential negative effects on the fitness of the latter.

OPEN ACCESS

Citation: San Sebastián O, Navarro J, Llorente GA, Richter-Boix Á (2015) Trophic Strategies of a Non-Native and a Native Amphibian Species in Shared Ponds. PLoS ONE 10(6): e0130549. doi:10.1371/journal.pone.0130549

Academic Editor: Stefan Lötters, Trier University, GERMANY

Received: November 6, 2014

Accepted: May 22, 2015

Published: June 23, 2015

Copyright: © 2015 San Sebastián et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

One of the critical factors for understanding the establishment, success and potential impact on native species of an introduced species is a thorough knowledge of how these species manage trophic resources [1–3]. Understanding how non-native species are likely to become established in a particular environment is a central challenge in conservation biology. This understanding is relevant to management policies that aim to prevent invasions or eradicate introduced species [4], and to those that aim to diminish the effects of non-native species on native biodiversity, ecosystem processes or community structures [5,6].

There are a number of different ways in which feeding behavior can contribute to the success of an invading species. Overall, two main trophic pathways have been suggested to explain resource acquisition by non-native species: (1) they may exploit novel niche opportunities that most native species are unable to use (opportunism hypothesis), or (2) they may behave aggressively with respect to the resources exploited by natives, displacing them from their preferred niches (competition hypothesis) [7–10]. The study of trophic niche width and resource distribution between species can be a useful tool to determine trophic patterns and evaluate the effect of non-native species on invaded communities [11–13]. Under the trophic opportunism hypothesis, the presence of non-native species would not be expected to have any effect on the variety of the diet of native species (niche width) [14,15]. In contrast, under the trophic competition hypothesis with the corresponding inter-specific interactions, the niche width of species with less competitive capacity would be expected to increase due to niche displacement to non-preferred resources [16,17].

Temporary ponds and tadpoles are good ecological models for studies of community structure. These ponds are small closed systems with a recurrent annual dry phase. They are critically important habitats for many amphibian species [18,19]. During the desiccation process, resource availability decreases and larva density increases. The quality and quantity of resources influence the capacity of larvae to complete metamorphosis and perform well [20–23], which key in the breeding success of amphibians [24]. Therefore, during pond desiccation, interaction and competition between species increases [25,26] and the introduction of non-native species can influence the community stability of these systems as well as the breeding success of native species [27,28].

In the present study, our objective was to determine the main trophic strategies of the non-native amphibian *Discoglossus pictus* and its potential trophic impact on the native amphibian *Bufo calamita*; the tadpoles of both species mainly inhabit temporary ponds. We aimed to determine whether *D. pictus* exploits similar trophic resources as those exploited by the native *B. calamita* (competition hypothesis) or alternative resources (opportunistic hypothesis). To this end, we analyzed the stable isotope values of nitrogen and carbon in larvae of both species. This isotope approach has led to great advances in our understanding of trophic ecology, and provides an integrated view of resource consumption, through identifying food strategies and the trophic levels of species (see reviews: [13,29,30]).

D. pictus is one of the few anuran species introduced into Europe over the last century [31,32] and which has expanded along the Mediterranean coast from southeast France into northeast Spain [33,34]. The overlap in the habitat of *D. pictus* and *B. calamita* tadpoles as well as their similar morphology suggests a potential overlap in their trophic niches [35,36]. Previous laboratory experiments revealed increased competitive capacity of the introduced over the native species [36], but no studies have been conducted in natural conditions to corroborate those results. In agreement with the previous competition experiment, we expect the introduced species to adopt a competitive strategy in co-occurrence with *B. calamita* and to displace the native species to alternative and potentially lower-quality resources.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study zone (Girona) is not a protected area, the present work did not involve endangered or protected species and the work was approved by the competent authorities. *D. pictus* and *B. calamita* are not listed as threatened by IUCN Red List (<http://www.iucnredlist.org>). Even so the development of this study has had no impact on the natural populations of two species. Eggs and tadpoles of these species were collected in Girona with support and collecting permits granted Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya (current Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural) (SF/272) of the regional authorities of Catalonia. All works was conducted in strict adherence to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals at the University of Barcelona and approved by this institution. Procedures had followed the regulations that cover animal housing and experimentation in Catalonia (Spain) contained in Decret 214/1997 of 30th of July and Llei 5/1995 of 21st of June, both from the Generalitat de Catalunya, which apply the European Directive 86/609/CEE to the Spanish law in Catalonia.

Study Species

The Mediterranean painted frog *D. pictus auritus* was accidentally introduced in SE France (Banyuls-sur-Mer) approximately a century ago from Algeria [37]. Today, this species occupies the Mediterranean coast from Montpellier (southeast France) to Vilassar de Mar (Barcelona, northeast Spain), increasing its distribution annually (Information Server Amphibians and Reptiles of Spain-SIARE 2014; <http://siare.herpetologica.es/>). The natterjack toad *B. calamita* is a native species in the invaded area of *D. pictus*. Although it has some isolated populations, its distribution range is wide in southwestern and central Europe. In our study area, *D. pictus* and *B. calamita* mainly breed in ephemeral and temporary ponds. Both species are “opportunistic” breeders, with a reproductive period that starts after periods of rainfall (early spring and early autumn). Due to similarities in breeding strategies and breeding habitat at the larval stage, the two species overlap in time and space during the larval stage [34]. In addition, both species have been described as benthic animals, which live at the bottom of ponds and rasp similar food from submerged vegetation and substrate [35]. In temporary ponds, both species often suffer high mortality related to pond desiccation [38,39]. This process increases competition within and between species for those resources that allow individuals to develop as quickly as possible. There is a relationship between quality and quantity of exploited resources and tadpole growth and developmental rates [20–23].

Trophic fractionation experiment

To achieve our objective, in addition to sampling and analyzing the isotope values of larvae of *D. pictus* and *B. calamita* in natural ponds inhabited by both species and in ponds inhabited by only one species, we calculated the isotopic discrimination factors for each amphibian species in a controlled-diet laboratory experiment. The trophic fractionation value is the rate at which animals incorporate the isotope values ($\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$) of their diets into their tissues [40,41]. To study the trophic fractionation values of both species, we collected samples of 2–3 clutches for each species from the same study area and transported them to our laboratory at the University of Barcelona (Barcelona, Spain). Egg masses were hatched and the tadpoles were separated in individual plastic containers of 1000 ml with standard dechlorinated water under constant conditions of temperature and photoperiod (12 h dark: 12 h light). During the experiment, the tadpoles were fed with commercial rabbit chow ad libitum (Cuniasa Mater, ASA S.L.,

Asturias, Spain; 16% protein, 3% lipids, 17% carbohydrate, 10% ash). The temperature during the experiment was maintained between $\sim 20^{\circ}\text{C}$, similar to the mean $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$ recorded in natural ponds. When the tadpoles reached Gosner stage 39, the same development stage as the tadpoles collected in the field, 21 tadpoles of each species were fasted for 48 hours, euthanized with absolute ethanol and then stored until analysis. To calculate the discrimination factors, we analyzed the stable isotopes in the tadpoles and a subsample of the administered food. The diet discrimination factors ($\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$) for *D. pictus* and *B. calamita* were calculated as the difference between the isotope ratios of an animal and its diet.

Trophic niche of both amphibians in free-living conditions

Fieldwork procedures were conducted in a natural area situated in northeast Spain (Fig 1). During May 2012 in this study area we monitored 12 temporary ponds with differences for the presence of each species: 4 inhabited only by *B. calamita*, 4 only by *D. pictus* and 4 inhabited by both species. To reduce the potential isotopic variability associated with contrasting habitats [42], we selected ponds with similar characteristics (Table 1). To reduce the potential effect of the phenology we sampled 10 larvae of each species at a similar developmental stage from each pond (Gosner stage 39; Gosner, 1960). All the tadpoles were held in plastic containers with water and brought to the laboratory.

For a quantitative measurement approach of the trophic niche of each species, we analyzed stable isotope values of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) of each larva. $\delta^{13}\text{C}$ values provide information on the source of primary carbon and $\delta^{15}\text{N}$ values are related to the trophic level of the organism [43,44]. Stable isotope values reflect the diet over the period during which the tissue analyzed was formed; for tadpoles this is their entire life [45]. To avoid overestimation due to the food remaining in the digestive tract, the tadpoles were held in dechlorinated tap water for 48 hours under fasting conditions; this clears their gut contents. They were then euthanized with absolute ethanol and stored until analysis. We used the same quality and quantity of ethanol for all the samples to avoid any effect on the isotope results.

Stable isotope analysis

All samples (tadpoles and rabbit food) were dried and homogenized before stable isotope analysis. The homogenization was manual by grinding to a fine powder. As the lipid content of the larvae was low, we did not remove the lipids prior to isotope analysis. Isotope analysis was conducted at the Serveis Científico-Tècnics (University of Barcelona, Spain). Weighed subsamples (between 0.7 and 0.8 mg) of the powdered tadpoles and rabbit food were placed in tin capsules. N and C isotope analysis was carried out using an elemental analyzer (Flash EA 1112) coupled to stable isotope ratio mass spectrometry equipment (CF-IRMS). The laboratory uses international standards, which are generally run after every 12 samples: IAEA CH7 (87% C), IAEA CH6 (42% C) and USGS 24 (100% C) for ^{13}C ; IAEA N1 and IAEA N2 (21% N) and IAEA NO3 (13.8% N) for ^{15}N . The international standards for N and C are atmospheric nitrogen (AIR) and Pee Dee Belemnite (PDB), respectively. Accuracy was $\pm 0.1\%$ and $\pm 0.2\%$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively.

Statistical analysis

To compare the trophic fractionation values estimated in the controlled-diet experiment between species (*D. pictus* and *B. calamita*) we used t-tests. As differences in trophic fractionation values between the species were found (see Results section), we corrected the isotopic values of each tadpole collected in the field by the difference in the trophic fractionation estimated with the trophic fractionation experiment between species. After this correction, we tested

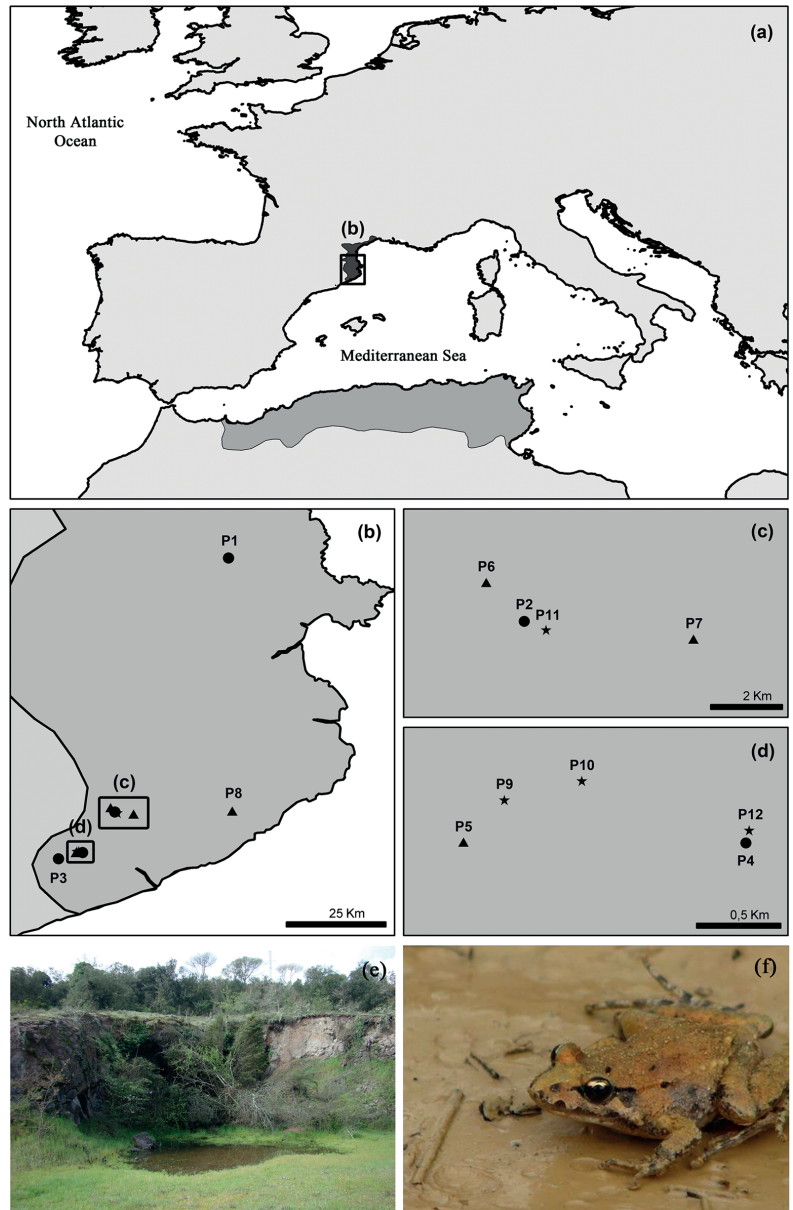


Fig 1. Distribution of *D. pictus* and the locations of the study ponds. (a) *D. pictus auritus* native (grey) and invaded (black) areas. (b) Study area. (c) and (d) locations of sampled ponds. Dots: *B calamita* non-shared ponds (P1 to P4); triangles: *D. pictus* non-shared ponds (P5 to P8); stars: shared ponds (P9 to 12). P1 to P12 correspond to Ponds 1 to 12 in [Table 1](#). (e) Picture of Pond 2. (f) Adult *D. pictus*.

doi:10.1371/journal.pone.0130549.g001

Table 1. Characteristics of selected ponds.

Ponds	Species	Temporality (months)	Temperature (°C)	Substrate (mm)	Insolation (%)	Area (m ²)	Depth (cm)
Pond1	<i>B. calamita</i>	1–2	17.3	<0.6	50–75	6	5–10
Pond2	<i>B. calamita</i>	1–2	17.7	0.6–2	75–90	26	15–20
Pond3	<i>B. calamita</i>	1–2	18.5	2–64	>90	9	5–10
Pond4	<i>B. calamita</i>	3–4	23.4	<0.6	75–90	20	15–20
Pond5	<i>D. pictus</i>	1–2	22.7	<0.6	>90	8	5–10
Pond6	<i>D. pictus</i>	1–2	19.6	<0.6	>90	24	15–20
Pond7	<i>D. pictus</i>	3–4	18.1	<0.6	50–75	8	5–10
Pond8	<i>D. pictus</i>	1–2	27	<0.6	>90	6	5–10
Pond9	<i>B. calamita</i> vs. <i>D. pictus</i>	2–3	30.2	0.6–2	>90	30	5–10
Pond10	<i>B. calamita</i> vs. <i>D. pictus</i>	1–2	26.4	<0.6	>90	6	5–10
Pond11	<i>B. calamita</i> vs. <i>D. pictus</i>	1–2	15.3	2–64	>90	10	5–10
Pond12	<i>B. calamita</i> vs. <i>D. pictus</i>	3–4	23.4	<0.6	75–90	20	10–15

doi:10.1371/journal.pone.0130549.t001

whether the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values differed between species (*D. pictus* and *B. calamita*), pond conditions (sharing and non-sharing) and the interaction between species and pond condition, by applying a Generalized Least Squares (GLS) model. Species, pond condition (sharing and non-sharing ponds) and the interaction species-pond condition were included as fixed effects. Considering the non-independence of tadpoles from the same pond, we defined a general correlation matrix assuming that the residuals of the same pond are not independent of each other [46]. Analyses were performed with REML estimation in the *nlme* package using the *corCompSymm* argument in the *gls* function. All statistical analyses were performed in R version 3.0.3.

Trophic niche width was estimated using a Bayesian approach based on multivariate ellipse-based metrics [47]. In particular, we calculated standard ellipse areas (SEAs) for each species in each pond following methods from Jackson et al. (2011) by using the SIAR package [48,49] (<http://cran.r-project.org/web/packages/siar/index.html>). To detect potential changes in trophic niche width between species and between pond conditions we applied the Mann-Whitney U-test. In addition, in the ponds inhabited by both species we estimated the SEA overlap between the species using SIBER [47].

Results

Trophic fractionation experiment

We found that both $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values differed between *D. pictus* and *B. calamita* when eating the same food (Table 2). In particular, *B. calamita* showed higher $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values than *D. pictus* (Table 2; Fig 2). Regarding trophic fractionation, *D. pictus* showed lower trophic fractionation values for N than *B. calamita*, but higher values for C (Table 2).

Isotope differences among pond typologies

The $\delta^{15}\text{N}$ values were similar between *D. pictus* and *B. calamita*. Only pond condition showed a significantly effect on $\delta^{15}\text{N}$ values in both species (Table 3). In particular, in shared ponds, $\delta^{15}\text{N}$ values were higher for both species than in ponds inhabited by only one species (Figs 3 and 4). The $\delta^{13}\text{C}$ values were also similar for the two species, but differed when we compared between shared and non-shared ponds. Specifically, $\delta^{13}\text{C}$ values in share ponds were higher for *D. pictus* than *B. calamita*. Both species showed a wide range in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values, resulting in range overlap between species in both shared and non-shared ponds (Figs 3 and 4; Table 4).

Table 2. Mean ± SD (and range) of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values, and isotopic discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$) of *D. pictus* and *B. calamita*.

Species	n	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\Delta^{15}\text{N}$ (mean)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\Delta^{13}\text{C}$ (mean)
rabbit food	6	2.77±0.28 (0.79)		-25.25±0.37 (0.91)	
<i>B. calamita</i>	21	6.65±0.48 (1.63)	3.66±0.48	-23.96±0.69 (2.01)	1.56±0.64
<i>D. pictus</i>	21	5.20±0.49 (2.05)	2.23±0.49	-23.25±0.49 (1.72)	0.91±0.49
T-test (between species)			t = -3.83*		t = 9.62*

t-test for discrimination factors between species.

*Significant values at $p < 0.0001$.

doi:10.1371/journal.pone.0130549.t002

Differences in the trophic niche width (SEA)

Taking into account both shared and non-shared ponds, *D. pictus* showed higher and significantly more marginal SEA values than *B. calamita* (Mann Whitney test, $U_{1,14} = 14$; $p = 0.05$). *D. pictus* registered SEA values of 1.65 and 1.38, in non-shared and shared ponds respectively,

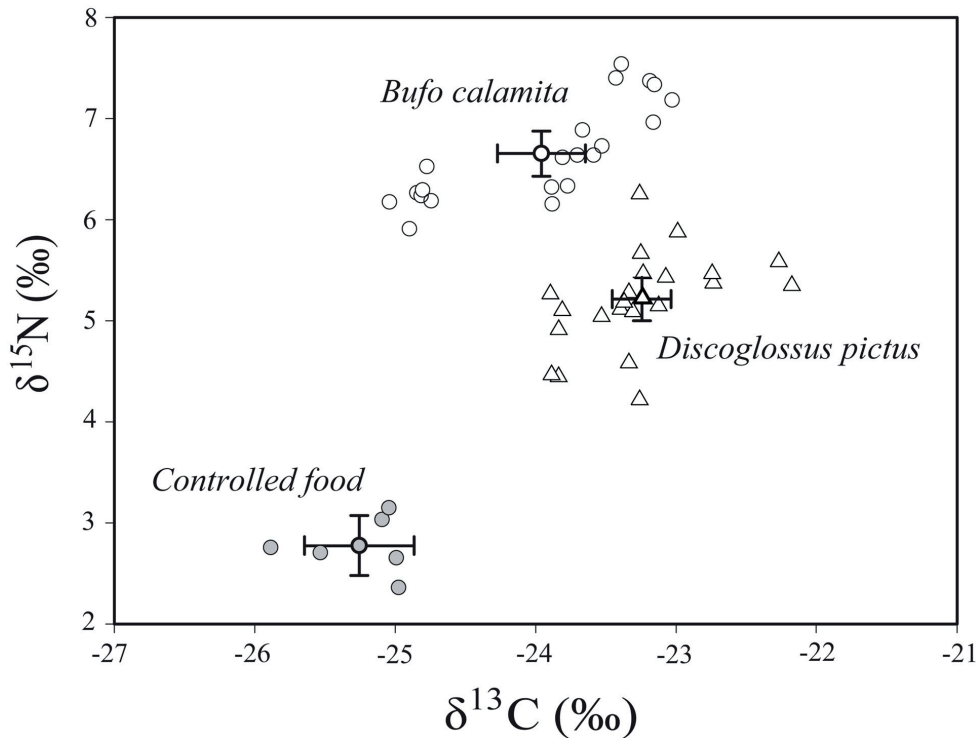


Fig 2. Mean and standard deviation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for *B. calamita* (filled circles; $n = 21$), *D. pictus* (empty circles) and the controlled diet (filled triangles; $n = 21$).

doi:10.1371/journal.pone.0130549.g002

Table 3. Generalized least squares model for effects of the variables species (*D. pictus* and *B. calamita*), pond condition (sharing or non-sharing), and the interaction between the two on stable isotope values ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$).

Variables	$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{13}\text{C}$	
	F _{1, 154}	p	F _{1, 154}	p
Species	0.18	0.672	0.08	0.781
Pond condition	4.67	0.032	9.47	0.002
Species- X Pond condition	0.16	0.686	0.32	0.569

doi:10.1371/journal.pone.0130549.t003

while *B. calamita* had values of 0.24 and 1.13 in non-shared and shared ponds (Fig 5). We also found a different effect of the pond condition (sharing vs. non-sharing) on the SEAs of the two species. *D. pictus* showed no differences in SEA between shared and non-shared ponds ($U_{1,7} = 7$; $p = 0.77$). In contrast, *B. calamita* showed lower SEAs in non-shared ponds than when it co-occurred with *D. pictus* ($U_{1,7} = 3$, $p < 0.001$). Moreover, the SEA of *D. pictus* and *B. calamita* did not spatially overlap when co-occurring (SIBER results always overlap = 0; with an overlap probability of <0.001 ; Fig 5).

Discussion

Our study with stable isotopes allowed us to corroborate partially, under field conditions, our hypothesis based on a previous laboratory experiment. We found that tadpoles of both species registered similar $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values, which is indicative of similar trophic niches and consequently of potential overlap in resource management between the species. This result is in agreement with previous studies based on *D. pictus* and *B. calamita* tadpole morphology, which described both as benthic tadpoles that feed by rasping food from submerged areas [35]. Despite their similar diets, *D. pictus* and *B. calamita* clearly occupy segregated trophic niches when they are present in the same pond. Trophic partitioning is a mechanism that reduces interspecific competition for scarce trophic resources in temporary ponds and thus allows co-existence [50–53]. Niche partitioning has been reported as a type of assembly in both native [54–56] and introduced vs. native communities [57,58]. However, one question we wished to address here is whether *D. pictus* adopts a competitive or an opportunistic strategy in this niche segregation.

We found evidence of competition between the introduced and the native species in our study, in consonance with several studies [59–61], which demonstrated that high ecological similarity promotes competition. Competition between non-native and native species can lead to ecological displacement of one species to other resources or even the competitive exclusion of one species [51,62]. These interactions can trigger a variation in stable isotope values due to direct competition for higher quality resources [63,64]. When *D. pictus* and *B. calamita* co-occurred in the same ponds, the $\delta^{15}\text{N}$ values were higher for both species while the $\delta^{13}\text{C}$ values were only higher for the introduced species. While variation of $\delta^{13}\text{C}$ values suggests different microhabitat exploitation by species within the ponds, the $\delta^{15}\text{N}$ variation may have various interpretations. $\delta^{15}\text{N}$ values indicate the quality of the exploited resources and even the trophic position of organisms [65]. In temporary ponds, space and resources are limited and both interspecific and intraspecific competition for a higher quality diet is unavoidable; this is important for more rapid development and increased fitness [66,67]. The competition for a higher quality diet could increase the isotopic signals for both species. However, the stress derived from competitive interactions could also be the cause of the observed increases in $\delta^{15}\text{N}$ signals. Several studies have shown how various types of nutritional stress (e.g. reduced food

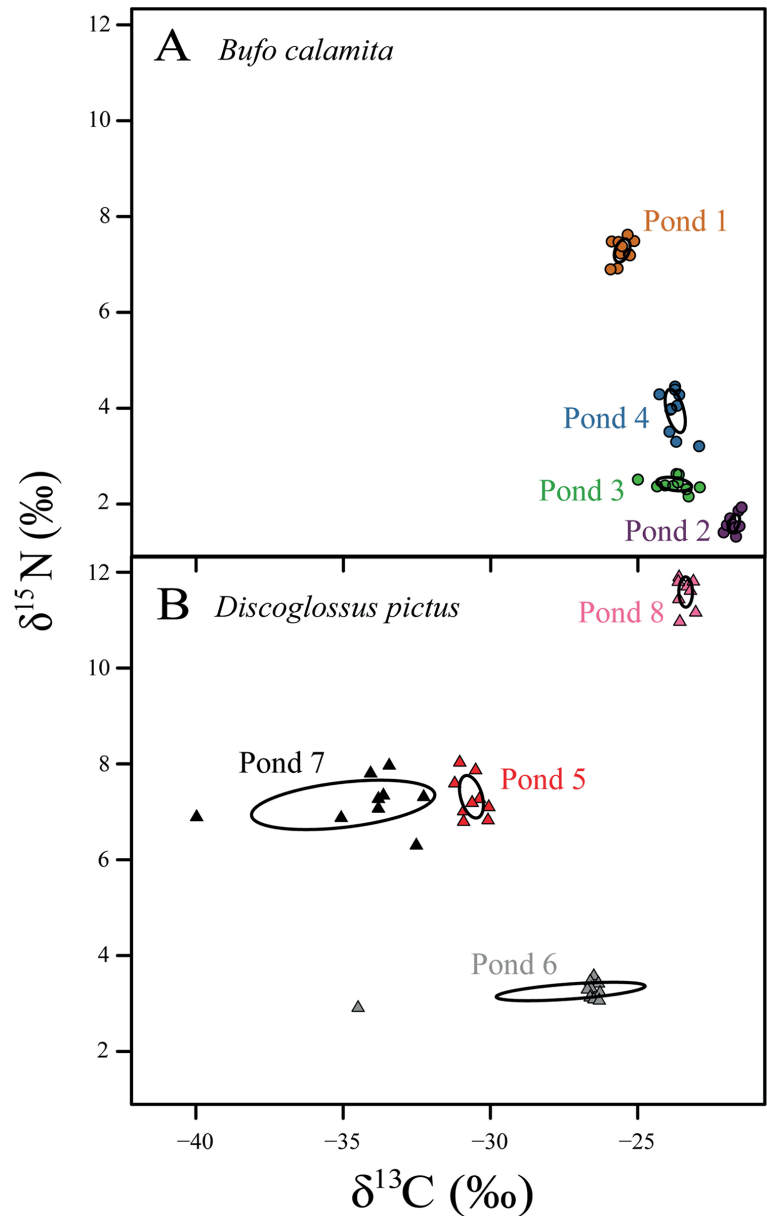


Fig 3. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and standard ellipse areas for the isotopic niches of *B. calamita* (A) and *D. pictus* (B) in each pond under non-sharing conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0130549.g003

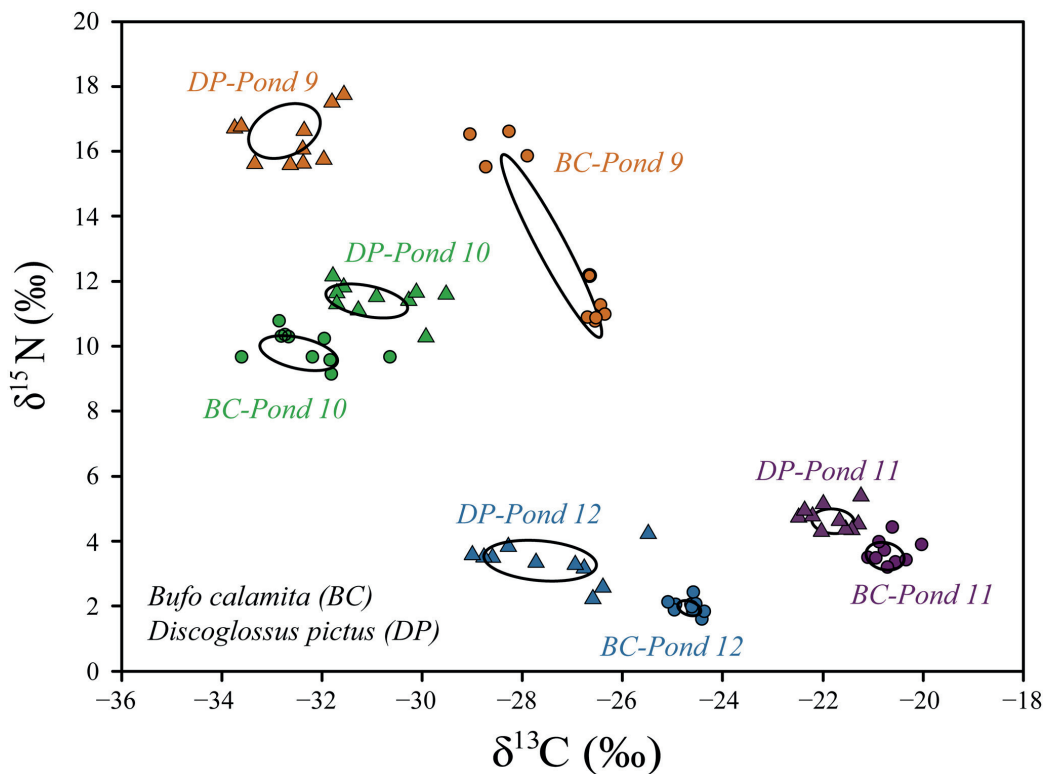


Fig 4. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and standard ellipse areas for *B. calamita* and *D. pictus* in the four ponds where the species coexist (A-D).

doi:10.1371/journal.pone.0130549.g004

intake or starvation) influence the stable isotope signatures of animal tissues by increasing the $\delta^{15}\text{N}$ values [68–70].

The trophic spatial hierarchy may indicate the competitive interaction between the two species or a difference in the exploitation of resources by both. However, the results for SEAs (a

Table 4. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ descriptive statistics for two species in shared and non-shared ponds.

Species	Pond condition	Variables	n	Mean (‰)	Minimum (‰)	Maximum (‰)	Std. Dev.
<i>D. pictus</i>	No-sharing	$\delta^{15}\text{N}$	38	5.76	1.48	10.46	3.01
<i>D. pictus</i>	No-sharing	$\delta^{13}\text{C}$	38	-28.48	-40.69	-22.30	4.78
<i>D. pictus</i>	Sharing	$\delta^{15}\text{N}$	40	7.54	0.80	16.30	5.38
<i>D. pictus</i>	Sharing	$\delta^{13}\text{C}$	40	-27.48	-33.00	-20.56	4.24
<i>B. calamita</i>	No-sharing	$\delta^{15}\text{N}$	40	3.90	1.32	7.62	2.24
<i>B. calamita</i>	No-sharing	$\delta^{13}\text{C}$	40	-23.80	-29.36	-21.48	1.66
<i>B. calamita</i>	Sharing	$\delta^{15}\text{N}$	40	7.21	1.60	16.62	4.78
<i>B. calamita</i>	Sharing	$\delta^{13}\text{C}$	40	-26.26	-33.62	-20.03	4.31

These statistics were evaluated from original isotopic values (without specific diet discrimination correction).

doi:10.1371/journal.pone.0130549.t004

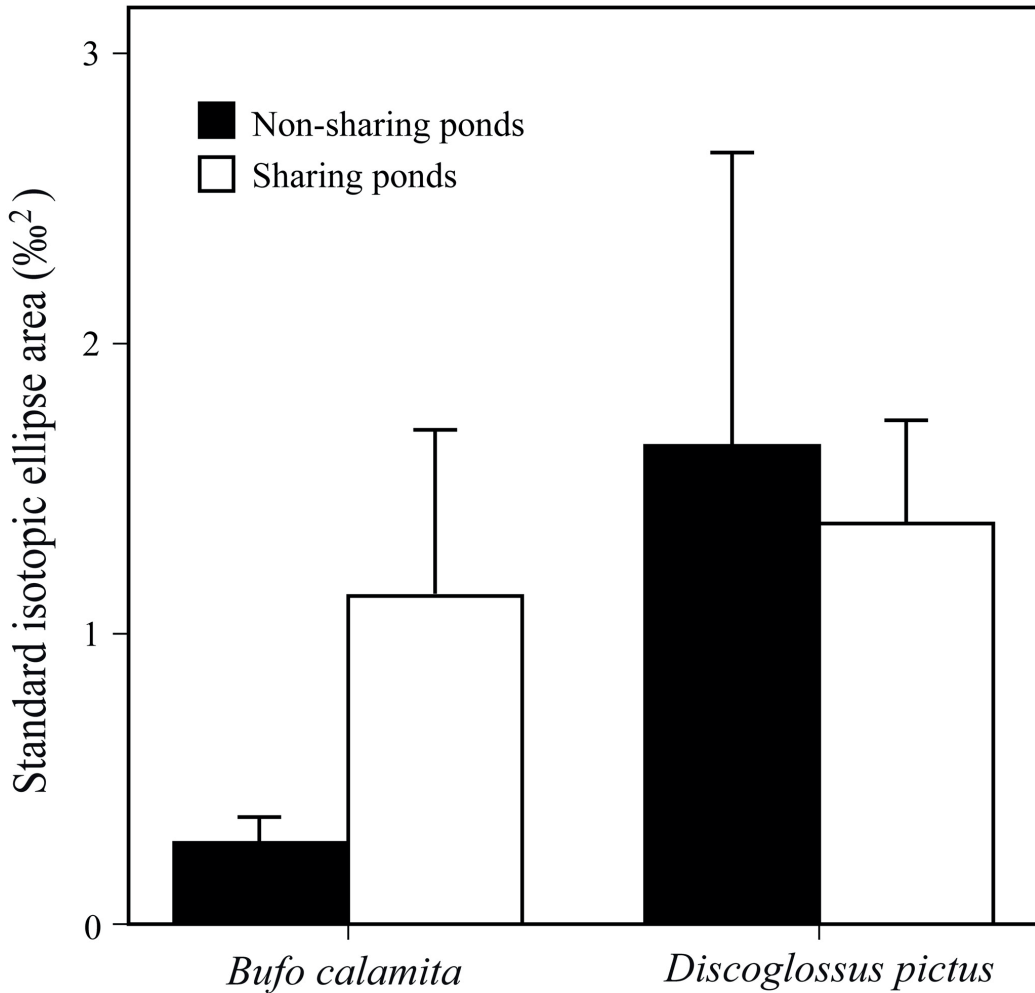


Fig 5. Mean standard isotopic ellipse area for *B. calamita* and *D. pictus* under sharing and non-sharing niche conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0130549.g005

proxy for trophic niche width) suggest a displacement of native species and support the hypothesis of competition strategy by invasive species. In all shared ponds, *D. pictus* was placed above *B. calamita* in the trophic niche representation. Moreover, an increase in the niche width of the native species was found, while *D. pictus* maintained the same width. The increment in SEA may be related to searching and the displacement of one species to another type of resource under the presence of a more highly competitive species, when both share diet preferences [71]. The dominant species in general occupies a higher trophic position and displaces the less competitive species to a suboptimal trophic niche [7,9]. Consequently, an increased competitive capacity of the invasive species could lead to the trophic partitioning of the species,

displacing the native species to lower quality resources. Previous studies have reported other examples of higher trophic competitive capacity of invasive species in ants [61,72] and fish [73,74].

Amphibians are characterized by their high plasticity and capacity for adaptation to environmental changes. Hence, communities that receive introduced species can probably incorporate shifts in order to minimize potential effects. Niche overlap is often resolved through differences in spatial or temporal niches [75,76], which allow these two species to co-exist. Some authors present the spatial segregation as a possibility of assemblage between *B. calamita* and *D. galganoi* (a species similar to *D. pictus* endemic to the western part of Iberian Peninsula) in species rich-communities [77,78]. On the other hand, *D. pictus* and *B. calamita* are species with short aquatic developments; therefore, a small displacement in their breeding phenology could be a feasible adaptation among others. The order in which oviposition occurs can have a large effect on the outcome of competitive interactions [79,80]. Especially important are priority effects in coexistence of native and invasive species [81,82]. Be that as it may, the study of the invasive process of *D. pictus* offers a good opportunity to gain an understanding of amphibian community assemblage and adaptation to invasions.

Niche width in invasive species

SEA has been demonstrated to be a useful parameter in the study of invasiveness of introduced species [13,83]. Wide trophic niche has suggested an advantage for invasive species because this trait maximizes the range of resources and prey types that are available to newly settled individuals [84–87]. A narrower niche is thought to be an evolutionary response to an environment that is stable over space and time [88,89]. Our study only compared the niche width of two species (non-native and native) and therefore, we cannot extrapolate to the invasive capacity of *D. pictus* or to whether it is a generalist or specialist in terms of its dietary behavior. We could indicate the seemingly greater plasticity of the non-native species studied than that of the native species, but more studies related to the niche width of *D. pictus* and its overlap with native species would be required to confirm this. Trophic plasticity joins other plastic traits of *D. pictus* already highlighted by other studies that could be the key to its invasive capacity [23,36,90].

Study limitations and contributions

The study of the trophic niche of amphibians in the field has always had great limitations. Our study is a good example of the utility of stable isotope analysis in this field. Additionally, it provides basic information necessary to development other studies with this technique in two species. Although the technique employed here has been widely applied to other vertebrate groups, such studies are scarce in amphibians and basic information is still deficient [91]. For example, the need to use adequate isotopic fractionation of $\delta^{15}\text{N}$ (denoted $\Delta^{15}\text{N}$) and $\delta^{13}\text{C}$ (denoted $\Delta^{13}\text{C}$) in isotope studies is pivotal to a correct interpretation of results. Particularly, the potential differences in the isotopic fractionation between species should be taken into account [40,92]. Although isotopic fractionation values have been calculated for several species from different orders (see review in [40]), very few studies estimate trophic fractionation for tadpoles with values showing differences between species [53,93]. Here, by developing a controlled-diet experiment, we estimated the isotopic fractionation values of N and C for *D. pictus* and *B. calamita*. The results clearly reveal interspecific differences in isotopic discrimination. These differences could be related directly to variations in the nutritional metabolism of both tadpole species [91], highlighting the importance of using specific factors for each species if we are to obtain correct ecological interpretations of isotope values [94].

Nonetheless, this study has an important limitation. The lack of information regarding resources (availability and isotopic signal) reduces the robustness of our outcomes. Although we chose similar ponds, there could be a certain variability between ponds that may alter the resource values [42]. In the present case we have the advantage of having performed laboratory experiments previously that support our results. Likewise we suggest that the results could be improved by measuring the stable isotope values of the resources and their availability so that isotope mixing models can be applied or our conclusions could be tested by DNA analysis. The confirmation of the competition trophic strategy of *D. pictus* in the field is an important concern for amphibian conservation because of the status of this group of vertebrates [95] and to obtain a more accurate view of the effects derived from its introduction. This study is the first evidence of this species' competition ability in the field.

Invasive species can modify or adapt some traits in the course of the invasion process [96]. Some authors have recorded shifts in environmental niche, competition ability or indeed in exploiting trophic resources [97–99]. All shared ponds analyzed in this study are located in areas invaded by *D. pictus* 10–20 years ago (SIARE, 2014). Expanding the scope of the study both spatially and numerically would provide an opportunity to test whether our results are general to this non-native species or if it has modified its trophic traits over time. However, the present study is an example of the value of information derived from stable isotopes and its applicability to amphibians. The use of this technique has allowed us to corroborate a previous laboratory hypothesis (the competition strategy by invasive species; [36]). Our results suggest a higher position of invasive species in terms of spatial trophic niche and niche width conservation. Meanwhile, the strategy of *D. pictus* and its wide trophic niche strengthen its invasive abilities and have powerful consequences for the fitness of less competitive native species. Currently, studies of competition in amphibian larvae use different approaches, from small laboratory tanks to mesocosms and field enclosures to full ponds (see review in [100]). Even if the use of tanks and other experimental mesocosm approaches have advantages [101], only correlative studies using full ponds and analyzing tadpoles with unrestricted access to the full pond can help us to evaluate the real impact of competition in nature [53,102] and thereby of introduced species on native communities.

Acknowledgments

We would like to thank M. Franch for his field and logistical support; T. Militão for her help in the stable isotope analyses; I. Gómez-Mestre, N. Garriga, Lluís Jover and A. Maceda for his useful comments and U. Enriquez-Urzelai and E. Pujol-Buxó for their support during the experiment.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OSS ARB GAL. Performed the experiments: OSS. Analyzed the data: OSS JN ARB. Contributed reagents/materials/analysis tools: OSS GAL JN ARB. Wrote the paper: OSS GAL JN ARB.

References

1. Ehrlich PR. Ecology of biological invasions of North America and Hawaii Mooney HA, Drake JA, editors. Springer New York; 1986.
2. Mclain DK, Moulton MP, Sanderson JG. Sexual selection and extinction: The fate of plumage-dimorphic and plumage-monomorphic birds introduced onto islands. *Evol Ecol Res.* 1999; 1:549–65.
3. Vázquez DP. Exploring the relationship between niche breadth and invasion success. In: Cadotte M. W. SMM and TF, editor. *Conceptual ecology and invasions biology.* Great Britain; 2005. p. 317–32.

4. Simberloff D, Martin J-L, Genovesi P, Maris V, Wardle DA, Aronson J, et al. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends Ecol Evol.* 2013; 28(1):58–66. doi: [10.1016/j.tree.2012.07.013](https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.013) PMID: [22889499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22889499/)
5. Shine C, Williams N, Gündling L. A guide to designing legal and institutional frameworks on alien invasive species. IUCN, editor. Gland, Switzerland Cambridge and Bonn; 2000.
6. Clavero M, García-Berthou E. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends Ecol Evol.* 2005; 20(3):110. PMID: [16701353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16701353/)
7. Tilman D. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: a stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(30):10854–61. PMID: [15243158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15243158/)
8. Vilà M, Gómez A, Maron JL. Are alien plants more competitive than their native conspecifics? A test using *Hypericum perforatum* L. *Oecologia.* 2003; 37:211–5.
9. Bando KJ. The roles of competition and disturbance in a marine invasion. *Biol Invasions.* 2006; 8(4):755–63.
10. Sol D, Bartomeus I, Griffin AS. The paradox of invasion in birds: competitive superiority or ecological opportunism? *Oecologia* 2012; 169(2):553–64. doi: [10.1007/s00442-011-2203-x](https://doi.org/10.1007/s00442-011-2203-x) PMID: [22139450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22139450/)
11. Layman CA, Arrington DA, Montaña CG, David MP. Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology.* 2007; 88(1):42–8. PMID: [17489452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17489452/)
12. Hänfling B, Edwards F, Gherardi F. Invasive alien Crustacea: dispersal, establishment, impact and control. *BioControl.* 2011; 56(4):573–95.
13. Jackson MC, Donohue I, Jackson AL, Britton JR, Harper DM, Grey J. Population-level metrics of trophic structure based on stable isotopes and their application to invasion ecology. *PLoS One.* 2012; 7(2):1–12.
14. MacDonald J, Roudez R, Glover T, Weis JS. The invasive green crab and Japanese shore crab: behavioral interactions with a native crab species, the blue crab. *Biol Invasions.* 2007; 9(7):837–48.
15. Santos MJ, Pinto BM, Santos-Reis M. Trophic niche partitioning between two native and two exotic carnivores in SW Portugal. *Web Ecol.* 2007; 7:53–62.
16. Svanbäck R, Persson L. Individual diet specialization, niche width and population dynamics: implications for trophic polymorphisms. *J Anim Ecol.* 2004; 73(5):973–82.
17. Svanbäck R, Bolnick DI. Intraspecific competition drives increased resource use diversity within a natural population. *Proc Biol Sci.* 2007; 274(1611):839–44. PMID: [17251094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17251094/)
18. Jakob C, Poizat G, Veith M, Seitz A, Crivelli AJ. Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology. *Hydrobiologia.* 2003; 499:51–61.
19. Gómez-Rodríguez C, Díaz-Paniagua C, Serrano L, Florencio M, Porthault A. Mediterranean temporary ponds as amphibian breeding habitats: the importance of preserving pond networks. *Aquat Ecol.* 2009; 43:1179–91.
20. Steinwascher K, Travis J. Influence of food quality and quantity on early growth of two anurans. *Copeia.* 1983; 1:238–42.
21. Kupferberg S. The role of larval diet in anuran metamorphosis. *Am Zool.* 1997; 159:146–59.
22. Schiesari L. Pond canopy cover: a resource gradient for anuran larvae. *Freshw Biol.* 2006; 51(3):412–23.
23. Enriquez-Urzelai U, San Sebastián O, Garriga N, Llorente GA. Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia.* 2013; 173(1):117–27. doi: [10.1007/s00442-013-2596-9](https://doi.org/10.1007/s00442-013-2596-9) PMID: [23344427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23344427/)
24. Newman RA. Developmental plasticity of *Scaphiopus Couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology.* 1989; 70(6):1775–87.
25. Robert AN. Effects of changing density and food level on metamorphosis of a desert amphibian, *Scaphiopus couchii*. *Ecology.* 1994; 75(4):1085–96.
26. Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A. Responses to competition effects of two anuran tadpoles according to life-history traits. *Oikos.* 2004; 106(1):39–50.
27. Moyle PB, Light T. Biological invasions of freshwater: empirical rules and assembly theory. *Biol Conserv.* 1996; 78:149–61.
28. Kondoh M. Foraging adaptation and the relationship between food-web complexity and stability. *Science.* 2003; 299(5611):1388–91. PMID: [12610303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12610303/)
29. Layman CA, Araujo MS, Boucek R, Hammerschlag-Peyer CM, Harrison E, Jud ZR, et al. Applying stable isotopes to examine food-web structure: an overview of analytical tools. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2012; 87(3):545–62. doi: [10.1111/j.1469-185X.2011.00208.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00208.x) PMID: [22051097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22051097/)

30. Perkins MJ, McDonald RA, van Veen FF, Kelly SD, Rees G, Bearhop S. Application of nitrogen and carbon stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) to quantify food chain length and trophic structure. *PLoS One*. 2014; 9(3):e93281. doi: [10.1371/journal.pone.0093281](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093281) PMID: [24676331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24676331/)
31. Francesco G, Christophe FÆ. Pattern of distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. *Biol Invasions*. 2007; 767–72. PMID: [18002069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18002069/)
32. Rebelo R, Amaral P, Bernardes M, Oliveira J, Pinheiro P, Leitão D. *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), a new exotic amphibian in Portugal. *Biol Invasions*. 2010; 12(10):3383–7.
33. Fradet V, Geniez P. La répartition du Discoglosse peint *Discoglossus pictus* Otth, 1837 (Amphibien, Anoure, Discoglossidés) dans le Sud de la France: note sur sa présence dans le département de l'Hérault. *Bull la Société herpétologique Fr Y*. 2004; 109:35–41.
34. Montori A, Llorente GA, Richter-Boix Á, Villero D, Franch M, Garriga N. Colonización y efectos potenciales de la especie invasora *Discoglossus pictus* sobre las especies nativas. *Munibe*. 2007; 25:14–27.
35. Escoriza D, Boix D. Assessing the potential impact of an invasive species on a Mediterranean amphibian assemblage: a morphological and ecological approach. *Hydrobiologia*. 2012; 680:233–45.
36. Richter-Boix A, Garriga N, Montori A, Franch M, San Sebastián O, Villero D, et al. Effects of the non-native amphibian species *Discoglossus pictus* on the recipient amphibian community: niche overlap, competition and community organization. *Biol Invasions*. 2012; 15(4):799–815.
37. Wintrebert P. Présence à Banyuls-sur-Mer (Pyrénées-Orientales) du *Discoglossus pictus* Otth. *Bull Soc Zool Fr*. 1908; 33:54.
38. Martínez-Solano I (2009). Sapillo pintojo meridional—*Discoglossus jeanneae*. In: Salvador A., Martínez-Solano I, editor. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales; 2009.
39. Gómez-Mestre I. Sapo corredor—*Epidalea calamita*. In: Salvador A., Martínez-Solano I, editor. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales; 2009. p. 2–23.
40. Caut S, Angulo E, Courchamp F. Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J Appl Ecol*. 2009; 46:443–53.
41. Del Rio CM, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2009; 84(1):91–111. doi: [10.1111/j.1469-185X.2008.00064.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00064.x) PMID: [19046398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19046398/)
42. Sebastián-González E, Navarro J, Sánchez-Zapata JA, Botella F, Delgado A. Water quality and avian inputs as sources of isotopic variability in aquatic macrophytes and macroinvertebrates. *J Limnol*. 2012; 71(1):191–9.
43. Minagawa M, Wada E. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim Cosmochim Acta*. 1984; 48:1135–40.
44. Peterson BJ, Fry B. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu Rev Ecol Syst*. 1987; 18:293–320.
45. Caut S, Angulo E, Courchamp F. Caution on isotopic model use for analyses of consumer diet. *Can J Zool*. 2008; 86:438–45.
46. Nakagawa S, Schielzeth H. A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. O'Hara RB, editor. *Methods Ecol Evol*. 2013; 4(2):133–42.
47. Jackson AL, Inger R, Parnell AC, Bearhop S. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER—Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *J Anim Ecol*. 2011; 80(3):595–602. doi: [10.1111/j.1365-2656.2011.01806.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01806.x) PMID: [21401589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21401589/)
48. Parnell A, Inger R, Bearhop S, Jackson AL. Stable isotope analysis in R (SIAR). Available: <http://cran.r-project.org/web/packages/siar/index.html>. 2008.
49. Parnell AC, Inger R, Bearhop S, Jackson AL. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PLoS One*. 2010; 5(3):e9672. doi: [10.1371/journal.pone.0009672](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009672) PMID: [20300637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20300637/)
50. Schmitt RJ, Holbrook SJ. Seasonally fluctuating resources and temporal variability of interspecific competition. *Oecologia*. 1986; 69(1):1–11.
51. Amarasekare P. Competitive coexistence in spatially structured environments: a synthesis. *Ecol Lett*. 2003; 6(12):1109–22.
52. Hilderbrand RH, Kershner JL. Influence of habitat type on food supply, selectivity, and diet overlap of bonnevillie cutthroat trout and nonnative brook trout in Beaver Creek, Idaho. *North Am J Fish Manag*. 2004; (24.):33–40.

53. Schiesari L, Werner EE, Kling GW. Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. *Freshw Biol.* 2009; 572–86.
54. Inouye DW. Resource partitioning in bumblebees: experimental studies of foraging behaviour. *Ecology.* 1978; 59(4):672–8.
55. Pacala S, Roughgarden J. Resource partitioning and interspecific competition in two two-species insular anolis lizard communities. *Science.* 1982; 217(4558):444–6. PMID: [17782979](#)
56. Miyasaka H, Nakano S, Furukawa-Tanaka T. Food habit divergence between white-spotted charr and masu salmon in Japanese mountain streams: circumstantial evidence for competition. *Limnology.* 2003; 4(1):1–10.
57. Nakano S, Fausch KD, Kitano S. Flexible niche partitioning via a foraging mode shift: a proposed mechanism for coexistence in stream-dwelling charrs. *J Anim Ecol.* 1999; 68:1079–92.
58. Cucherousset J, Aymes JC, Santoul F, Céréghino R. Stable isotope evidence of trophic interactions between introduced brook trout *Salvelinus fontinalis* and native brown trout *Salmo trutta* in a mountain stream of south-west France. *J Fish Biol.* 2007; 71:210–23.
59. Schoener TW. Field experiments on interspecific competition. *Am Nat.* 1983; 122(2):240–85.
60. Race MS. Competitive displacement and predation between introduced and native mud snails. *Oecologia.* 1982; 54(3):337–47.
61. Holway DA. Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive argentine ant. *Ecology.* 1999; 80(1):238–51.
62. Kiesecker JM, Blaustein AR, Miller CL. Potential mechanisms underlying the displacement of native red-legged frogs by introduced bullfrogs. *Ecology.* 2001; 82(7):1964–70.
63. Piscart C, Rousset J-M, Dick JT, Grosbois G, Marmonier P. Effects of coexistence on habitat use and trophic ecology of interacting native and invasive amphipods. *Freshw Biol.* 2011; 56(2):325–34.
64. McNatty A, Abbott KL, Lester PJ. Invasive ants compete with and modify the trophic ecology of hermit crabs on tropical islands. *Oecologia.* 2009; 160(1):187–94. doi: [10.1007/s00442-009-1279-z](#) PMID: [19214589](#)
65. Post DM. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology.* 2002; 83(3):703.
66. Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A, Garcia J. Tadpole diet selection varies with the ecological context in predictable ways. *Basic Appl Ecol.* 2007; 8:464–74.
67. Jefferson DM, Hobson KA, Chivers DP. Time to feed: How diet, competition, and experience may influence feeding behaviour and cannibalism in wood frog tadpoles *Lithobates sylvaticus*. *Curr Zool.* 2014; 60(5):571–80.
68. Hobson KA, Alisauskasand RAYT, Clark RG. Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analyses of diet. *Condor.* 1993; 95:388–94.
69. Gaye-Siessegger J, Focken U, Muetzel S, Abel H, Becker K. Feeding level and individual metabolic rate affect $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in carp: implications for food web studies. *Oecologia.* 2004; 138(2):175–83. PMID: [14608500](#)
70. McCue MD, Pollock ED. Stable isotopes may provide evidence for starvation in reptiles. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008; 22(15):2307–14. doi: [10.1002/rcm.3615](#) PMID: [18613003](#)
71. Abbey-Lee RN, Gaiser EE, Trexler JC. Relative roles of dispersal dynamics and competition in determining the isotopic niche breadth of a wetland fish. *Freshw Biol.* 2013; 58:780–92. doi: [10.1016/j.anchoralbio.2013.01.007](#) PMID: [23711234](#)
72. Porter SD, Savignano DA. Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and disrupts arthropod community. *Ecology.* 1999; 71(6):2095–106.
73. Fausch KD, White RJ. Competition between brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and brown trout (*Salmo trutta*) for positions in a Michigan stream. *Can J Fish Aquat Sci.* 1981; 38(10):1220–7.
74. Moyle PB, Li HW, Barton BA. The Frankenstein effect: impact of introduced fishes on native fishes in North America. Stroud RH, editor, *Fish culture and fisheries management* American Fisheries Society, Bethesda, MD. 1986. p. 415–26.
75. Case TEDJ, Gilpin ME. Interference competition and niche theory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974; 71(8):3073–7. PMID: [4528606](#)
76. Harrington L, Harrington AL, Yamaguchi N, Thom MD, Ferreras P, Windham TR, et al. The impact of native competitors on an alien invasive: temporal niche shifts to avoid interspecific aggression? *Ecology.* 2009; 90(5):1207–16. PMID: [19537542](#)
77. Gómez-Rodríguez C, Díaz-Paniagua C, Bustamante J, Serrano L, Portheault A. Relative importance of dynamic and static environmental variables as predictors of amphibian diversity patterns. *Acta Oecologica.* 2010; 36(6):650–8.

78. Escoriza D, Boix D. Reproductive habitat selection in alien and native populations of the genus *Discoglossus*. *Acta Oecologica*. 2014; 59:97–103.
79. Wilbur HM, Alford RA. Priority effects in experimental pond communities: responses of *Hyla* to *Bufo* and *Rana*. *Ecology*. 1985; 66(4):1106–14.
80. Morin PJ, Lawler SP, Johnson EA. Ecology and breeding phenology of larval *Hyla andersonii*: the disadvantages of breeding late. *Ecology*. 1990; 71(4):1590–8.
81. Crossland MR, Alford R, Shine R. Impact of the invasive cane toad (*Bufo marinus*) on an Australian frog (*Opisthodon ornatus*) depends on minor variation in reproductive timing. *Oecologia*. 2009; 158(4):625–32. doi: [10.1007/s00442-008-1167-y](https://doi.org/10.1007/s00442-008-1167-y) PMID: [18853191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18853191/)
82. Knight CM, Parris MJ, Gutzke WHN. Influence of priority effects and pond location on invaded larval amphibian communities. *Biol Invasions*. 2009; 11:1033–44.
83. Olsson K, Stenroth P, Nyström P, Granéli W. Invasions and niche width: does niche width of an introduced crayfish differ from a native crayfish? *Freshw Biol*. 2009; 54:1731–40.
84. Ricciardi A, Rasmussen JB. Predicting the identity and impact of future biological invaders: a priority for aquatic resource management. *Can J Fish Aquat Sci*. 1998; 55(7):1759–65.
85. Romanuk TN, Zhou Y, Brose U, Berlow EL, Williams RJ, Martinez ND. Predicting invasion success in complex ecological networks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009; 364(1524):1743–54. doi: [10.1098/rstb.2008.0286](https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0286) PMID: [19451125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451125/)
86. Baiser B, Russell GJ, Lockwood JL. Connectance determines invasion success via trophic interactions in model food webs. *Oikos*. 2010; 119(12):1970–6.
87. Zhang W, Hendrix PF, Snyder B, Molina M, Li J, Rao X, et al. Dietary flexibility aids Asian earthworm invasion in North American forests. *Ecology*. 2010; 91(7):2070–9. PMID: [20715629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20715629/)
88. Futuyma DJ, Moreno G. The evolution of ecological specialization. *Annu Rev Ecol Syst*. 1988; 19:207–33.
89. Kassen R. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J Evol Biol*. 2002; 15(2):173–90.
90. Pujol-Buxó E, San Sebastián O, Garriga N, Llorente GA. How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators? *Oikos*. 2013; 122(1):19–29.
91. Gillespie JH. Application of stable isotope analysis to study temporal changes in foraging ecology in a highly endangered amphibian. *PLoS One*. 2013; 8(1):e53041. doi: [10.1007/s00442-012-2428-3](https://doi.org/10.1007/s00442-012-2428-3) PMID: [23341920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23341920/)
92. Marínez del Río C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev*. 2009; 84:91–111. doi: [10.1111/j.1469-185X.2008.00064.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00064.x) PMID: [19046398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19046398/)
93. Caut S, Angulo E, Díaz-Paniagua C, Gomez-Mestre I. Plastic changes in tadpole trophic ecology revealed by stable isotope analysis. *Oecologia*. 2013; 173(1):95–105. doi: [10.1007/s00442-012-2428-3](https://doi.org/10.1007/s00442-012-2428-3) PMID: [22915331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22915331/)
94. Bond AL, Diamond AW. Recent Bayesian stable-isotope mixing models are highly sensitive to variation in discrimination factors. *Ecol Appl*. 2011; 21(4):1017–23. PMID: [21774408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21774408/)
95. IUCN. IUCN red list of threatened species. Version 2010.3. Available: <http://www.iucnredlist.org>. 2010.
96. Müller-Schärer H, Schaffner U, Steinger T. Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends Ecol Evol*. 2004; 19(8):417–22. PMID: [16701299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16701299/)
97. Blossey B, Notzold R. Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *J Ecol*. 1995; 83(5):887–9.
98. Bøhn T, Sandlund OT, Amundsen P, Primicerio R. Rapidly changing life history during invasion. *Oikos*. 2004; 106:138–50.
99. Holt RD. On the evolutionary ecology of species' ranges. *Evol Ecol*. 2003; 159–78.
100. Scott DE. Effects of larval density in *Ambystoma opacum*: an experiment in large-scale field enclosures. *Ecology*. 1990; 71(1):296–306.
101. Wilbur HM. Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. *Ecology*. 1997; 78(8):2279.
102. Loman J. Intraspecific competition in tadpoles of *Rana avalis*: does it matter in nature? A field experiment. *Popul Ecol*. 2001; 43:253–63.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis doctoral ha aportado relevante información que profundiza y aumenta el conocimiento sobre la invasión de *Discoglossus pictus* existente hasta el momento. Asimismo facilita la comprensión de su potencial efecto sobre la comunidad nativa y permite predecir su alcance. El capítulo I propone obtener una visión aproximada de la capacidad invasora de la especie a macroescala a partir del estudio del nicho realizado y su variación en el espacio y el tiempo. Para profundizar en la conservación de nicho ello se ha analizado mediante técnicas de ordenación, cómo el nicho realizado de la especie introducida podría variar a medida que su rango de distribución iba incrementando. El modelado de nicho ecológico (MNE) se ha aplicado no sólo para evaluar el grado de idoneidad de las áreas colonizadas en cada periodo o el de determinados puntos (donde fue translocado o nuevamente introducido), sino también para entender el alcance y futuro de la expansión. En el capítulo II se han desarrollado dos diseños experimentales independientes que han evaluado la respuesta de la especie a dos de los principales factores ecológicos que delimitan el nicho reproductivo de las especies de anfibios en los ambientes acuáticos: la capacidad de responder al riesgo de desecación de los mismos, y a los depredadores que habitan estos ambientes. Por último en el capítulo III se ha llevado a cabo un análisis comparativo en laboratorio de la gestión de los recursos tróficos que permite el crecimiento y desarrollo de la especie introducida y otra nativa, cuyos resultados fueron testados en campo gracias a la aplicación del análisis de isótopos estables.

En resumen, en la presente tesis, con el objetivo de determinar las claves del éxito del sapillo pintojo mediterráneo *Discoglossus pictus* en el área de introducción, se han llevado a cabo diferentes tipos de estudios: desde análisis específicos de respuesta a las amenazas propias del nuevo ecosistema, evaluación de su habilidad en factores clave como la explotación de los recursos, o análisis con base comparativa que determinen la efectividad de cierto carácter de la especie introducida en relación a otro taxón nativo de la comunidad receptora. Se han analizado aquellos factores considerados más relevantes en el éxito de invasión de *D. pictus* para cada una de las diferentes escalas estudiadas: macroescala, mesoescala y microescala. La integración de las tres

dimensiones permite obtener una imagen global de cuáles son las claves de su establecimiento y expansión desde su introducción. El alcance de las preguntas planteadas no se limita únicamente al control y la gestión de la especie invasora estudiada, sino a cómo abordar el fenómeno de las especies invasoras a diferentes escalas para entender mejor su complejidad y poder desarrollar estrategias de gestión y conservación de los ecosistemas afectados, así como los procesos ecológicos y evolutivos que pueden tener lugar durante dicho proceso.

A continuación se discuten brevemente los resultados obtenidos en cada capítulo y se realiza un análisis integrado de los tres, así como se plantean las principales limitaciones de los trabajos y se proponen diferentes líneas de estudio futuro.

1. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a macroescala

Tal y como se indicara inicialmente (**Cuadro 1**) la definición básica de una especie invasora incluiría a todas aquellas especies introducidas que se han establecido y expandido con éxito. Analizar estas fases requiere, no sólo, de un estudio a macroescala del proceso de introducción, sino también un análisis temporal del proceso que permita apreciar y entender cómo tienen lugar cada una de diferentes fases. Durante la etapa de expansión, se hace evidente qué especies se convierten en invasoras y cuáles no, un proceso observable mediante el análisis temporal de sus datos de distribución. Se estima, que tan solo el 10% de todas las especies introducidas llegan a naturalizarse y de éstas, solo otro 10% consiguen convertirse en invasoras (Williamson & Fitter; *the tens rule*, 1996). Sin embargo, el estudio a macroescala del proceso de invasión permite no sólo determinar si se trata de especies invasoras sino profundizar en aquellas características que contribuyen a su capacidad de establecimiento y expansión así como determinar el alcance potencial y futuro de la invasión. Con la intención de entender la capacidad invasora de *D. pictus* en Europa se han analizado cuatro aspectos clave: la *capacidad de expansión*, la *plasticidad del nicho realizado*, y el *potencial rango de expansión en el presente y en el futuro*.

La *capacidad de expansión* ha sido estudiada a partir de la relación entre su tasa de expansión y la idoneidad del hábitat ocupado (denominado *habitat suitability* durante el capítulo). Se esperaría que una especie con baja *capacidad de expansión*, ralentizara su tasa conforme el hábitat ocupado presente condiciones menos idóneas o distantes a las

que conforman su nicho realizado en su zona de origen. En este caso, cabe esperar que su expansión se frene cuando la especie haya ocupado todo el hábitat adecuado o encuentre alguna barrera geográfica importante que imposibilice su avance. Por el contrario, si la especie presenta una alta *capacidad de expansión*, se esperará que su tasa de expansión no esté relacionada tan estrechamente con la idoneidad del hábitat. En el caso de *D. pictus* no se observó una correlación significativa entre ambos parámetros indicando una buena *capacidad de expansión* bajo este planteamiento. El análisis revela que a medida que la idoneidad del hábitat se hace cada vez menor, su tasa de expansión aumentaba. Sin embargo, cabe destacar, que el hábitat encontrado por *D. pictus* en su área de introducción tampoco obtuvo valores bajos de idoneidad, siendo las condiciones estudiadas muy similares a las de la zona de origen, pudiendo dicha similitud de hábitat, no ocasionar una resistencia suficiente para modificar la tasa de expansión. Probablemente otros factores que actúan a escalas menores como el régimen de precipitaciones locales o la presencia de una orografía desfavorable tengan un mayor efecto en su tasa de expansión que las condiciones ambientales incorporadas en el estudio.

Hasta el presente, el proceso de expansión temporal de *D. pictus* registró un patrón similar al de otras especies invasoras, con una velocidad inicial reducida (*lag-phase* inicial) seguida de un aumento exponencial posterior. Introducida a principios del siglo XIX, no es hasta a partir de la década de los 80, cuando *D. pictus* aumenta exponencialmente su tasa de expansión. Mientras los motivos del retraso inicial suele deberse al escaso tamaño poblacional en el momento de la introducción, así como a la dificultad de su detección durante las primeras etapas de expansión (Mack et al. 2000; Caswell et al. 2003), las causas de tasas mayores en el frente de expansión son debatidas en muchos trabajos (Travis & Dytham 2002; Phillips et al. 2006, 2008; Shine et al. 2011; Ellner & Schreiber 2012; Perkins et al. 2013). Así, se postulan diferentes teorías al respecto como la presión de la selección genética hacia los fenotipos más efectivos en el momento de la dispersión, las dinámicas poblacionales propias del proceso de expansión o una adaptación a las nuevas condiciones encontradas. La constatación de este patrón en la invasión de una especie genera múltiples cuestiones de gran interés en el estudio de la evolución de las especies.

Al analizar la potencial *plasticidad del nicho realizado* de *D. pictus*, se constató la conservación de nicho durante la invasión sugerida por Escoriza et al. (2014b). Este hecho, la similitud entre el hábitat de origen y el de introducción, suele estar asociado

a un posterior éxito de invasión en las especies introducidas (Peterson & Vieglais 2001; Roura-Pascual et al. 2004; Real et al. 2008), pues posiblemente les permite superar la fase inicial (lag-phase) cuando la población es reducida. También se detectó cierto grado de expansión de su nicho realizado hacia áreas con condiciones nuevas para la especie en las etapas más recientes de la expansión. Esta relativa plasticidad de nicho, no obtiene valores excesivamente elevados, sin embargo motiva trabajos adicionales que permitan clarificar el motivo real de esta expansión dada su elevada importancia en el estudio de la adaptación de las especies y las invasiones biológicas. En el caso de que se tratara de una expansión real descrita por la colonización de hábitats con condiciones que difieren al nicho realizado descrito por los datos disponibles, denotaría una elevada capacidad de la especie a ocupar o adaptarse a nuevos ambientes favoreciendo su invasión. Sin embargo, en este caso también podría derivarse de la ocupación de zonas sumidero o intermedias a la expansión, en las cuales no se asentarían poblaciones y por tanto no sería considerada una expansión real de su nicho fundamental. Por otra parte, en el caso de que esta expansión se encontrara dentro del nicho fundamental de la especie, estaría indicando que éste ha sido subestimado. La ausencia de registros suficientes que abarquen la totalidad de las condiciones ocupadas por la especie (tamaño muestral bajo o por la presencia de barreras geográficas, entre otros) o una selección de las variables sesgada podría causar esta subestima y una consecuente aparente expansión del nicho (Wendel, 1962; Callen & Miller, 2015). Para evitar estas desviaciones, suele recomendarse el desarrollo de estudios fisiológicos y ecológicos que permitan una aproximación más exacta al nicho fundamental de la especie (Kearney et al. 2009; Kearney & Porter 2009; Jiménez-Valverde et al. 2011). La presencia de plasticidad en el nicho realizado evidencia el carácter dinámico de estos procesos y la necesidad de mantener estudios de seguimiento a lo largo del tiempo. Asimismo es recomendable la actualización constante de las predicciones realizadas para especies en expansión (Franch et al, 2015).

Los modelos de distribución potencial de *D. pictus* en Europa han permitido estimar el alcance de su expansión potencial actual y futura. Se observó que la temperatura es el factor que más contribuye en la distribución de la especie. *D. pictus* seguiría su expansión principalmente por zonas costeras y áreas con temperaturas suaves y sin aridez extrema. En Europa encontraría áreas idóneas para su colonización, sin embargo la limitada velocidad de expansión propia de los anfibios no permitiría una expansión de elevado alcance sin la ayuda del factor humano que incremente su dispersión. Diferentes translocaciones o nuevas introducciones como se han registrado en el sur de

Francia y en el nordeste de España pueden ayudar a la especie a salvar grandes distancias y barreras orográficas, colonizando áreas que le conllevaría años alcanzar por sus propios medios. Hasta la fecha, todas las nuevas introducciones se han detectado dentro del área predicha como idónea para la especie, y su seguimiento han demostrado su efectividad a contribuir al aumento de su tasa de expansión. Actualmente la población situada en el Prat de Llobregat (41°17'15.71"N, 02°06'7.78"E) (Franch et al. 2007; Montori et al. 2007) se ha convertido en un nuevo foco de expansión que pudiera acelerar su expansión hacia el sur de su distribución actual en España. Previsiblemente los otros puntos pudieran convertirse también en nuevos focos aunque deberían desarrollarse estudios que añadieran otros factores como la fragmentación del hábitat que podría limitar la expansión a pesar de encontrar hábitats idóneos a macroescala derivados de factores climáticos. El factor humano pudiera, por tanto, ser clave en su futura expansión por áreas idóneas pero inconexas de Europa. Los modelos de predicción de futuro tuvieron en cuenta el cambio climático para esta área. En el área de distribución nativa, *D. pictus* se localiza principalmente en las zonas influenciadas por el clima mediterráneo. Su abundancia va disminuyendo conforme se acerca a zonas próximas al bioma desértico. Tal y como indican los modelos la temperatura es un factor importante en la presencia de la especie. Temperaturas extremas estarían limitando su distribución. Por tanto se espera que con la expansión del bioma desértico en el norte de África (derivado del cambio climático), la especie restrinja su distribución a las zonas más costeras en su rango original del Magreb africano. En España también podría sufrir una reducción de su distribución potencial, sin embargo se localizaría en las zonas del sur de la península que aún no ha conseguido colonizar y que probablemente no lo hiciera. Sin embargo, el calentamiento global, en Francia parece que aumentaría el número de áreas idóneas para la especie hacia el norte. En el resto de Europa también aumentarían estas zonas a medida que progrese el cambio climático. Teniendo en cuenta la capacidad de expansión de los anfibios, como dijera anteriormente, la colonización de estas áreas potenciales podría estar limitada a translocaciones favorecidas por la actividad humana. Es por tanto probable que *D. pictus* siga avanzando en un futuro. Por otro lado, los eventos de precipitación intensa también predichos junto con el calentamiento global podrían favorecer la expansión de la especie por dos razones: (1) la generación de puntos de agua efímeros que la especie explota y que podría facilitar la reproducción de los individuos colonizadores en zonas intermedias que permitiesen su dispersión por dichas zonas de transición hasta alcanzar zonas climáticamente más favorables, y (2) en las poblaciones de anfibios, grandes variaciones interanuales en los eventos

pluviométricos parece que favorecería a las especies oportunistas y con mayor plasticidad frente a las menos generalistas mucho más sensibles a los cambios dinámicos de las condiciones climáticas y los ambientes acuáticos de los que dependen. Diversos autores indican la preferencia de *D. pictus* por ambientes temporales y efímeros (Montori et al. 2007; Richter-Boix et al. 2012; Escoriza and Boix 2014). La reducción de determinados tipos de ambientes como los temporales de larga duración y la pérdida de calidad de los ambientes permanentes en las regiones mediterráneas podría provocar la desestructuración de la comunidad de anfibios (mesoescala), desplazando unas especies a otras en determinados ambientes, alterando la fenología de las especies y/o influyendo en la *fitness* de algunas de ellas. Ya se observaron indicios de desestructuración en la organización de las especies nativas de anfibios en áreas ocupadas por la introducción de *D. pictus* (Richter-Boix et al. 2012; Bucciarelli et al. 2014), por lo que la situación pudiera agravarse si se añade la reducción del hábitat reproductivo y su calidad, derivado del cambio climático.

2. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a mesoescala

La desecación y la presencia de depredadores son factores esenciales a la hora de entender la estructuración de las comunidades de anfibios en el gradiente de sistemas acuáticos en función del hidropериodo (desde charcas efímeras sin apenas depredadores a charcas permanentes con grandes depredadores como peces). Una respuesta más o menos efectiva a cada factor puede explicar la distribución de los anfibios en este gradiente de ambientes mediterráneos y su éxito en el hábitat seleccionado. Para determinar la capacidad invasora de *D. pictus* a mesoescala, se han analizado los efectos de estos factores sobre la especie.

Para analizar la **respuesta a la desecación** de *D. pictus*, se reconstruyeron diferentes escenarios potenciales del medio natural en el que se modificó la disponibilidad de alimento. De esta forma se exploró la respuesta a la desecación y se evaluaron los costes asociados a esta respuesta. En condiciones naturales las charcas efímeras sufren periodos de desecación intensa durante los cuales la disponibilidad de alimento se reduce. En ocasiones se produce la total desecación del sistema mientras que en otras, precipitaciones esporádicas permiten recuperar su volumen inicial. Por ello se analizó la respuesta de *D. pictus* a la desecación total del sistema a velocidad rápida y lenta y a desecación variable en interacción con condiciones de alimentación *ad libitum* y

restringida. *D. pictus* presentó una respuesta eficaz a la desecación del sistema en todos los tratamientos, acelerando su desarrollo para escapar del ambiente, sin embargo ésta se encontró limitada a la disponibilidad de alimento. La supervivencia fue total en todos los tratamientos salvo en los de desecación rápida, y especialmente en aquellos con condiciones de restricción de alimento. *D. pictus* reguló su tiempo de desarrollo en función del nivel de estrés del estímulo (velocidad de desecación) y la disponibilidad de alimentos. En tratamientos de desecación rápida y *ad libitum* fue capaz de acortar su desarrollo y aumentar su tasa de crecimiento registrando tamaños y pesos de metamórficos similares al tratamiento con una cantidad de agua permanente. Bajo condiciones de alimento restrictivas consiguió reducir el tiempo de desarrollo pero a costa de metamórficos más pequeños. Así también en desecaciones lentas, el tiempo de desarrollo fue extendido pero con tamaños de metamórficos similares a los del control, salvo en restricción de alimento que también fueron menores. Ante periodos de desecación las larvas de anfibios parecen invertir sus reservas en la aceleración del desarrollo (Kulkarni et al. 2011). El tratamiento de desecación variable por su parte, supuso un estrés en las larvas de *D. pictus* que no consiguieron revertir la aceleración de su desarrollo y llegaron a la metamorfosis con tamaños menores en restricción de alimento y mayores en *ad libitum*. Las diferencias observadas en los tamaños metamórficos pueden considerarse como costes propios de la plasticidad fenotípica en respuesta a acelerar el desarrollo, puesto que el tamaño de los metamórficos puede determinar el éxito reproductivo de los futuros adultos. Así mismo, tamaños pequeños puede llegar a reducir su supervivencia antes de la madurez (Newman & Dunham, 1994; Goater, 1994), resultar en menores tamaños de adultos (Smith, 1987) o en un menor tamaño de las puestas (Wilbur, 1977; Berven, 1981), entre otros. Es por tanto claro que en especies invasoras de anfibios (especialmente las que ocupan ambientes efímeros y temporales) la gestión de los recursos tiene un papel clave en el éxito de la invasión. Durante los eventos de desecación del sistema, la calidad y cantidad de los recursos tróficos puede verse reducida (Babbitt et al., 2000). En estas condiciones la alteración en la selección de dieta hacia recursos de mayor calidad puede mejorar el crecimiento y desarrollo larvario de los anfibios (Kupferberg, 1997; Morey & Reznick, 2000; Lind & Johansson, 2007). En particular, el canibalismo podría ser una fuente de recursos de calidad que asegurara la supervivencia y mejor desarrollo de los individuos (Fox, 1975; Jefferson et al., 2014). Bajo condiciones extremas y en ecosistemas con escasos recursos la depredación sobre la misma u otras especies puede ser una opción potencial en el éxito de *D. pictus*. Recientemente se han constatado indicios de canibalismo intraespecífico en el área nativa (Licata et al., 2015) e incluso de

depredación de larvas de *D. pictus* sobre puestas de *B. calamita* en el área de introducción (obs. personal). Estos eventos promueven diferentes estudios que permitan detectar este tipo de conductas en el área nativa y que avanzarían en el estudio del impacto potencial de la especie.

Para determinar la capacidad invasora de *D. pictus* a mesoescala, se analizó la **respuesta de *D. pictus* a depredadores potenciales** del área de introducción y se examinó si la plasticidad de la respuesta antidepredatoria está relacionada con el tiempo de co-ocurrencia larva-depredador. Para el análisis de la respuesta conductual y morfológica se escogieron tres depredadores potenciales de los ambientes mediterráneos con diferentes tiempo de residencia en el área, una especie nativa de odonato *Anax* sp. y dos introducidas, la gambusia *Gambusia holbrooki* (cuya primera cita en el área de invasión data del 1921 y reconocida como especie común a partir de Elvira, 2001) y el cangrejo rojo americano *Procambarus clarkii* (que data de los 70-80 y reconocida como especie común a partir de 1990 (Gutiérrez-Yurrita et al., 1998; Ackefors, 1999). Asimismo se examinó la respuesta de la especie nativa *P. punctatus* a los mismos depredadores. La especie invasora a pesar de responder a la presencia de depredadores del rango introducido, presentó menor plasticidad fenotípica que la especie nativa, exceptuando el caso de *Anax* sp. Tal y como indica Richter-Boix et al. (2007a), *P. punctatus* es una especie con elevada plasticidad fenotípica. Si bien cada especie responde de diferente forma a los diversos depredadores, parece que el tiempo de co-existencia entre larva-depredador podría ser clave en el desarrollo de las diferentes respuestas (Agrawal, 2001). *D. pictus* presentó una respuesta similar a todos los depredadores y más limitada a la presentada por *P. punctatus*. Ambas especies respondieron conductual y morfológicamente a la presencia del depredador nativo (larvas de *Anax* sp.). *D. pictus* responde generando crestas más altas y una respuesta conductual más pronunciada ante las larvas de *Anax* que ante los otros potenciales depredadores. Esta respuesta podría explicarse porque en el norte de Argelia *D. pictus* convive con larvas de odonato de la misma familia que *Anax* sp. (Aguilar & Dommange, 1998). También parece que la especie nativa fue capaz de regular su respuesta en función del tipo de ataque del depredador. Ante depredadores rápidos y letales (como *G. holbrooki*), *P. punctatus* realizó una disminución marcada de la actividad que dificultaría su detección mientras que para depredadores de búsqueda activa y más lentos como *P. clarkii* desarrolló crestas más altas que permitieran escapar al individuo de las pinzas al ser capturado por la cola. La similitud en la leve respuesta de *D. pictus* ante los dos depredadores alóctonos podría responder a un reconocimiento de los

mismos pero no llegaría a desarrollar respuestas específicas a los mismos. A pesar de que en el área de estudio el tiempo de coexistencia anuro versus depredador alóctono pueda ser similar entre las dos especies de anuro, la selección de hábitats más restringida hacia los sistemas efímeros de *D. pictus* en el área invadida podría limitar el tiempo de coexistencia real entre ambos (Montori et al., 2007). En este caso, las señales derivadas del consumo de larvas de la misma especie podría ser un factor fundamental que provocara la respuesta conductual de *D. pictus*, como ya se ha documentado para otras especies (incluidas especies del género *Discoglossus*) (Ferrari et al., 2010; Almeida et al., 2011; Nunes et al., 2013). La leve respuesta de *D. pictus* sin embargo podría deberse también a un componente filogenético propio de todo el género que tiende a utilizar hábitats efímeros, ocupando en menor medida hábitats utilizados por cangrejos o peces. Se han observado similitudes en esta respuesta de *D. pictus* con la de otras especies de su mismo género y nativas del área de introducción (Almeida et al., 2011). Debe tenerse en cuenta que los resultados de este estudio no permiten confirmar la relación entre la respuesta y el tiempo de coexistencia presa-depredador, únicamente analizar si existe o no respuesta. Cabe considerar que no necesariamente todas las respuestas ante diferentes depredadores son iguales (Richter-Boix et al. 2007a). Para determinar un posible componente evolutivo de la respuesta antidepredatoria serían necesarios trabajos adicionales que comparasen la respuesta del anfibio invasor en su área nativa ante las diferentes especies de larvas de odonatos, estudios de un mayor número de especies de depredadores potenciales que aumentarían el número de réplicas o un análisis de la respuesta a estos mismos depredadores por parte de especies nativas de *Discoglossus* de la Península Ibérica.

Habitualmente la respuesta antidepredatoria conlleva un coste. Las larvas de *P. punctatus* presentaron diferentes costes en función del depredador y su respuesta. Al ser menor la respuesta plástica observada ante los depredadores introducidos, sus costes asociados también resultaron ser menores. Se observó una mayor tasa de mortalidad, tiempo de reabsorción de cola y reducción de la actividad ante el depredador nativo, mientras que los valores disminuyeron hasta obtener los menores ante el cangrejo rojo americano cuya introducción fue considerada como la más reciente. Los costes observados en los metamórficos fueron diversos para cada depredador, vinculados probablemente a la diferente inversión requerida en cada respuesta e impulsada por cada historia evolutiva presa-depredador. Mientras en la especie nativa los costes asociados fueron evidentes y en incremento conforme el tiempo de co-existencia aumentaba, en *D. pictus* lo fueron menos. El balance entre una

respuesta poco efectiva que aumente la supervivencia y un coste asociado más bajo sería lógico en este caso. La menor respuesta de *D. pictus* a los depredadores comparada con la especie nativa, puede conllevar por un lado un menor coste asociado a la presencia de depredadores en detrimento de la efectividad en la respuesta o supervivencia en condiciones naturales. La ausencia de respuesta en especies invasoras que no reconocen el depredador puede llegar a ser una ventaja en especies que ocupan ambientes con escasa densidad de los mismos, como es el caso de *D. pictus*. Esta especie ocupa ambientes efímeros en los que podría encontrar menor presión por depredación y el no desarrollo de una respuesta eficaz con sus costes asociados, podría permitirle invertir en otros aspectos como crecimientos rápidos. Por ejemplo, la actividad está asociada con un mayor consumo de nutrientes y por tanto mayor tamaño de metamórficos pero sin embargo, es contraproducente frente a potenciales depredadores (Dayton & Fitzgerald, 2001). Sin embargo el balance coste-beneficio de una respuesta eficaz frente al depredador es difícilmente evaluable ya que los estudios de contacto directo presa-depredador en laboratorio son escasamente viables y aquellos desarrollados en campo difícilmente evaluables (Cruz & Rebelo, 2005).

El sapillo pintojo meridional habitualmente ocupa ambientes efímeros, tanto en su área de distribución nativa como en la invadida (Escoriza & Boix 2014a). Su respuesta al principal factor de amenaza de estos sistemas (la desecación) parece muy efectiva. En cambio, ante los depredadores del área de introducción presenta respuestas menos pronunciadas que podrían limitar su éxito en ambientes con mayor densidad de depredadores. Teniendo en cuenta la selección de hábitat de *D. pictus*, su respuesta ante depredadores asociados a ambientes de hidroperiodos largos como la gambusia no sería esencial, y sí ante depredadores como larvas de odonatos que ocupan más frecuentemente ambientes temporales donde podrían coexistir. Ante estos últimos presenta una respuesta aparentemente efectiva con costes asociados menores a los observados en *P. punctatus*. En resumen, los resultados obtenidos parecen explicar por qué la capacidad invasora de *D. pictus* en regiones con abundantes ambientes efímeros es elevada, dada su gran capacidad plástica para explotar dichos ambientes. Sin embargo en regiones donde dichos ambientes fuesen escasos y la especie se viera obligada a reproducir en lagos permanentes con presencia de grandes depredadores, se esperaría que tuviese mayores problemas para seguir expandiéndose dada la baja capacidad de respuesta ante este tipo de depredadores.

3. Capacidad invasora de *Discoglossus pictus* a microescala

La capacidad invasora de una especie a microescala viene determinada por aquellas habilidades que favorecen su éxito reproductivo y su encaje en la comunidad nativa. En el caso de los anfibios han de tenerse en cuenta las características del hábitat reproductivo seleccionado y el solapamiento con las especies nativas. Como se apuntaba anteriormente, *D. pictus* ocupa mayoritariamente sistemas efímeros, frecuentemente compartidos con la especie nativa *Bufo calamita* y *Pelodytes punctatus* (Montori et al., 2007; Richter-Boix et al., 2012). En este tipo de ambientes, la desecación es el factor con mayor contribución en la mortalidad larvaria en anfibios (Calef, 1973). Un buen uso de los recursos es primordial para el desarrollo, crecimiento y supervivencia larvaria en estos ambientes, factores todos ellos que determinan a largo plazo el éxito reproductivo de estas especies (Berven, 1981; Smith, 1987). Para analizar la gestión de los recursos tróficos a nivel larvario en condiciones controladas se comparó la actividad y preferencia de dieta de la especie introducida y la nativa, *B. calamita*, en co-ocurrencia y no ocurrencia. Además se complementó con un análisis de la jerarquización trófica de ambas especies en campo tanto en charcas compartidas como en no compartidas mediante la aplicación del análisis de isótopos estables.

El análisis de la actividad y preferencia de dieta de ambas especies por separado mostró una estrategia trófica en pro de crecimientos rápidos y mayores tamaños de metamórficos por parte de la especie exótica. Esta estrategia se basó en la selección de dieta con preferencia por los recursos de mayor calidad proteica y la capacidad de regular la actividad en función del tipo de dieta disponible. *D. pictus* aumentó su tasa de actividad trófica cuando disponía únicamente de alimentos con bajo contenido proteico. Este aumento de la cantidad de alimento consumido podría compensar los efectos de una dieta menos proteica ya que la cantidad de alimento tiene un efecto similar al de la calidad en el desarrollo larvario de los anfibios (Kupferberg, 1997; Morey & Reznick, 2000; Lind & Johansson, 2007). La especie nativa por su parte no presentó preferencia en el tipo de dieta, ni un cambio en la actividad en función de la calidad de la misma. El efecto de la calidad de la dieta en el desarrollo larvario de *B. calamita* y especies cercanas a esta última como *D. galganoi*, ha sido descrito en diferentes trabajos (Griffiths et al., 1993; Álvarez & Nicieza, 2002; Martins et al., 2013), así como en otras especies (Kupferberg, 1997; Tejedo et al, 2000). La selección de la dieta de mayor contenido proteico permite acelerar el desarrollo larvario, el cual posibilita la reducción del riesgo de mortalidad larvaria por desecación. A pesar de que algunas

especies no responden de la misma forma (Richter-Boix et al., 2007d), en *B. calamita* y *D. pictus* se ha observado que la calidad de alimento ingerido provocaba no sólo el acortamiento del desarrollo larvario, sino también un aumento del tamaño. El tamaño larvario suele estar relacionado con el de los metamórficos, los cuales presentan mayor capacidad de escape frente a depredadores y una mayor resistencia a parásitos y condiciones de deshidratación (Howard, 1980; Smith, 1987; Newman & Dunham, 1994). Además, existe una relación del tamaño de los metamórficos de anuros con el de los adultos, los cuales presentan mejores aptitudes frente a la reproducción (fecundidad, selección del macho de mayor tamaño o canto, mayor tamaño de puestas, entre otras) (Berven, 1981; Berven & Gill, 1983; Smith, 1987; Halliday & Tejedo, 1995). Es evidente por tanto, la importante contribución que puede suponer una correcta gestión de los recursos alimenticios para el éxito de las especies introducidas.

En condiciones de co-ocurrencia la especie exótica siguió un patrón similar, seleccionando dietas de alto contenido proteico frente a la no selección por parte de la especie nativa tanto en baja como en alta densidad. Sin embargo, los resultados de la tasa de actividad trófica por parte de ambas especies sugirieron la presencia de interacciones competitivas y un posible desplazamiento de la especie nativa a los recursos menos utilizados. El aumento de la densidad incrementó la actividad de ambas debido a un mayor número de interacciones y la especie nativa presentó cambios en la explotación de los recursos. A baja densidad la tasa de actividad de *B. calamita* en los recursos de alto contenido proteico fue mayor, mientras que ésta sufrió un aumento en los de bajo en condiciones de alta densidad. La explotación de recursos de alto contenido proteico en ocasiones no corresponde a una estrategia trófica asociada a la especie, sino a un comportamiento determinado bajo factores de estrés como la desecación o la competencia (Richter-Boix et al., 2007d). Especies como *D. pictus* y *B. calamita* adaptadas a ambientes de hidroperiodos variables presentan una buena respuesta a la desecación, acelerando su desarrollo en condiciones de estrés (Richter-Boix, 2005; Enriquez-Urzelai et al., 2013). Sin embargo, esta capacidad se pierde cuando los recursos son escasos, como ya se comprobó en el apartado anterior (Enríquez-Urzelai et al., 2013). En presencia de competidores superiores y en condiciones de hacinamiento, los individuos incapaces de consumir la cantidad necesaria de energía tendrán un peor rendimiento frente a condiciones de secado de los ambientes acuáticos que habitan. Para especies que ocupan ambientes efímeros con alta densidad larvaria, la limitación de los recursos es una posibilidad real que puede afectar a la supervivencia de las mismas. Especies más activas, como *D. pictus* frente a *B. calamita* en este caso,

puede tener una ventaja competitiva frente a las menos activas a la hora de la explotación de los recursos disponibles (Dayton & Fitzgerald, 2001). La mayor capacidad competitiva en las especies exóticas frente a las nativas se relaciona frecuentemente con su éxito de invasión (Holway & Suarez, 1999), a pesar de no ser un rasgo esencial para algunas de ellas (Vilà et al., 2003). En concreto, la mayor competitividad en la explotación de recursos por parte de algunas especies invasoras ha llegado incluso a desplazar o reemplazar a las especies nativas (como el caso de la hormiga argentina (*Linepithema humile*) o el gecko casero común (*Hemidactylus frenatus*) (Human & Gordon, 1996; Petren & Case, 1996; Holway, 1999). Al igual que otras especies de anuros introducidos (Kupferberg, 1996; Crossland, 1997; Kaiser, 1997; Smith, 2005), *D. pictus* podría tener un efecto negativo sobre la fase larvaria de la especie nativa, *B. calamita*, pudiendo llegar a afectar a su supervivencia en condiciones desfavorables (estrés hídrico o ausencia de recursos, entre otros) (Richter-Boix et al., 2012).

Sin embargo *D. pictus* y *B. calamita* parecen coexistir en las regiones de actual co-ocurrencia. En ocasiones los trabajos realizados en campo, explican resultados magnificados por condiciones restringidas en laboratorio (Scott, 1990; Loman, 2001). Por ello, para determinar su coexistencia a nivel trófico en condiciones naturales se analizó la jerarquización trófica de ambas especies en campo en condiciones de co-ocurrencia y de no ocurrencia. Los estudios de dieta en anfibios tradicionalmente se han basado en el análisis de los contenidos estomacales (Díaz-Paniagua, 1989; Crnobrnja-Isailović et al., 2012), una técnica con importantes limitaciones. Mientras que el análisis de contenidos estomacales aporta una visión instantánea de la alimentación de un organismo, el análisis de isótopos estables proporciona una retrospectiva histórica de la dieta consumida (Gearing, 1991). Para el análisis de la jerarquización trófica se optó por emplear la técnica de isótopos estables (Peterson & Fry, 1987; Jackson et al., 2012; Layman et al., 2012; Perkins et al., 2014), una técnica ampliamente utilizada en otros taxones, pero menos aplicada en los anfibios (por ejemplo Schiesari, 2006; Araújo et al., 2009; Schiesari et al., 2009; Gillespie, 2013; Caut et al., 2013) y que ha permitido corroborar algunos de los resultados obtenidos en laboratorio, demostrando su utilidad y ventajas en el estudio de las comunidades de anfibios.

A partir de los resultados obtenidos de los isótopos estables se ha observado que en charcas de no ocurrencia ambas especies parecen explotar similar tipología de recursos, sin embargo cuando comparten hábitat se ha apreciado una segregación completa del nicho trófico explotado entre la especie nativa y la introducida. La segregación o

partición de nicho es una organización de las comunidades motivada por interacciones competitivas en las que cada especie explota una parte del nicho diferente. Siguiendo esta hipótesis dos especies con elevada similitud en un aspecto (la dieta en este caso) no podrían coexistir a no ser que se dé una segregación del nicho entre ambas. Ross (1986) realizó una revisión bibliográfica sobre el encaje de las diferentes especies de peces entre ellas. Observó que la mayor parte de la partición de nicho entre especies se daba en la dimensión espacial y trófica, y de forma mucho menor en la temporal, limitándose esta última a las especies con historia evolutiva común mayoritariamente. *D. pictus* y *B. calamita* podrían presentar segregación en el nicho trófico derivado de la potencial interferencia entre ambas especies cuando ambas conviven. Trabajos anteriores ya indicaban la similitud en la dieta de ambas especies durante la fase larvaria que podría motivar dichas interacciones (Escoriza & Boix 2012). En este caso, la partición de nicho trófico entre la especie nativa y la introducida, podría minimizar la interacción entre ambas pero conllevaría efectos sobre aquella especie recluida a los recursos de menor calidad (Kupferberg, 1997). La potencial superioridad competitiva observada en el diseño experimental parece estar respaldada por los resultados obtenidos en campo. *D. pictus* siempre ocupó niveles jerárquicos ligeramente superiores en charcas compartidas con *B. calamita*, lo cual suele asociarse a la explotación de recursos de mayor calidad. Por otro lado, se observó un aumento en la variabilidad de nicho ocupado por la especie nativa en presencia de la exótica, apoyando la hipótesis de un potencial desplazamiento de *B. calamita* frente a *D. pictus*. Por último, el ancho de nicho trófico está relacionado con la capacidad de explotación de diferentes recursos por parte de una especie. En el caso de la nativa se observó un aumento significativo del mismo en presencia de la especie exótica, denotando un cambio en su dieta o una búsqueda de otros recursos. Sin embargo, el ancho de nicho de *D. pictus* siempre fue mayor al de *B. calamita* tanto en ocurrencia como en no ocurrencia, lo cual podría indicar cierto generalismo u oportunismo de dieta en comparación con la anterior. El generalismo de dieta es un carácter también asociado a la capacidad invasora de las especies, ya que facilita la colonización de diferentes ambientes (Ricciardi & Rasmussen, 1998; Romanuk et al., 2009; Zhang et al., 2010; Baiser et al., 2010). No se puede concluir si *D. pictus* es una especie generalista con el diseño de este trabajo sin embargo sí se deduce que emplea mayor variabilidad de recursos que la especie nativa. El desarrollo de nuevos estudios con otras especies y condiciones permitirían concluir si la especie sigue o no una dieta generalista.

Así, la gestión efectiva de los recursos por parte de *D. pictus* contribuye al éxito de la especie en los ambientes acuáticos efímeros y por tanto, a su capacidad invasora al explotar de forma efectiva unos ambientes poco utilizados por la mayor parte de la comunidad de anuros nativos. En otras especies invasoras, estrategias tróficas que favorecen reproducciones numerosas y rápidas sin costes notables se han considerado aspectos clave en su capacidad invasora (Bøhn et al., 2004). Por otra parte, la mayor capacidad de explotación de los recursos observada por el sapillo pintojo mediterráneo, puede afectar al mayor o menor éxito de *B. calamita* en situaciones de estrés, con posibles grandes fluctuaciones en la dinámica de las poblaciones en función de las condiciones ambientales y climáticas del año. Seguimientos específicos al respecto en las áreas donde cohabitan serían importantes a la hora de determinar si podría existir un efecto notable en estas poblaciones y aún más importante que pudiera prever un efecto sobre poblaciones con problemas de conservación en áreas aún no colonizadas por *D. pictus*.

4. Consideraciones generales de la capacidad invasora de *Discoglossus pictus* en el área de introducción

A partir de los resultados obtenidos con el estudio a macro, meso y microescala, se puede considerar que *Discoglossus pictus*, además de los factores previamente conocidos para la especie (múltiples reproducciones anuales, reproducción explosiva, entre otros), podría atribuirse parte de su éxito y capacidad de invasión a los siguientes caracteres o condiciones analizados en la presente tesis: existencia de **condiciones ambientales favorables** a su establecimiento y expansión en el área de introducción (conservación de nicho o *climate matching*), , la **selección del hábitat de reproducción y desarrollo larvario**, con preferencia por los ambientes efímeros, en los cuales parte de su éxito se debe a su plasticidad fenotípica que asegura una **respuesta eficaz** al riesgo de desecación, así como de disponer de una **estrategia trófica** en pro de desarrollos y crecimiento elevados (selección de dieta y regulación de la tasa de actividad) que le permiten explotar los hábitats efímeros y temporales..

El estudio llevado a cabo a tres escalas ha permitido obtener una visión global de la capacidad invasora de la especie, entendiendo mejor su éxito de invasión en el área introducida y su potencial impacto sobre la comunidad de anfibios nativos presentes en la zona de introducción. A pesar de la importancia de otros factores en el éxito de

introducción y expansión de una especie alóctona, como la historia de introducción o caracteres propios de la especie como la dieta o la fecundidad, la conservación de nicho entre el rango nativo y el introducido parece ser el factor con mayor peso en el éxito de la mayoría de las invasiones estudiadas. Mahoney y coautores (2015) evaluaron tres grupos de predictores del éxito de algunas especies de reptiles introducidas en función de la escala de trabajo: historia de la introducción, conservación del nicho y caracteres reproductivos y de dieta. La conservación del nicho destacó como el factor con mayor capacidad predictiva de invasión. Jeschke & Strayer (2006) también trataron de aproximarse a qué factores determinan el éxito de introducción de diferentes vertebrados. En este caso analizaron aspectos de la historia de las introducciones, la asociación a la actividad humana y 17 caracteres poblacionales e individuales como la dieta, el tamaño poblacional y caracteres reproductivos, entre otros. En este caso, los aspectos relativos a la historia de introducción y la asociación a la actividad humana explicaban mejor el éxito de los vertebrados estudiados. Es indudable, por tanto, la importancia de los trabajos a macroescala para predecir de forma general el establecimiento y expansión de una especie introducida. Por otro lado los análisis a meso y microescala explicarían el éxito de las especies invasoras en las comunidades receptoras y su potencial impacto e interacción con las nativas. Este enfoque favorece la detección de potenciales efectos directos e indirectos o en cadena que incrementan el conocimiento sobre la organización de las comunidades. Así pues, la integración de diferentes escalas en el estudio de las invasiones biológicas parece fundamental para llegar a entender correctamente el alcance y éxito de las invasiones, permitiendo así aplicar estrategias de control más efectivas basadas en dicho conocimiento (Mack, 2000; Pauchard et al, 2003). A pesar de que la mayor parte de los trabajos se focalizan en una única escala de estudios, algunos autores ya destacan la importancia de explorar factores a diferentes niveles para una correcta comprensión (Stohlgren et al. 1999; Sax & Gaines 2003; Pauchard & Shea, 2006; Talluto et al, 2016).

D. pictus presenta *conservación de nicho* así como una buena aptitud de colonización en el área de introducción. Tanto el patrón de expansión seguido por la especie como los mapas predictivos generados indican una continuidad de la expansión en un futuro próximo. Su velocidad de expansión parece ser menor que el de otras especies invasoras, pero posiblemente responde a la limitada capacidad de dispersión general propia de los anfibios. Sin embargo, se prevé un aumento de su expansión en un futuro colonizando ambientes con temperaturas suaves y niveles moderados de precipitación. El cambio climático, si bien puede restringir su rango de distribución en su área nativa,

no parece que represente un problema para su expansión en la región introducida donde encontrará nuevas zonas con condiciones muy similares a las que en la actualidad se observan en el área nativa. El calentamiento global podrá desplazar en parte su expansión hacia climas más templados, resultando en un incremento de áreas de mayor viabilidad en la zona de introducción que en la propia zona nativa, actualmente restringida por barreras geográficas infranqueables como el mar Mediterráneo al norte y el desierto del Sahara al sur. Dada la naturaleza dinámica de las invasiones biológicas se recomienda la actualización y un seguimiento constante de su proceso invasivo para detectar y anticiparse a los cambios en sus tasas de expansión.

El sapillo pintojo mediterráneo es una especie oportunista con una elevada capacidad de colonización de nuevos ambientes efímeros y temporales (ver también San Sebastián, 2007; Ruhí et al., 2012). En este tipo de sistemas parece presentar respuestas efectivas a las amenazas, con menores costes que las especies nativas con las que cohabita y a las que podría llegar a afectar y desplazar por una mayor capacidad de explotación de los recursos. La importancia de la capacidad de explotación de los recursos en estos ambientes es crucial para el éxito reproductivo de los anfibios. La presencia de multitud de ambientes temporales y efímeros en su área de invasión actual podría haber fomentado su expansión hasta el momento por lo que sería recomendable analizar la progresión de su tasa de colonización cuando alcance zonas más áridas hacia el sur ibérico, donde dichos ambientes oportunistas sean menos frecuentes. En estos sistemas su respuesta a la desecación es muy eficaz como se ha podido observar en los estudios a mesoescala. Sin embargo cabe considerar que la respuesta plástica se encuentra limitada a la disponibilidad de recursos tróficos, por lo cual es importante comprender como la especie gestiona los recursos en condiciones ambientales diferentes. El estudio a microescala indica que la especie es capaz de explotar y seleccionar los recursos disponibles en pro de crecimientos y desarrollos rápidos con escasos costes por ello, un carácter esencial que podría explicar el éxito reproductivo de la especie en dichos ambientes inestables. Este tipo de estrategia trófica ha sido considerado un aspecto clave en la capacidad invasora de otras especies (Bøhn et al., 2004; Marchetti et al., 2004; Rehage et al., 2005).

Los caracteres observados en *D. pictus* han sido repetidamente citados en otras especies invasoras y se han señalado como esenciales a la hora de explicar su éxito en sus respectivas áreas de introducción (Melgoza & Nowak, 1991; Holway & Suarez, 1999; Lach et al., 2000; Rehage et al., 2005; Liu & Stiling, 2006; Dang et al., 2009; Weis, 2010;

Bucciarelli et al., 2014). Coinciden por ejemplo con los rasgos asociados a la capacidad invasora de algunos anfibios como *X. laevis* (McCoid & Fritts, 1993; Lillo et al., 2011). El éxito de esta especie (*X. laevis*) en el Sur de California parece basarse en tres estrategias clave: la reproductiva, la trófica y la de una respuesta eficaz a los depredadores potenciales. Una reproducción prolongada en el tiempo, el canibalismo y una respuesta efectiva a determinados depredadores o la ocupación de ambientes con escasez de ellos permiten a esta especie aumentar su éxito de colonización. *D. pictus* por su parte presenta caracteres adicionales a los analizados en este trabajo que coinciden con ésta, y otras especies invasoras, y que deben tenerse en cuenta a la hora de evaluar su capacidad invasora. *D. pictus* sigue una **estrategia reproductiva** tipo R, caracterizada principalmente por puestas numerosas y crecimientos rápidos (Martínez-Solano, 2009), así como por ser una especie oportunista con alta capacidad de colonización y adaptación. Como en otras especies consideradas buenas colonizadoras (Ehrlich, 1989), esta estrategia permite una elevada tasa de reemplazo generacional y aumenta la probabilidad de supervivencia ante la depredación o como recurso potencial en situaciones extremas (canibalismo). Favorece el mantenimiento de la heterozigosis muchas veces mermada por cuellos de botella que constituye el reducido número inicial de individuos frecuentes en las introducciones biológicas, así como la aparición de potenciales adaptaciones al nuevo sistema (Sakai et al., 2001; Barrett & Richardson, 1986; Nei et al., 1975). Las especies oportunistas de reproducciones rápidas y desarrollos cortos suelen relacionarse con una baja capacidad competitiva frente a otras especies ocupando nichos vacíos o poco explotados. En el grupo de los anfibios, los ambientes efímeros son los que menor riqueza específica presentan y se encuentra ocupado principalmente por especies con escasa capacidad competitiva como *B. calamita* o *P. punctatus* (Richter-Boix et al., 2007b). Las especies con una baja capacidad competitiva se ven así forzados a explotar un espacio de nicho no ocupado por los competidores superiores (Wu & Levin, 1994), nichos que frecuentemente suelen ocupar también las especies introducidas, pudiendo así competir con las especies nativas poco competidoras por dichos ambientes. En este tipo de ambientes, una mayor tasa de explotación de los recursos puede definir el éxito de una especie en detrimento de otra y por tanto definir su capacidad competitiva (Morin, 1983). Tanto los resultados obtenidos en esta tesis doctoral como trabajos previos (Montori et al., 2007; Richter-Boix et al., 2012), indican una **superior capacidad competitiva** de la especie introducida sobre *B. calamita* en estos ambientes. Por otro lado, estudios previos indicaron una **alta capacidad de colonización de nuevos ambientes** junto a *B. calamita* (San Sebastián, 2007; Ruhí et al., 2012) complementando los resultados, que indican una alta capacidad

de expansión . Otros aspectos como la presencia de **especies filogenéticamente cercanas** en el área de introducción también ha sido relacionado por algunos autores con el éxito de invasión. En el caso de *D. pictus*, pueden encontrarse dos subespecies del género *Discoglossus* en la península ibérica (*D. g. galganoi* y *D. g. jeanneae*), con las que presenta importantes similitudes morfológicas y en la preferencia del hábitat reproductivo, entre otras. La integración de estos aspectos junto con los estudios realizados en esta tesis doctoral preverían una elevada capacidad invasora en el área de introducción.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral permiten también dar un paso más en el conocimiento sobre el efecto de *D. pictus* sobre la comunidad nativa. A pesar de que el trabajo presentado no tiene como objetivo analizar el impacto de *D. pictus* sobre la comunidad nativa, los resultados obtenidos señalan algunos posibles efectos negativos sobre algunas especies nativas. A microescala se detecta un potencial desplazamiento de la especie nativa *B. calamita* que pudiera limitar su éxito reproductivo en situaciones de estrés hídrico o baja disponibilidad de recursos por ejemplo. Estos resultados se han repetido tanto en laboratorio como en campo donde otros factores podrían actuar minimizándolos mediante una respuesta compensatoria por parte de la especie nativa. Ambas especies conviven en el medio, señalando como principal estrategia la partición del nicho trófico, observada en el capítulo III y registrada en otras invasiones (Layman & Allgeier, 2012; Juncos et al., 2015). Esta estrategia conllevaría una menor capacidad de la especie nativa a hacer frente a situaciones de estrés o una peor *fitness* en algunos aspectos en convivencia con la especie introducida. La especie nativa puede llegar a desarrollar también diferentes estrategias, desde cambios fenológicos o de explotación de nicho que minimizaran dichos efectos (Crossland et al., 2009; Knight et al., 2009; Kraus, 2015). Sin embargo, si la presión competitiva de la especie invasora fuese muy fuerte estos cambios podrían no ser suficientes y llegar a desplazar a la especie nativa (menos competitiva), provocando un efecto en cadena en la estructuración de la comunidad (mesoescala). Existen indicios de una menor estructuración en las comunidades nativas de anfibios colonizadas por *D. pictus* en comparación con las aún no invadidas (Montori et al, 2007; Richter-Boix et al, 2012). Por otro lado, su efecto puede verse aumentado por la expansión de la especie a macroescala. En la actualidad, la expansión del sapillo pintojo mediterráneo progresa y aún encuentra hábitats por colonizar. Aunque hay que tener en cuenta que las dos especies cohabitan actualmente (Llorente et al, 2015) y puede no tener un fuerte impacto en la población nativa en general, en comunidades de menor diversidad pudiera aumentar los efectos asociados

a su introducción. Con el fin de profundizar y controlar su potencial efecto sobre la comunidad nativa, se recomienda también el desarrollo de nuevos estudios y el seguimiento del proceso de invasión de *D. pictus*.

En los últimos años el estudio de las especies invasoras y sus impactos se ha incrementado significativamente (por ejemplo, Jeschke & Strayer, 2006; Strayer et al., 2006; Bomford et al., 2009; Kraus, 2015). Algunos intentan clasificarlos en función de su impacto. Si tuviéramos que definir la especie (*D. pictus*) como invasiva o no invasiva en función de si tiene efecto negativo sobre la comunidad nativa, sin duda escogeríamos denominarla especie invasiva bajo un prisma conservacionista. Sin embargo, desde una óptica económica esta denominación no sería tan clara. El efecto observado sobre la comunidad de anfibios nativa siguiendo el sistema de catalogación proporcionado por Blackburn et al. (2014) parece encajar en el de *Minor Impact* (MI). Se considera que las especies no nativas tienen un MI cuando causan la reducción de la *fitness* de los individuos nativos, pero no un declive en sus densidades poblacionales. Esto último no puede ser comprobado y precisa de un mayor número de estudios que delimiten si la presencia de *D. pictus* puede afectar no sólo a la *fitness* de *B. calamita* sino también a su densidad poblacional y por tanto variar la catalogación propuesta.

5. Limitaciones y futuros estudios

Muchas son las consideraciones a tener en cuenta a la hora de analizar la capacidad invasora de una especie. Generalizaciones de aspectos comunes a las especies invasoras permiten quizás explicar su efecto sobre las poblaciones nativas o por qué obtienen éxito a microescala, sin embargo siempre existen excepciones (Vilà et al., 2003). Cada caso requiere de un análisis específico. En el estudio de las especies invasoras de anfibios proponemos un análisis a diferentes escalas que integre aquellos aspectos más relevantes a su éxito en cada una de ellas. Como el grupo de los anfibios es especialmente sensible al clima, cabría esperar unos buenos resultados de predicción de su capacidad de expansión a nivel de macroescala mediante técnicas de modelado del nicho que incorporen factores climáticos. Sin embargo, el modelado de nicho se basa en la información extraída de los registros de la especie, representando así su nicho realizado y no el fundamental. *D. pictus* presenta una distribución nativa limitada por barreras geográficas, el Mar Mediterráneo y el clima extremo del desierto del Sahara, pudiendo no representar la total amplitud de su nicho fundamental. Incorporar en el

futuro estudios fisiológicos que puedan ayudar a predecir los límites ambientales que la especie puede tolerar, podrían mejorar los modelos predictivos anticipando qué nichos no ocupados hasta el momento son susceptibles de albergar a la especie introducida o en cuáles encontraría un mayor éxito (Abril et al, 2009; Kearney & Porter 2009; Jiménez-Valverde et al. 2011). Por otro lado entender cómo se estructura dentro de las comunidades y su efecto es esencial en dicho análisis, como otro factor a introducir en futuras modelizaciones.

Quizás un factor esencial a la hora de estudiar una invasión biológica es considerar su carácter dinámico a las tres escalas. No sólo por la misma progresión de la expansión (en el espacio y tiempo) bajo condiciones variables sino por la capacidad de estas especies al cambio. Así, se han detectado diferencias en algunas especies a nivel morfológico y conductual entre individuos del frente y del foco de invasión. A macroescala el factor más evidente podría ser el aumento de la tasa de expansión en el frente que ha conllevado modificaciones morfológicas en especies como el sapo de caña (Phillips et al., 2006). La elevada tasa de reemplazo generacional de los anfibios podría favorecer este tipo de adaptaciones que pueden originarse en todo el proceso de expansión poblacional mediante el surfeo de las frecuencias génicas en los márgenes poblacionales (Hallatschek & Nelson, 2008). En *D. pictus* no existen estudios que analicen este tipo de cuestiones hasta el momento, y serían aspectos a desarrollar en el futuro para comprender mejor los procesos ecológicos y evolutivos implicados durante una invasión biológica. A nivel de mesoescala la selección de hábitats-nichos vacíos podría favorecer la expansión de determinadas especies poco competitivas (por ejemplo Willis et al., 2000; Thébaud & Simberloff, 2001; Bossdorf et al., 2004). Algunos autores indican una menor probabilidad de ocupación de ambientes con elevada riqueza específica por parte de especies invasoras (Alpert et al. 2000). Según Escoriza & Boix (2014) *D. pictus* registra una ocupación de ambientes con mayor riqueza específica en el área nativa que en el área de introducción. Análisis comparativos de la selección del tipo de hábitat dentro del rango de invasión serían de enorme interés para la comprensión de su ecología de invasión y cómo podría afectar a las especies nativas. Ocupar nichos poco explotados por las especies nativas puede entenderse como una estrategia oportunista propia de especies con baja capacidad competitiva respecto al grueso de la comunidad nativa, pero obviamente también entrando en conflicto, precisamente, con las especies nativas que por su escasa competitividad ocupan dichos hábitats, pudiendo así afectar a las especies más sensibles a nivel competitivo dentro de la comunidad, compitiendo y desplazando a las mismas a otros hábitats. Como ya

indicara Richter-Boix et al. (2012), se observó cierta desestructuración de la comunidad nativa en el área colonizada por la especie, respecto a zonas donde la especie todavía no había llegado. Los trabajos experimentales desarrollados hacen pensar que *D. pictus* presenta una capacidad competitiva mayor que la especie nativa *B. calamita* y similar a *P. punctatus*, las dos especies más frecuentes en los ambientes efímeros que suele explotar la especie invasora. Esto puede conllevar con el tiempo el desplazamiento de las más débiles y la posterior desestructuración a nivel comunitario detectada en zonas ocupadas por la especie. El estudio de su ocupación del gradiente de ambientes a lo largo de su expansión permitiría completar nuestros resultados y conocer su interacción con los diferentes factores de estrés (depredación, competitividad, etc). Por último a microescala, las interacciones con las especies nativas también podrían variar durante la expansión. Muchos trabajos encuentran su apoyo en la hipótesis de EICA (*the evolution of increased competitive ability*) (Blossey & Notzold, 1995; Leger & Rice, 2003; Siemann & Rogers, 2003; Jakobs et al., 2004; Maron et al., 2004; Rogers & Siemann, 2004). Ésta hipótesis predice que las especies introducidas en un ambiente que carece de sus depredadores naturales experimentarán selección a favor de los individuos que asignan menos energía y recursos en su defensa y más en el crecimiento y la reproducción. Aunque algunos trabajos no se ven respaldados por esta hipótesis (Willis et al., 2000; Thébaud & Simberloff, 2001; Bossdorf et al., 2004; Wolfe et al., 2004), sería lógico pensar que los individuos más competitivos ocuparían el frente de expansión donde previsiblemente producirían un mayor impacto o que las especies nativas encontrarán el equilibrio con la nueva especie. La selección de unos factores de las historias de vida (*life-history*) frente a otros, y el compromiso (*trade-off*) entre ellos a lo largo del rango de la invasión han sido analizados (Burton et al., 2010) y observados por ejemplo entre fecundidad y capacidad de dispersión (Roff, 1986; Zera & Denno, 1997; Karlsson & Johansson, 2008), capacidad competitiva y rasgos reproductivos (Strauss et al. 2002) y capacidad de dispersión y capacidad competitiva (Rodríguez et al., 2007), entre otros. En el caso de las especies invasoras, se ha documentado una mayor capacidad dispersiva de los individuos de frente en algunos casos (Cwynar & MacDonald, 1987; Thomas et al., 2001; Hanski et al., 2002; Hanski et al., 2004; Phillips et al., 2006). Por ejemplo, se han observado tasas de crecimiento más elevadas en individuos del área invadida que en los de su área nativa (Davis, 2005; Mason et al., 2008), incluso mayor en individuos del frente de expansión con los de poblaciones cercanas al punto de origen de expansión donde llevan más tiempo establecidos (Siemann & Rogers, 2001; Phillips, 2009). En *D. pictus* se han observado tamaños de adultos mayores en el área de introducción frente a los del área nativa. Aunque parece

que el factor regulador del tamaño es el régimen de lluvias, el clima encontrado por la especie en la región ocupada (con mayores valores de precipitación) podría promover tamaños mayores que favorecieran la expansión de la especie en esta zona (Oromi et al., 2016). También se ha observado cómo especies nativas tras un tiempo de coexistencia prolongado han adoptado ciertos comportamientos o adaptaciones que aminoran el efecto de la introducción de la especie exótica (por ejemplo las adaptaciones morfológicas detectadas en depredadores del sapo de caña en Australia (Phillips & Shine, 2004; 2005). Recientes estudios bajo condiciones controladas han observado también diferencias en los procesos de competencia entre *D. pictus* y *B. calamita*, en función del tiempo de co-ocurrencia entre ambas (Unanue, 2015). Este trabajo destaca una respuesta simétrica durante el desarrollo larvario de *D. pictus* y *B. calamita* a altas densidades en zonas de poblaciones ya establecidas frente a una competencia asimétrica entre larvas de poblaciones situadas en el frente de expansión. Estos resultados parecen indicar que a pesar de un inicial efecto negativo sobre la especie nativa, *D. pictus* podría coexistir con esta especie a largo término. Las poblaciones analizadas en esta tesis doctoral, registraban un tiempo de residencia de entre 10 y 20 años. Parece probable que se trate de un tiempo suficiente para el establecimiento de la especie en la comunidad nativa y por tanto, su capacidad competitiva debiera verse suavizada ante *B. calamita*. Sin embargo, algunos autores destacan como tiempo mínimo para la aparición de adaptaciones evolutivas al menos 25 generaciones (Moran & Alexander, 2014). Considerando que *D. pictus* presenta una edad de maduración cercana a los tres años y se estima como inicio de expansión (no de origen de introducción) una fecha aproximada inicial en 1906, las poblaciones estudiadas en este trabajo pueden no encontrarse actualmente establecidas y por tanto, observarse respuestas más pronunciadas por parte de la especie introducida en pro de su expansión. En cualquier caso, nuestros resultados denotarían una estrategia efectiva por parte de la especie en las zonas de relativa reciente introducción que podría ser mayor en el frente más extremo.

Este trabajo ha explorado los diferentes aspectos que implican el éxito de establecimiento y expansión de una especie introducida. Ha aportado una visión integrada de su capacidad invasora así como asienta las bases a futuros estudios fisiológicos y genéticos que puedan profundizar sobre relevantes cuestiones que han surgido como producto de la presente tesis. El análisis del proceso de invasión como un evento dinámico evidencia la importancia de los análisis de series temporales y los seguimientos de estos procesos. Asimismo es esencial a la hora de detectar potenciales

efectos negativos sobre las densidades o *fitness* de las comunidades nativas que *D. pictus* vaya colonizando durante su expansión.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La conservación de nicho detectada en *Discoglossus pictus* -resultados obtenidos en el test de similitud, equivalencia y los métodos de ordenación- está de acuerdo con la propuesta por Escoriza et al (2014) ocupando hábitats marginales del área nativa. Dicha conservación de nicho (*climate matching*) prevé un avance de su expansión.
- *D. pictus* presentó una relativa plasticidad del nicho realizado (con un aumento progresivo de su expansión con el tiempo) que indica la importancia del estudio de las invasiones como procesos dinámicos y la necesidad de profundizar en las causas reales de estos cambios con estudios adicionales.
- La expansión de *D. pictus* ha seguido el patrón observado en otros procesos de invasión: una *lag phase* inicial y tasa de expansión lenta, seguida de un aumento exponencial de la misma. En los últimos 10 años (periodo comprendido entre 2004 y 2014) su tasa de expansión ha aumentado registrando el mayor valor. La tasa estimada (2004-2014) ha sido de 171.56 km²/año.
- Se constata la existencia de hábitats favorables para la presencia del sapillo pintojo mediterráneo en otras zonas de Europa. Los modelos predictivos indicaron un potencial aumento de la expansión derivada de la presencia de áreas idóneas y conexas en Europa, que junto a un incremento de la precipitación, como producto del cambio climático, que favorecería la aparición de ambientes acuáticos efímeros, permitiría expandir su rango hacia el norte, alcanzando el centro de Europa.
- Las translocaciones registradas hasta el momento durante la invasión de *D. pictus* se encuentran comprendidas en áreas con condiciones idóneas para la presencia de la especie, pudiendo probablemente convertirse en nuevos focos colonizadores que aceleren su tasa de expansión. Destaca su progresión en un área próxima al frente de expansión de la especie en el noreste peninsular situada en el Prat de Llobregat (Barcelona, España) así como las introducciones en las zonas próximas a Montpellier en la parte francesa de su distribución.

- Nos encontramos ante una especie oportunista que ocupa hábitats efímeros, presentando una plasticidad fenotípica adaptativa eficaz a la desecación que le permite acelerar el desarrollo y crecimiento cuando el ambiente acuático se deteriora. Igualmente, se ha observado plasticidad fenotípica a la presencia de algunos depredadores, pero no a todos ellos. Esta reducida respuesta ante algunos depredadores puede ser uno de los factores limitantes en el éxito reproductivo de la especie en sistemas de hidroperiodos más largos con una mayor diversidad de depredadores.
- La plasticidad fenotípica ante la desecación observada en *D. pictus* depende de la disponibilidad de recursos. De manera que la disponibilidad de recursos aparece como un factor limitante a la hora de garantizar su éxito reproductivo en los ambientes efímeros que suele ocupar.
- La respuesta de *D. pictus* ante los depredadores más frecuentes del área de introducción es principalmente conductual (salvo para *Anax sp.* que también es morfológica) y presenta menores costes que la especie nativa *P. punctatus*. Sin embargo, una respuesta leve con escasos costes sería un beneficio para *D. pictus* ya que ocupa, principalmente, ambientes efímeros pero que puede provocar un bajo éxito de la especie invasora en ambientes en los que exista una mayor presión de depredación.
- *D. pictus* presenta un aprovechamiento eficaz de los recursos porque dan como resultado un desarrollo rápido y un elevado crecimiento, favoreciendo su éxito en los ambientes efímeros. La especie nativa *Bufo calamita* podría verse desfavorecida por competir directamente por los recursos con la especie invasora, especialmente bajo condiciones extremas de desecación del ambiente.
- *D. pictus* es capaz de discriminar y seleccionar aquellos recursos tróficos con mayor contenido proteico (selección diferencial en la calidad de la dieta), que le permite optimizar su crecimiento y desarrollo. La especie regula también su actividad en presencia de recursos de bajo contenido proteico, minimizando el efecto de una menor calidad del alimento, mediante un aumento en la ingesta de los mismos.
- En co-ocurrencia con la especie nativa, *B. calamita*, las interacciones competitivas aumentan con la densidad y la especie nativa altera sus hábitos hacia aquellos recursos de menor contenido proteico y por tanto más pobres, retrasando su crecimiento y

desarrollo, y condicionando así su respuesta plástica, situación con posibles nefastas consecuencias en condiciones de desecación de la charca.

- La aplicación de la técnica de isótopos estables permitió confirmar con datos de campo, las conclusiones previamente citadas, en referencia a la ecología trófica de la especie invasora y su interacción con la especie nativa, obtenidas en experimentos de laboratorio. Esta técnica se presenta como una herramienta útil en el estudio de las comunidades de anfibios.
- A pesar de la similitud en el tipo de dieta explotada por *D. pictus* y *B. calamita*, cuando estas dos especies ocupan un mismo espacio (están en co-ocurrencia), la comunidad se distribuye siguiendo la fragmentación de nicho donde la especie invasora explota recursos de mayor calidad proteica que la nativa. La nativa sin embargo muestra un potencial desplazamiento derivado del aumento en la variedad de recursos explotados (basados en los resultados del SEA).
- Una mayor amplitud de nicho trófico de *D. pictus* en condiciones de libertad en campo, indica una explotación de una variedad de recursos mayor que la especie nativa, un carácter oportunista y generalista asociado a la capacidad invasora de una especie.
- El estudio desarrollado a tres escalas dimensionales diferentes, permite por un lado predecir el éxito de una introducción y su alcance (principalmente a macroescala) así como entender su establecimiento en las comunidades nativas (mesoescala) y su interacción y potencial impacto sobre las mismas (microescala).
- La similitud del nicho realizado entre el rango nativo e introducido de *D. pictus*, la eficacia en la respuesta (plasticidad fenotípica adaptativa) frente a las amenazas presentes en el tipo de ambientes seleccionados y la eficaz gestión de los recursos tróficos constituyen caracteres considerados claves para el éxito de esta especie en el área de introducción y formarían parte esencial de su capacidad invasora.
- Se prevé un efecto moderado sobre aquellas especies con menor capacidad competitiva con las que comparte hábitat, especialmente sobre *B. calamita*. La presencia de la especie alóctona podría limitar su éxito reproductivo en años con pocas precipitaciones y con un mayor riesgo de estrés por desecación de los ambientes temporales, al ver mermada su capacidad de respuesta a la misma y la obtención de

tamaños menores en la metamorfosis que puedan comprometer su futura *fitness* reproductiva.

- Se recomienda el seguimiento de la expansión de *D. pictus* en los próximos años con el fin de realizar un estudio completo de un proceso con marcado carácter dinámico, que ayude mejor a entender la ecología implicada en los procesos invasivos y por último, estudiar de forma más estricta su impacto potencial sobre las especies nativas, en especial *B. calamita*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, S., Roura-Pascual, N., Oliveras, J. & Gómez, C. (2009) Assessing the distribution of the Argentine ant using physiological data. *Acta Oecologica* 35, 739–745. doi: 10.1016/j.actao.2009.07.005
- Ackefors, H. (1999) The positive effects of established crayfish introductions in Europe. *Crustacean Issues* 49–62.
- Agrawal, A. (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science*, 294, 321 – 326.
- Aguilar, J.D. & Dommanget, J.L. (1998) Guide des libellules d'Europe et d'Afrique du Nord: l'identification et la biologie de toutes les espèces. Delachaux et Niestlé.
- Almeida, E., Alves, S., Rebelo, R., Guerreiro, C., Nunes, A. & Andrade, P. (2011) Antipredator responses of two anurans towards native and exotic predators. *Amphibia-Reptilia* 32, 341–350. doi: 10.1163/017353711X579849
- Alpert, P. (2006) The advantages and disadvantages of being introduced. *Biological Invasions*, 8, 1523–1534
- Alpert, P., Bone, E., & Holzapfel, C. (2000) Invasiveness, invasibility and the role of environmental stress in the spread of non-native plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3, 52–66.
- Álvarez, D. & Nicieza, A.G. (2002) Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology* 16, 640 – 648.
- Amor, N., Kalbousi, M., Said, K. (2013). Chapter 27 Conservation status of amphibians in Tunisia. 11, 85–100.
- Arano, B. & Llorente, G. (1995). Hybridogenetic processes involving *R. perezi*: distribution of the P-RP system in Catalonia. In *Scientia Herpetologica*, 41-44. Llorente, G. et al. (eds). Barcelona: Asociación Herpetológica Española.
- Arano, B.; Llorente, G.; García-Paris, M. & Herrero, P. (1995). Species translocation menaces iberian waterfrogs. *Conservation Biology* 9, 196-198
- Araújo, M.S., Bolnick, D.I., Martinelli, L.A., Giarretta A.A. & Dos Reis S.F. (2009) Individual-level diet variation in four species of Brazilian frogs. *Journal of Animal Ecology* 78, 848–856. doi: 10.1111/j.1365-2656.2009.01546.x

- Babbitt, K.J., Meshaka, W.E. & Ross, S.T. (2000) Benefits of eating conspecifics: effects of background diet on survival and metamorphosis in the cuban treefrog (*Osteopilus septentrionalis*). *Copeia* 2, 469–474.
- Babbitt, K.J., Baber, M.J. & Tarr, T.L. (2003) Patterns of larval amphibian distribution along a wetland hydroperiod gradient. *Canadian Journal of Zoology*, 81, 1539–1552.
- Baillie, J., Hilton-Taylor, C., Stuart, S.N. (2004) 2004 IUCN Red List of threatened species: a global species assessment. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge
- Baiser, B., Russell, G.J. & Lockwood, J.L. (2010) Connectance determines invasion success via trophic interactions in model food webs. *Oikos* 119, 1970–1976. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18557.x
- Baker, H.G. (1974) The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5, 1–24
- Barbadillo, L.J., Lacomba, J.I., Pérez-Mellado, V., Sancho, V. & López-Jurado, L.F. (1999) *Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias*. Editorial GeoPlaneta, Barcelona.
- Barrett, S.C.H. & Richardson, B.J. (1986) Genetic attributes of invading species. Pp. 21–33 in: R.H. Groves and J.J. Burdon (eds) *Ecology of Biological Invasions: An Australian Perspective*. Australian Academy of Science, Canberra.
- Ben Hassine, J. & Nouira, S. (2009) Diet of *Discoglossus pictus* Otth, 1837 (Anura, Alytidae) and *Pelophylax saharicus* (Boulenger in Hartert, 1913) in the oases of Kettana (Gabes, Tunisia). *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 134, 321–332.
- Ben Hassine, J. & Nouira, S. (2012a) The amphibians of Tunisia: biodiversity, distribution, status and major threats. *FrogLog*, 101, 32–34
- Ben Hassine, J. & Nouira, S. (2012b) Répartition géographique et affinités écologiques des Amphibiens de Tunisie. *Revue d'Écologie (Terre & Vie)*, 67, 437–457.
- Berven, K.A. (1981) Mate choice in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Evolution (N Y)* 35, 707–722.
- Berven, K.A. & Gill, D.E. (1983) Interpreting geographic variation in life-history traits. *American Zoologist* 23, 85–97.
- Beukema, W.; De Pous, P.; Donaire, D. Bogaerts, S., García-Porta, J., Escoriza, D., Arribas, O.J., El Mouden, E.H. & Carranza, S. (2013). Review of the systematics, distribution, biogeography and natural history of Moroccan amphibians. *Zootaxa* 3661, 1–60.

- Blackburn, T.M. & Duncan, R.P. (2001) Determinants of establishment success in introduced birds. *Nature*, 414, 195–197
- Blackburn, T.M., Essl, F., Evans, T., Hulme, P.E., Jeschke, J.M., Kühn, I., Kumschick, S., Marková, Z., Mrugała, A., Nentwig, W., Pergl, J., Pyšek, P., Rabitsch, W., Ricciardi, A., Richardson, D. M., Sendek, A., Vilà, M., Wilson, J. R. U., Winter, M., Genovesi, P. & Bacher, S. (2014). A unified classification of alien species based on the magnitude of their environmental impacts. *PLoS Biology*, 12(5), e1001850. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001850>
- Blackburn, T.M., Dyer, E., Su, S., & Cassey, P. (2015a) Long after the event, or four things we (should) know about bird invasions. *Journal of Ornithology*, 156, 15–25, doi: 10.1007/s10336-015-1155-z
- Blackburn, T.M., Lockwood, J.L. & Cassey, P. (2015b) The influence of numbers on invasion success. *Molecular ecology*, 24, 1942–1953. doi:10.1111/mec.13075
- Blossey, B. & Notzold, R. (1995) Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology* 83, 887–889. doi: 10.2307/2261425
- Bøhn, T., Sandlund, O., Amundsen, P., & Primicerio, R. (2004) Rapidly changing life history during invasion. *Oikos*, 106, 138–150.
- Bomford, M., Kraus, F., Barry, S.C. & Lawrence, E. (2009) Predicting establishment success for alien reptiles and amphibians: a role for climate matching. *Biological Invasions* 11, 713–724. DOI 10.1007/s10530-008-9285-3
- Bosch, J.; Andreone, F.; Tejedo, M.; et al. (2009). *Discoglossus pictus*, In IUCN (ed.) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. International Union for Nature Conservation and Natural Resources, Gland, Switzerland. Available at <http://www.iucnredlist.org/>. Retrieved on 16/10/2012
- Bossdorf, O., Prati, D., Auge, H. & Schmid, B. (2004) Reduced competitive ability in an invasive plant. *Ecology Letters* 7, 346–353. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00583.x
- Bucciarelli, G.M., Blaustein, A.R., Garcia, T.S., Tiffany S. Garcia, T. S. & Kats, L. B. (2014) Invasion complexities: the diverse impacts of nonnative species on amphibians. *Copeia* 14, 611–632. doi: 10.1643/OT-14-014
- Burnett, S. (1997) Colonizing cane toads cause population declines in native predators: reliable anecdotal information and management implications. *Pacific Conservation Biology* 3, 65–72.
- Burton, O.J., Phillips, B.L. & Travis, J.M.J. (2010) Trade-offs and the evolution of life-histories during range expansion. *Ecology Letters* 13, 1210–1220. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01505.x

- Busack, S.D. (1986). Biochemical and morphological differentiation in Spanish and Moroccan populations of *Discoglossus* and the description of a new species from southern Spain (Amphibia, Anura, Discoglossidae). *Annals Carnegie Museum*, 55, 41-61.
- Cadi, A., & Joly, P. (2003) Competition for basking places between the endangered European pond turtle (*Emys orbicularis galloitalica*) and the introduced red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Canadian Journal of Zoology*, 81, 1392–1398. <http://doi.org/10.1139/Z03-108>
- Calef, G.W. (1973) Natural mortality of tadpoles in a population of *Rana aurora*. *Ecology* 54, 741–758. <http://dx.doi.org/10.2307/1935670>
- Callen, S.T., Miller, A.J. (2015) Signatures of niche conservatism and niche shift in the North American kudzu (*Pueraria montana*) invasion. *Diversity and Distributions* 20, 853–863. doi: 10.1111/ddi.12341
- Capula, M. (2007) *Discoglossus pictus*. In: Lanza, B., Andreone, F., Bologna, M. A., Corti, C. & Razzetti, E. (eds), *Fauna d'Italia Amphibia*. Ed. Calderini, Bologna.
- Carboni, M., Münkemüller, T., Gallien, L., Lavergne, S., Acosta, A. & Thuiller, W. (2013) Darwin's naturalization hypothesis: scale matters in coastal plant communities. *Ecography (Cop)* 36, 560–568. doi: 10.1111/j.1600-0587.2012.07479.x.Darwin
- Case, T.J. (1991) Invasion resistance, species build up, and community collapse in metapopulation models with interspecies competition. *Biological Journal of the Linnean Society*, 42, 239-266.
- Caswell, H., Lensink, R. & Neubert, M.G. (2003) Demography and dispersal: life table response experiments. *Ecology* 84, 1968–1978.
- Catenazzi, A. (2015) State of the world's amphibians. *Annual Review of Environment and Resources* 40, 91–119. doi: 10.1146/annurev-environ-102014-021358
- Caut, S., Angulo, E., Díaz-Paniagua, C., Gomez-Mestre, I. (2013) Plastic changes in tadpole trophic ecology revealed by stable isotope analysis. *Oecologia* 173, 95–105. doi: 10.1007/s00442-012-2428-3
- Caut, S., Angulo, E., & Courchamp, F. (2008) Dietary shift of an invasive predator: rats, seabirds and sea turtles. *The Journal of Applied Ecology*, 45(2), 428–437. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01438.x>
- Cayuela, H., Besnard, A., & Joly, P. (2013) Multi-event models reveal the absence of interaction between an invasive frog and a native endangered amphibian. *Biological Invasions*, 15(9), 2001–2012. doi:10.1007/s10530-013-0427-x
- Chytrý, M., Jarošík, V., Pyšek, P., Hájek, O., Knollová, I., Tichý, L & Danihelka, J. (2008) Separating habitat invasibility by alien plants. *Ecology* 89, 1541–1553.

- Clavero, M. & García-Berthou, E. (2005) Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology and Evolution* 20(3), 110
- Colautti, R. I., & MacIsaac, H. J. (2004) A neutral terminology to define “invasive” species. *Diversity and Distributions*, 10(2), 135–141.
- Colautti, R.I., Grigorovich, I.A., MacIsaac, H.J. (2006) Propagule pressure: a null model for biological invasions. *Biological Invasions*, 8, 1023-1037
- Crawley, M.J. (1987) What makes a community invasible? *Colonization, Succession and Stability* (eds A.J. Gray, M. J. Crawley & P.J. Edwards), pp. 429-453. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Cristescu, M.E. (2015) Genetic reconstructions of invasion history. *Molecular ecology* 24, 2212–25, doi: 10.1111/mec.13117
- Crnobrnja-Isailović, J., Ćurčić, S., Stojadinović, D., Tomašević-Kolarov, N., Aleksić, I. & Tomanović, Ž. (2012) Diet composition and food preferences in adult common toads (*Bufo bufo*) (Amphibia: Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology* 46, 4.
- Crochet, P., Dubois, A., Ohler, A. & Turner, H. (1995). *Rana (Pelophylax) ridibunda* Pallas, 1771, *Rana (Pelophylax) perezi* Seoane, 1885 and their associated klepton (Amphibia, Anura): morphological diagnoses and description of a new taxon. *Bulletin du Museum National d’Histoire naturelle, Paris*, 4esér. 17, 11-30.
- Cronk, Q.C.B. & Fuller, J.L. (1995) *Plant invaders*. Chapman & Hall, London.
- Crossland, M.R. (1997) Impact of the eggs, hatchlings and tadpoles of the introduced Cane Toad, *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae) on native aquatic fauna in northern Queensland, Australia. PhD Thesis, James Cook University, Townsville.
- Crossland, M.R., Alford, R.A. & Shine, R. (2009) Impact of the invasive cane toad (*Bufo marinus*) on an Australian frog (*Opisthodon ornatus*) depends on minor variation in reproductive timing. *Oecologia* 158, 625–32. doi: 10.1007/s00442-008-1167-y
- Cruz, M.J. & Rebelo, R. (2005) Vulnerability of Southwest Iberian amphibians to an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*. *Amphibia-Reptilia* 26, 293–303.
- Cwynar, L.C. & MacDonald, G.M. (1987) Geographical variation of lodgepole pine in relation to population history. *The American Naturalist* 129, 463–469.
- D’Amore, A., Hemingway, V. & Wasson, K. (2010) Do a threatened native amphibian and its invasive congener differ in response to human alteration of the landscape? *Biological Invasions* 12, 145–154. doi:10.1007/s10530-009-9438-z
- Daehler, C.C. (2001) Two ways to be an invader, but one is more suitable for ecology. *Bulletin of the Ecological Society of America* 82, 101–102.
- DAISIE (2009) *Handbook of alien species in Europe*. Springer, Dordrecht

- Dang, C., De Montaudouin, X., Bald, J., Jude, F., Raymond, N., Lanceleur, L., Paul-Pont, I. & Caill-Milly, N. (2009) Testing the enemy release hypothesis: Trematode parasites in the non-indigenous Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Hydrobiologia* 630, 139–148. doi: 10.1007/s10750-009-9786-9
- Davis, H.G. (2005) r -Selected traits in an invasive population. 255–274. doi: 10.1007/s10682-005-0912-5
- Dawson, W., Burslem, D.F.R.P., Hulme P.E. (2011) The comparative importance of species traits and introduction characteristics in tropical plant invasions. *Diversity and Distributions* 17, 1111–1121. doi: 10.1111/j.1472-4642.2011.00796.x
- Dayton, G.H. & Fitzgerald, L.A. (2001) Competition, predation, and the distributions of four desert anurans. *Oecologia* 129, 430–435. doi: 10.1007/s004420100727
- Denver, R.J. (1997) Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *American Zoologist* 37, 172–184. doi: 10.2307/3883954
- Denver, R.J., Mirhadi, N. & Phillips, M. (1998) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology* 79, 1859–1872.
- Díaz-Paniagua, C. (1989) Larval diets of two anuran species, *Pelodytes punctatus* and *Bufo bufo*, in SW Spain. *Amphibia-Reptilia* 10, 71–75. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Doody, J.S., Green, B., Sims, R., Rhind, D., West, P. & Steer, D. (2006) Indirect impacts of invasive cane toads (*Bufo marinus*) on nest predation in pig-nosed turtles (*Carettochelys insculpta*). *Wildlife Research*, 33, 349–354. doi: 10.1071/WR05042
- Duncan, R.P., Bomford, M., Forsyth, D.M. & Conibear, L. (2001) High predictability in introduction outcomes and the geographical range size of introduced Australian birds: a role for climate. *Journal of Animal Ecology*, 70, 621–32
- Ehrlich, P. (1989). Attributes of invaders and the invading process: vertebrates. Pages 315–328 in J. A. Drake, H. A. Mooney, F. Di Castri, R. H. Groves, F. J. Kruger, M. Rej-manek, and M. Williamson, editors. *Biological invasions: a global perspective*. John Wiley & Sons, New York, New York, USA.
- Ellner, S.P. & Schreiber, S.J. (2012) Temporally variable dispersal and demography can accelerate the spread of invading species. *Theoretical Population Biology* 82, 283–298.
- Elton, C.S. (1958) *The ecology of invasions by animals and plants*. Methuen & Co, Londres.

- Elvira, B. (2001) Identification of non-native freshwater fishes established in Europe and assessment of their potential threats to the biological diversity. Report T-PVS (2001) 6, Council of Europe, Strasbourg, France.
- Enriquez-Urzelai, U., San Sebastián, O., Garriga & N., Llorente, G.A. (2013) Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia* 173, 117–27. doi: 10.1007/s00442-013-2596-9
- Escoriza, D. & Boix, D. (2012) Assessing the potential impact of an invasive species on a Mediterranean amphibian assemblage: a morphological and ecological approach. *Hydrobiologia* 680, 233–245. doi: 10.1007/s10750-011-0936-5
- Escoriza, D. & Boix, D. (2014a) Reproductive habitat selection in alien and native populations of the genus *Discoglossus*. *Acta Oecologica* 59, 97–103. doi: 10.1016/j.actao.2014.06.005
- Escoriza, D., Ben Hassine J., Boix, D. (2014b) Factors regulating the invasive success of an alien frog : a comparison of the ecology of the native and alien populations. *Hydrobiologia* 730, 127–138. doi: 10.1007/s10750-014-1827-3
- Ferrari, M.C.O., Wisenden, B.D. & Chivers, D.P. (2010) Chemical ecology of predator–prey interactions in aquatic ecosystems: a review and prospectus. The present review is one in the special series of reviews on animal–plant interactions. *Canadian Journal of Zoology* 88, 698–724. doi: 10.1139/Z10-029
- Ficetola, G. F., Coïc, C., Detaint, M., Berroneau, M., Lorvelec, O., & Miaud, C. (2007). Pattern of distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. *Biological Invasions*, 9(7), 767–772. doi:10.1007/s10530-006-9080-y
- Ficetola, G.F., Thuiller, W., Padoa-Schioppa, E. (2009) From introduction to the establishment of alien species: bioclimatic differences between presence and reproduction localities in the slider turtle. *Diversity and Distributions* 15, 108–116. doi: 10.1111/j.1472-4642.2008.00516.x
- Forsyth, D. M., Duncan, R. P., Bomford, M. & Moore, G. (2004) Climatic suitability, life-history traits, introduction effort, and the establishment and spread of introduced mammals in Australia. *Conservation Biology*, 18, 557–569
- Fox, L.R. (1975) Cannibalism in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 6, 87–106. doi: 10.1146/annurev.es.06.110175.000511
- Fradet, V. & Geniez, P. (2004) La répartition du Discoglosse peint *Discoglossus pictus* Otth, 1837 (Amphibien, Anoure, Discoglossidés) dans le Sud de la France: note sur sa présence dans le département de l'Hérault. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* 109, 35–41

- Franch, M., Llorente, G.A., Montori, A., Richter-Boix, Á. & Carranza, S. (2007) Discovery of an introduced population of *Discoglossus pictus* beyond its known distributional range. *Herpetological Review* 38, 356–359.
- Franch, M., Montori, A., Sillero, N. & Llorente G. A. (2015) Temporal analysis of *Mauremys leprosa* (Testudines, Geoemydidae) distribution in northeastern Iberia: unusual increase in the distribution of a native species. *Hydrobiologia* 757:129–142. doi: 10.1007/s10750-015-2247-8
- Fromhage, L., Vences, M. & Veith, M. 2004. Testing alternative vicariance scenarios in Western Mediterranean discoglossid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31 (1), 308-322.
- Gannes, L. Z., Martínez del Río, C., & Koch, P. (1998) Natural abundance variations in stable isotopes and their use in animal physiological ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119A(3), 725–737.
- García-París, M. & Jockusch, E.L. (1999). A mitochondrial DNA perspective on the evolution of Iberian *Discoglossus* (Amphibia: Anura). *Journal of Zoology (Lon.)*, 248, 209-218.
- Gasc, J.P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J.P., Maurin, H., Oliveira, M.E., Sofianidou, T.S., Veith, M. & Zuiderwijk, A. (1997) Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe. Paris, Societas Europaea Herpetologica and Museum National d'Histoire Naturelle (IEGB/SPN).
- Gassó, N., Sol, D., Pino, J., Dana, Elías D., Lloret, F., Sanz-Elorza, M., Sobrino, E. & Vilà, M. (2009) Exploring species attributes and site characteristics to assess plant invasions in Spain. *Diversity and Distributions*, 15, 50–58. <http://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00501.x>
- Gearing, J.N. (1991) The study of diet and trophic relationships through natural abundance ¹³C. In: *Carbon Isotope Techniques*. Elsevier, pp 201–218
- GEIB Grupo Especialistas en Invasiones Biológicas (ed) (2020) Invasiones Biológicas: avances 2009. Actas del 3er Congreso Nacional sobre Invasiones Biológicas "EEI". GEIB, Serie Técnica N. 4 320 pp.
- Geniez, P. & Cheylan, M. (1987) Atlas de distribution des Reptiles et des Amphibiens du Languedoc-Roussillon. Laboratoire de Biogéographie et Ecologie des Vertébrés, Montpellier.
- Gilbert F. F. & Dodds D. G. (2001) *The Philosophy and Practice of Wildlife Management*. Krieger, Malabar, FL.

- Gillespie, J.H. (2013) Application of stable isotope analysis to study temporal changes in foraging ecology in a highly endangered amphibian. PLoSOne 8:e53041. doi: 10.1371/journal.pone.0053041
- Glaw, F. & Vences, M. (1991). Bioacoustic differentiation in Painted frogs (*Discoglossus*). Amphibia-Reptilia, 12, 385-394.
- Goater, C.P. (1994) Growth and survival of postmetamorphic toads: interactions among larval history, density and parasitism. Ecology 75, 2264–2274.
- Graf, J.D., Karch, F. & Moreillon, M.C. (1977). Biochemical variation in the *Rana esculenta* complex: a new hybrid form related to *Rana perezi* and *Rana ridibunda*. Experientia 33, 1582-1584.
- Griffiths, A.R.A., Denton, J. & Wong, A.L. (1993) The effect of food level on competition in tadpoles: interference mediated by protothecan algae? Journal of Animal Ecology 62, 274–279.
- Grinnell, J. (1917) Field tests of theories concerning distributional control. American Naturalist 51, 115–128.
- Grinnell, J. (1924) Geography and evolution. Ecology 5, 225–229
- Groves R.H., Burdon J.I. (1986) Ecology of Biological Invasions. Cambridge University Press
- Gutiérrez-Yurrita, P.J., Sancho, G., Bravo, M.A., Baltanás, Á., Montes, C. (1998) Diet of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in natural ecosystems of the Doñana National Park temporary fresh-water marsh (Spain). Journal of Crustacean Biology 18, 120–127.
- Hallatschek, O. & Nelson, D.R. (2008) Gene surfing in expanding populations. Theoretical Population Biology 73, 158–170. doi: 10.1016/j.tpb.2007.08.008
- Halliday, T.M. & Tejedo, M. (1995) Intrasexual selection and alternative mating behaviour. In: Heatwole H., Sullivan B.K. (eds) Amphibian Biology vol. 2. Chipping Norton, NSW: Surrey Beatty and Sons, pp 469–517
- Hanski, I., Breuker, C.J., Schöps, K., Setchfield, R. & Nieminen, M. (2002) Population history and life history influence the migration rate of female Glanville fritillary butterflies. Oikos 98, 87–97.
- Hanski, I., Erälahti, C., Kankare, M., Ovaskainen, O. & Sirén, H. (2004) Variation in migration propensity among individuals maintained by landscape structure. Ecology Letters 7, 958–966. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00654.x
- Hardin, G. (1960) The competitive exclusion principle. Science 131, 1292–1297.
- Hayes, K.R. & Barry, S.C. 2008. Are there any consistent predictors of invasion success? Biological Invasions 10, 483–506.

- Heatwole, H. (1982) A review of structuring in herpetofaunal assemblages. In: N. J. Scott, Jr. (Ed.). *Herpetological communities: a symposium of the Society for the Study of Amphibians and Reptiles and The Herpetologists' League*, August, 1977, pp. 1-19. U.S. Fish & Wildlife Res. Report No. 13.
- Heyer, W.R. (1976) Studies in larval amphibians habitat partitioning. *Smithsonian Contributions to Zoology* 242, 1-27.
- Holway, D. & Suarez, A. (1999) Animal behavior: an essential component of invasion biology. *Trends in ecology & evolution* 14, 328–330.
- Holway, D.A. (1999) Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive argentine ant. *Ecology*, 80(1), 238–251.
- Hortal, J., Roura-Pascual, N., Sanders, N.J. & Rahbek, C. (2010) Understanding (insect) species distributions across spatial scales. *Ecography (Cop)* 33, 51–53. doi: 10.1111/j.1600-0587.2009.06428.x
- Howard, R.D. (1980) Mating behaviour and mating success in woodfrogs, *Rana sylvatica*. *Animal Behaviour* 28, 705–716.
- Hulme, P.E., Pyšek, P., Jarošík V., Pergl, J., Schaffner, U. & Vilà, M. (2013) Bias and error in understanding plant invasion impacts. *Trends in Ecology & Evolution* 28, 212–218. doi: 10.1016/j.tree.2012.10.010
- Human, K.G. & Gordon, D.M. (1996) Exploitation and interference competition between the invasive Argentine ant, *Linepithema humile*, and native ant species. *Oecologia* 105, 405–412.
- Hutchinson, G.E. (1957) Concluding remarks. Pages 415–427 in *Population Studies: Animal Ecology and Demography*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume 22. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Inger, R., & Bearhop, S. (2008) Applications of stable isotope analyses to avian ecology. *Ibis*, 150, 447–461.
- Inger, R.F., Voris, H.K. & Frogner, K.J. (1986) Organization of a community of tadpoles in rain forest streams in Borneo. *Journal of Tropical Ecology*, 2, 193-205.
- IUCN (2000) IUCN guidelines for the prevention of biodiversity loss caused by alien invasive species [online]. <http://iucn.org/themes/ssc/pubs/policy/invasivesEng.htm>. Accessed 2 Sept 2010
- Jackson, M.C., Donohue, I., Jackson, A.L., Britton, J., Harper, D. M. & Grey, J. (2012) Population-level metrics of trophic structure based on stable isotopes and their application to invasion ecology. *PLoS One* 7, 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0031757

- Jakobs, G., Weber, E. & Edwards, P.J. (2004) Introduced plants of the invasive *Solidago gigantea* (Asteraceae) are larger and grow denser than conspecifics in the native range. *Diversity and Distributions* 10, 11–19. doi: 10.1111/j.1472-4642.2004.00052.x
- Jefferson, D.M., Hobson, K. A., Demuth, B.S., Ferrari, Maud C. O. & Chivers, D. P. (2014) Frugal cannibals: how consuming conspecific tissues can provide conditional benefits to wood frog tadpoles (*Lithobates sylvaticus*). *Naturwissenschaften* 101, 291–303. doi: 10.1007/s00114-014-1156-4
- Jeschke, J.M. & Strayer, D.L. (2006) Determinants of vertebrate invasion success in Europe and North America. *Global Change Biology*. 12, 1608–1619. doi: 10.1111/j.1365-2486.2006.01213.x
- Jeschke, J.M., Bacher, S., Blackburn, T.M., Dick, J., Essl, F., Evans, T., Gaertner, M., Hulme, P. E., Kühn, I., Mrugała, A., Pergl, J., Pyšek, P., Rabitsch, W., Ricciardi, A., Richardson, D. M., Sendek, A., Vilà, M., Winter, M. & Kumschick, S. (2014) Defining the impact of non-native species. *Conservation biology*, 0, 1–7. doi: 10.1111/cobi.12299
- Jiménez-Valverde, A., Peterson, A.T., Soberón, J., Overton, J. M., Aragón, P. & Lobo, J. M. (2011) Use of niche models in invasive species risk assessments. *Biological Invasions* 13, 2785–2797. doi: 10.1007/s10530-011-9963-4
- Joly, P. (2000) Invasions biologiques: état de l’art et perspectives. *Revue D Ecologie-La Terre Et La Vie Suppl.* 7: 21–35.
- Juncos, R., Milano, D., Macchi, P.J. & Vigliano, P.H. (2015) Niche segregation facilitates coexistence between native and introduced fishes in a deep Patagonian lake. *Hydrobiologia* 747, 53–67. doi: 10.1007/s10750-014-2122-z
- Kaiser, H. (1997) Origins and introductions of the Caribbean frog, *Eleutherodactylus johnstonei* (Leptodactylidae): management and conservation concerns. *Biodiversity and Conservation* 6, 1391–1407.
- Karlsson, B. & Johansson, A. (2008) Seasonal polyphenism and developmental trade-offs between flight ability and egg laying in a pierid butterfly. *Proceedings. Biological sciences* 275, 2131–6. doi: 10.1098/rspb.2008.0404
- Kearney, M. & Porter, W. (2009) Mechanistic niche modelling: Combining physiological and spatial data to predict species’ ranges. *Ecology Letters* 12, 334–350. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01277.x
- Kearney, M., Porter, W.P., Williams, C., Ritchie, S. & Hoffmann, A. A. (2009) Integrating biophysical models and evolutionary theory to predict climatic impacts on species’ ranges: the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Australia. *Functional Ecology* 3, 528–538.

- Knight, C.M., Parris, M.J., & Gutzke, W.H.N. (2009) Influence of priority effects and pond location on invaded larval amphibian communities. *Biological Invasions*, 11, 1033–1044. <http://doi.org/10.1007/s10530-008-9314-2>
- Knoepffler, L.P. (1962) Contribution à l'étude du genre *Discoglossus* (Amphibiens Anoures). *Vie Milieu*, 13, 1-94.
- Kraus, F. (2009) *Alien Reptiles and Amphibians: A Scientific Compendium and Analysis*. Dordrecht, Neth. Springer
- Kraus, F. (2015) Impacts from Invasive Reptiles and Amphibians. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 46, 75–97. <http://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054450>
- Kraus, F., Campbell, E.W., Allison, A. & Pratt, T. (1999) *Eleutherodactylus* frog introductions to Hawaii. *Herpetological Review* 30(1), 21–2
- Kraus F. & Campbell E.W. (2002) Human-mediated escalation of a formerly eradicable problem: The invasion of Caribbean frogs in the Hawaiian Islands. *Biological Invasions* 4, 327–332. doi: 10.1023/A:1020909205908
- Kulkarni, S.S., Gomez-Mestre, I., Moskalik, C.L., Storz, B. L. & Buchholz, D. R. (2011) Evolutionary reduction of developmental plasticity in desert spadefoot toads. *Journal of Evolutionary Biology* 24, 2445–55. doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02370.x
- Kupferberg, S.J. (1997) The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoologist* 159, 146–159.
- Kupferberg, S.J. (1996) The ecology of native tadpoles (*Rana boylei* and *Hyla regilla*) and the impacts of invading bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in a northern California river. University of California, Berkeley
- Kupferberg, S.J. (1997) The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoologist* 159, 146–159.
- Lach, L., Britton, D.K., Rundell, R.J., & Cowie, R.H. (2000). Food preference and reproductive plasticity in an invasive freshwater snail. *Biological Conservation*, 2, 279–288.
- Lack, D. (1954) *The natural regulation of animal numbers*. Oxford University Press, Oxford
- Lanza, B. (1989) *Discoglossus pictus* (Oth, 1837). Discoglosse peint. pp 62-63. In: Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France (J. Castanet & R. Guyétant, coordonnateurs). Société Herpétologique de France, Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (Secrétariat de la Faune et de la Flore), Ministère de l'Environnement (Direction de la Protection de la Nature, Secrétariat d'État chargé de l'Environnement), Paris

- Laurila, A., Karttunen, S., Merilä, J. (2002a) Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution* (N Y) 56, 617–627.
- Laurila, A., Pakkasmaa, S., Crochet, P.A., Merilä, J. (2002b) Predator-induced plasticity in early life history and morphology in two anuran amphibians. *Oecologia* 132, 524–530. doi: 10.1007/s00442-002-0984-7
- Layman, C.A. & Allgeier, J.E. (2012) Characterizing trophic ecology of generalist consumers: a case study of the invasive lionfish in The Bahamas. *Marine Ecology Progress Series* 448, 131–141. doi: 10.3354/meps09511
- Layman, C.A., Araujo, M.S., Boucek, R., Hammerschlag-Peyer, C. M., Harrison, E., Jud, Z. R., Matich, P., Rosenblatt, A. E., Vaudo, J. J., Yeager, L. A., Post, D. M. & Bearhop, S. (2012) Applying stable isotopes to examine food-web structure: an overview of analytical tools. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 87, 545–62. doi: 10.1111/j.1469-185X.2011.00208.x
- Leger, E.A. & Rice, K.J. (2003) Invasive California poppies (*Eschscholzia californica* Cham.) grow larger than native individuals under reduced competition. *Ecology Letters* 6, 257–264. doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00423.x
- Leishman, M. R., Thomson, V. P. & Cooke, J. (2010) Native and exotic invasive plants have fundamentally similar carbon capture strategies. *Journal of Ecology*, 98(1), 28–42. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01608.x>
- Lescure, J., Marty, C. (2000) Atlas des Amphibiens de Guyane. SPN/MNHN (Patrimoines naturels Paris, 2001).
- Licata, F., Anzá, S. & Mercurio, E. (2015) *Discoglossus pictus* tadpoles: egg cannibalism. *The Herpetological Bulletin* 132, 20–21.
- Lillo, F., Faraone, F.P. & Lo Valvo, M. (2011) Can the introduction of *Xenopus laevis* affect native amphibian populations? Reduction of reproductive occurrence in presence of the invasive species. *Biological Invasions* 13, 1533–1541. doi: 10.1007/s10530-010-9911-8
- Lind, M.I. & Johansson, F. (2007) The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of evolutionary biology* 20, 1288–97. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01353.x
- Liu, H. & Stiling, P. (2006) Testing the enemy release hypothesis: A review and meta-analysis. *Biological Invasions* 8, 1535–1545. doi: 10.1007/s10530-005-5845-y
- Llorente, G.A., Montori, A., Santos, X. & Carretero, M.A. (1995) Atlas de distribució dels Amfibis i Rèptils de Catalunya i Andorra. El Brau Edicions, Figueres

- Llorente, G.A., Montori, A., Santos, X., Carretero, M.A. (1997) *Discoglossus pictus*. In: Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal (Pleguezuelos, J.M. ed.). Monografías de Herpetología – Asociación Herpetológica Española. 3, 137-139.
- Llorente, G.A., Montori, A., Pujol-Buxó, E. (2015) El sapillo pintojo mediterráneo (*Discoglossus pictus*) en la península ibérica. Boletín de la Asociación Herpetológica Española 26 (2), 15-19
- Lockwood, J. L., Cassey, P. & Blackburn, T. (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 223–228.
- Loman, J. (2001) Intraspecific competition in tadpoles of *Rana arvalis*: does it matter in nature? A field experiment. *Population Ecology* 43, 253–263.
- Lonsdale, W.M. (1999) Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. *Ecology* 80:1522–1536. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Mack, R.N., Simberloff, D., Lonsdale, W.M., Evans, H., Clout, M. & Bazzaz, F.A. (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecological Applications* 10(3), 689–710. doi:10.1890/1051-0761(2000)010[0689:BICEGC]2.0.CO;2
- Mahoney, P.J., Beard, K.H., Durso, A.M., Tallian, A.G., Long, A.L., Kindermann, R.J., Nolan, N.E., Kinka, D. & Mohn, H.E. (2015) Introduction effort, climate matching and species traits as predictors of global establishment success in non-native reptiles. *Diversity and Distributions* 21, 64–74. doi: 10.1111/ddi.12240
- Manchester, S.J. & Bullock, J.M. (2000) The impacts of non-native species on UK biodiversity and the effectiveness of control. *Journal of Applied Ecology* 37, 845-864.
- Marchetti, M.P., Moyle, P.B., Levine, R. (2004) Invasive species profiling? Exploring the characteristics of non-native fishes across invasion stages in California. *Freshwater Biology* 49, 646–661. doi: 10.1111/j.1365-2427.2004.01202.x
- Maron, J.L., Vila, M., Bommarco, R., Elmendorf, S. & Beardsley, P. (2004) Rapid evolution of an invasive plant. *Ecological Monographs* 74, 261–280. doi: 10.1890/03-4027
- Martens, H. & Veith, M. (1987) Considerations on origin and chorology of *Discoglossus pictus* Otth, 1837 in the eastern Pyrenees. In: Van Gelder, J.J., Strijbosch, H., Bergers, P.J.M. (Eds.), Proceedings of the 4th Ord. Gen. Meeting S.E.H. in Nijmegen 1987, Faculty of Science, Nijmegen, pp. 267–269.

- Martínez-Solano, Í. (2004). Phylogeography of Iberian *Discoglossus* (Anura: Discoglossidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42 (4), 298-305.
- Martínez-Solano, Í. (2004). Phylogenetic relationships and biogeography of midwife toads (Discoglossidae: Alytes). *Journal of Biogeography*, 31, 603-618.
- Martínez-Solano, Í. (2009) Sapillo pintojo mediterráneo – *Discoglossus pictus* Otth, 1837. In: Salvador, A., Martínez-Solano I (ed) Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, pp 1–13
- Martins, F.M.S., Oom, M.D.M., Rebelo, R. & Rosa, G.M. (2013) Differential effects of dietary protein on early life-history and morphological traits in natterjack toad (*Epidalea calamita*) tadpoles reared in captivity. *Zoo biology* 32, 457–62. doi: 10.1002/zoo.21067
- Mason, R.A.B., Cooke, J., Moles, A.T. & Leishman, M.R. (2008) Reproductive output of invasive versus native plants. *Global Ecology and Biogeography* 17, 633–640. doi: 10.1111/j.1466-8238.2008.00402.x
- Mateo, J., Geniez, P., & Pether, J. (2013) Diversity and conservation of Algerian amphibian assemblages. *Basic and Applied Herpetology*, 27, 51-83.
- McCoid, M.J., Fritts, T.H. (1993) Speculations on colonizing success of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Pipidae), in California. *South African Journal of Zoology* 28, 59–61.
- McDiarmid, R.W. & Altig, R. (1999) *The Biology of Anuran Larvae*. University Chicago Press, Chicago.
- Melgoza, G., Nowak, R.S. (1991) Competition between cheatgrass and two native species after fire: Implications from observations and measurements of root distribution. *Journal of Range Management* 44, 27–33.
- Meshaka, W.E. Jr., Butterfield, B.P. & Hauge, J.B. (2004) *The Exotic Amphibians and Reptiles of Florida*. Krieger Publishing Co., Malabar, Florida.
- Montori, A., Llorente, G.A., Richter-Boix, A., Villero, D., Franch, M. & Garriga, N. (2007) Colonización y efectos potenciales de la especie invasora *Discoglossus pictus* sobre las especies nativas. *Munibe*, 25, 14–27.
- Mooney, H. A. & Hobbs, R. J. (2000) *Invasive species in a changing world?* Island Press.
- Moran, E.V. & Alexander, J.M. (2014) Evolutionary responses to global change: lessons from invasive species. *Ecology Letters* 17, 637–649. doi: 10.1111/ele.12262
- Morand, A. & Joly, P. (1995) Habitat variability and space utilization by the amphibian communities of the French Upper-Rhone floodplain. *Hydrobiologia*, 301, 249–257.

- Moravcová, L., Pyšek, P., Jarošík, V. & Pergl, J. (2015) Getting the right traits: reproductive and dispersal characteristics predict the invasiveness of herbaceous plant species. *PLoS ONE* 10(4), e0123634. doi:10.1371/journal.pone.0123634
- Morey, S. & Reznick, D. (2000) A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology* 81, 1736–1749.
- Morin, P.J. (1983) Predation, competition, and the composition of larval anuran guilds. *Ecological Monographs* 53, 119–138.
- Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1–10.
- Newman, R.A. (1992) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *Bioscience* 42, 671–678. doi: 10.2307/1312173
- Newman, R.A. & Dunham, A.E. (1994) Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia* 2, 372–381.
- Nunes, A.L., Richter-Boix, A., Laurila, A. & Rebelo, R. (2013) Do anuran larvae respond behaviourally to chemical cues from an invasive crayfish predator? A community-wide study. *Oecologia* 171, 115–127. doi: 10.1007/s00442-012-2389-6
- Occhipinti-Ambrogi, A. & Galil, B.S. (2004) A uniform terminology on bioinvasions: a chimera or an operative tool? *Marine Pollution Bulletin* 49, 688–694
- Odum, H.T., 1986. Emergy in ecosystems. In: Polunin, N. (Ed.), *Ecosystem Theory and Application*. Wiley-Interscience. John Wiley, Chichester.
- Oromí, N, Pujol-Buxó, E, San Sebastián, O, Llorente, G. A., Hammou, M. A. & Sanuy, D. (2016) Geographical variations in adult body size and reproductive life history traits in an invasive anuran, *Discoglossus pictus*. *Zoology* 119, 216–223. doi: 10.1016/j.zool.2016.02.003
- Pabijan, M., Crottini, A., Reckwell, D, Irisarri, I, Hauswaldt, J. S. & Vences, M. (2012) A multigene species tree for Western Mediterranean painted frogs (*Discoglossus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64, 690–696. doi: 10.1016/j.ympev.2012.05.017
- Palmer, M.W. & Maurer, T.A. (1997) Does diversity beget diversity? A case study of crops and weeds. *Journal of Vegetation Science* 8, 235–240.
- Pauchard, A., Alaback, P. & Edlund, E. (2003) Plant invasions in protected areas at multiple scales: *Linaria vulgaris* (Scrophulariaceae) in the West Yellowstone area. *Western North American Naturalist* 63: 416–428
- Pauchard, A. & Shea, K. (2006) Integrating the study of non-native plant invasions across spatial scales. *Biological Invasions* 8, 399–413.

- Perkins, M.J., McDonald, R.A., van Veen, F.F., Kelly, S. D., Rees, G. & Bearhop, S. (2014) Application of nitrogen and carbon stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) to quantify food chain length and trophic structure. *PLoS One* 9:e93281.
- Perkins, T.A., Phillips, B.L., Baskett, M.L. & Hastings, A. (2013) Evolution of dispersal and life history interact to drive accelerating spread of an invasive species. *Ecology Letters* 16, 1079–1087. doi: 10.1111/ele.12136
- Peterson, A.T. & Vieglaiss, D.A. (2001) Predicting species invasions using ecological niche modeling: new approaches from bioinformatics attack a pressing problem. *Bioscience* 51, 363–372. doi: 10.1641/0006-3568(2001)051[0363:PSIUEN]2.0.CO;2
- Peterson, B.J. & Fry, B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 293–320. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.18.1.293
- Petitpierre, B., Kueffer, C., Broennimann, O., Randin, C., Daehler, C., & Guisan, A. (2012) Climatic niche shifts are rare among terrestrial plant invaders. *Science*, 335, 1344–1349.
- Petren, K., Case, T.J. (1996) An experimental demonstration of exploitation competition in an ongoing invasion. *Ecology* 77, 118–132.
- Phillips, B.L. (2009) The evolution of growth rates on an expanding range edge. *Biology Letters* 5, 802–804. doi: 10.1098/rsbl.2009.0367
- Phillips, B.L. & Shine, R. (2004) Adapting to an invasive species: toxic cane toads induce morphological change in Australian snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 17150–17155.
- Phillips, B.L. & Shine, R. (2005) The morphology, and hence impact, of an invasive species (the cane toad, *Bufo marinus*): changes with time since colonisation. *Animal Conservation* 8, 407–413. doi: 10.1017/S1367943005002374
- Phillips, B.L., Brown, G.P., Webb, J.K. & Shine, R. (2006) Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature* 439, 803. doi: 10.1038/439803a
- Phillips, B.L., Brown, G.P., Greenlees, M., Webb, J.K. & Shine, R. (2007) Rapid expansion of the cane toad (*Bufo marinus*) invasion front in tropical Australia. *Austral Ecology* 32, 169–176. doi: 10.1111/j.1442-9993.2007.01664.x
- Phillips, B.L., Brown, G.P., Travis, J.M.J. & Shine, R. (2008) Reid’s paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. *The American Naturalist* doi: 10.1086/588255
- Pianka, E. R. (1981) Competition and niche theory. In R. M. May (Ed.), *Theoretical ecology* (pp. 167–196). Oxford: Blackwell Scientific.
- Pianka, E. R. (1982) *Ecología evolutiva*. Omega, Barcelona, 365 pp.

- Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O'Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino, T. & Tsomondo, T. (2001) Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 84(1), 1–20. [http://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00178-X](http://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00178-X)
- Polo-Cavia, N., López, P., & Martín, J. (2010) Competitive interactions during basking between native and invasive freshwater turtle species. *Biological Invasions*, 12(7), 2141–2152. <http://doi.org/10.1007/s10530-009-9615-0>
- Pyšek, P. & Richardson, D. M (2008) Traits associated with invasiveness in alien plants: where do we stand? *Biological invasions*, 97-125
- Pyšek, P., Hulme, P.E. & Nentwig, W. (2009) Glossary of the main technical terms used in the handbook. *Handbook of alien species in Europe* (ed. by DAISIE), pp. 375–379. Springer, Dordrecht.
- Pyšek, P., Jarošík, V., Hulme, P., Kühn, I., Wild, J., Arianoutsou, M., Bacher, S., Chiron, F., Didžiulis, V., Essl, F. et al (2010) Disentangling the role of environmental and human pressures on biological invasions across Europe. *PNAS* 107, 12157–62. doi: 10.1073/pnas.1002314107
- Rago, A., While, G.M. & Uller, T. (2012) Introduction pathway and climate trump ecology and life history as predictors of establishment success in alien frogs and toads. *Ecology and evolution* 2, 1437–45. doi: 10.1002/ece3.261
- Ramos, R., González-Solís, J. (2012) Trace me if you can: The use of intrinsic biogeochemical markers in marine top predators. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10, 258–266. doi: 10.1890/110140
- Randall, J. M. (1997) Defining weeds of natural areas. *Assessment and Management of Plant Invasions* (eds J. O. Luken & J. W. Thieret), pp. 18-25. Springer, New York.
- Real, R., Barbosa, A.M., Martínez-Solano, I., Garcia-Paris, M. (2005) Distinguishing the distributions of two cryptic frogs (Anura: Discoglossidae) using molecular data and environmental modeling. *Canadian Journal of Zoology* 4:536–545.
- Real, R., Márquez, A.L., Estrada, A., Muñoz, A. R., Vargas, J. M. (2008) Modelling chorotypes of invasive vertebrates in mainland Spain. *Diversity and Distributions* 364–373. doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00419.x
- Rebelo, R., Amaral, P., Bernardes, M., Oliveira, J., Pinheiro, P., & Leitão, D. (2010) *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), a new exotic amphibian in Portugal. *Biological Invasions*, 12(10), 3383–3387. <http://doi.org/10.1007/s10530-010-9757-0>

- Reed, R.N., Willson, J.D., Rodda, G.H., Dorcas, M.E. (2012) Ecological correlates of invasion impact for Burmese pythons in Florida. *Integrative Zoology* 7, 254–270. doi: 10.1111/j.1749-4877.2012.00304.x
- Rehage, J.S., Barnett, B.K. & Sih, A. (2005) Foraging behaviour and invasiveness: do invasive *Gambusia* exhibit higher feeding rates and broader diets than their noninvasive relatives? *Ecology of Freshwater Fish* 14, 352–360. doi: 10.1111/j.1600-0633.2005.00109.x
- Ricciardi, A. & Rasmussen, J.B. (1998) Predicting the identity and impact of future biological invaders: a priority for aquatic resource management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 1759–1765. doi: 10.1139/cjfas-55-7-1759
- Richards, C.L., Bossdorf, O., Muth, N.Z., Gurevitch, J. & Pigliucci, M. (2006) Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters*, 9(8), 981–93. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00950.x>
- Richardson, D.M. (2011) Fifty years of invasion ecology– the legacy of Charles Elton. Wiley-Blackwell. 436 pp.
- Richardson, D.M., Pyšek, P., Rejmánek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D., West, C.J. (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* 6, 93–107.
- Richardson, D.M., Pyšek, P. (2006) Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Progress in Physical Geography* 30, 409–431. doi: 10.1191/0309133306pp490pr
- Richter-Boix, A. (2005) Structure of an anuran community in a Mediterranean area. PhD Thesis, University of Barcelona
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A. & Montori A. (2006). A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. *Evolutionary Ecology Research*, 8, 1139–1154.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A. & Montori, A. (2007a) A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. *Hydrobiologia* 583, 43–56. doi: 10.1007/s10750-006-0475-7
- Richter-Boix A., Llorente G. A. & Montori A. (2007b) Hierarchical competition in pond-breeding anuran larvae in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia* 28, 247–261. doi: 10.1163/156853807780202549
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A. & Montori, A. (2007c) Structure and dynamics of an amphibian metacommunity in two regions. *Journal of Animal Ecology*, 76, 607–618. doi:10.1111/j.1365-2656.2007.01232.x

- Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A., Garcia, J. (2007d) Tadpole diet selection varies with the ecological context in predictable ways. *Basic and Applied Ecology* 8, 464–474. doi: 10.1016/j.baae.2006.09.009
- Richter-Boix, A., Garriga, N., Montori, A., Franch, M., San Sebastián, O., Villero, D. & Llorente, G.A. (2012) Effects of the non-native amphibian species *Discoglossus pictus* on the recipient amphibian community: niche overlap, competition and community organization. *Biological Invasions* 15, 799–815. doi: 10.1007/s10530-012-0328-4
- Robinson, G.R., Quinn, J.F. & Stanton, M. (1995) Invasibility of experimental habitat islands in a California winter annual grassland. *Ecology*, 76(3), 786–794.
- Rodda, G.H., Savidge, J.A. (2007) Biology and impacts of Pacific Island invasive species. 2. *Boiga irregularis*, the brown tree snake (Reptilia: Colubridae). *Pacific Science* 61, 307–324. doi: 10.2984/1534-6188(2007)61[307:BAIOPI]2.0.CO;2
- Rodda, G.H. & Tyrrell, C.L. (2008) Introduced species that invade and species that thrive in town: are these two groups cut from the same cloth? In: Mitchell, J.C., Brown, R.E.J. & Bartholomew, B. (ed) *Urban Herpetology*. Herpetological Conservation. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Salt Lake City, UT, pp 327–341
- Rodríguez, A., Jansson, G. & Andrén, H. (2007) Composition of an avian guild in spatially structured habitats supports a competition-colonization trade-off. *Proceedings. Biological sciences* 274, 1403–1411. doi: 10.1098/rspb.2007.0104
- Roff, D.A. (1986) The evolution of wing dimorphism in insects. *Evolution (N Y)* 40, 1009–1020.
- Rogers, W.E. & Siemann, E. (2004) Invasive ecotypes tolerate herbivory more effectively than native ecotypes of the Chinese tallow tree *Sapium sebiferum*. *Journal of Applied Ecology* 41, 561–570. doi: 10.1111/j.0021-8901.2004.00914.x
- Romanuk, T.N., Zhou, Y., Brose, U., Berlow, E.L., Williams, R.J. & Martinez, N.D. (2009) Predicting invasion success in complex ecological networks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 1743–54. doi: 10.1098/rstb.2008.0286
- Ross, S.T. (1986) Resource partitioning in fish assemblages: a review of field studies. *Copeia* 1986, 352–388.
- Roura-Pascual, N., Suarez, A. V., Gómez, C., Pons, P., Touyama, Y., Wild, A.L. & Peterson, A.T. (2004) Geographical potential of Argentine ants (*Linepithema humile* Mayr) in the face of global climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271, 2527–2534. doi: 10.1098/rspb.2004.2898

- Rubenstein, D.R., & Hobson, K.A. (2004) From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(5), 256–263. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.017>
- Ruhí, A., San Sebastián, O., Feo, C., Franch, M., Gascón, S., Richter-Boix, À., Boix, D. & Llorente, G.A. (2012) Man-made Mediterranean temporary ponds as a tool for amphibian conservation. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 48, 81–93. doi: 10.1051/limn/2011059
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, M., Molofsky, J., With, K.A., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Norman, C. Mccauley, D.E. et al (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32, 305–332. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037
- Salvador, A. & García-París, M. (2001) Anfibios Españoles. Identificación, historia natural y distribución. Canseco Editores, Talavera de la Reina.
- Salvador, A. (1996) Amphibians of Northwest Africa. *Smithsonian Information Service*, 109, 1-41
- Salvidio, S., Sindaco, R., Emanuelli, L. & Lanza, B. (1999) The tadpole of the endemic Corsican painted frog *Discoglossus montalentii* (Anura, Discoglossidae). *Italian Journal of Zoology*, 66(1), 63-69.
- Samraoui, B., Samraoui, F., Benslimane, N., Alfarhan, A. & Al-Rasheid, K.A.S. (2012) A precipitous decline of the Algerian newt *Pleurodeles poireti* Gervais, 1835 and other changes in the status of amphibians of Numidia, north-eastern Algeria. *Revue d'Ecologie (Terre Vie)* 67, 70-81.
- San Sebastián, O. (2007) Estudio de la colonización por la comunidad de anfibios de un ambiente acuático de nueva creación. Olatz San Sebastián Mendoza. Memoria presentada para la obtención del Máster en Biodiversidad Animal. Universidad de Barcelona
- Santos, M.J., Pinto, B.M., & Santos-Reis, M. (2007) Trophic niche partitioning between two native and two exotic carnivores in SW Portugal. *Web Ecology*, 7, 53–62.
- Sato, M., Kawaguchi, Y., Nakajima, J., Mukai, T., Shimatani, Y., Onikura, N. (2010) A review of the research on introduced freshwater fishes: new perspectives, the need for research and management implications. *Landscape and Ecological Engineering* 6, 99–108
- Sax, D.F., Stachowicz, J.J., Brown, J.H., Bruno, J.F., Dawson, M.N., Gaines, S.D., Grosberg, R.K., Hastings, A., Holt, R.D., Mayfield, M.M., O'Connor, M.I. & Rice, W.R. (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Evolution* (NY). doi: 10.1016/j.tree.2007.06.009

- Sax, D.F. & Gaines, S.D. (2003) Species diversity: from global decreases to local increases. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 561–566
- Schiesari, L. (2006) Pond canopy cover: a resource gradient for anuran larvae. *Freshwater Biology* 51, 412–423. doi: 10.1111/j.1365-2427.2005.01497.x
- Schiesari, L., Werner, E.E. & Kling, G.W. (2009) Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. *Freshwater Biology* 54, 572–586. doi: 10.1111/j.1365-2427.2008.02134.x
- Schneider, D.W., & Frost, T. (1996) Habitat duration and community structure in temporary ponds. *Journal of the North American Benthological Society*, 15(1), 64–86.
- Schoener, T.W. (1983) Field experiments on interspecific competition. *The American Naturalist*, 122(2), 240–285.
- Scott, D.E. (1990) Effects of larval density in *Ambystoma opacum*: an experiment in large-scale field enclosures. *Ecology* 71, 296–306.
- Shine, R., Brown, G.P. & Phillips, B.L. (2011) An evolutionary process that assembles phenotypes through space rather than through time. 8–11. doi: 10.1073/pnas.1018989108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018989108
- Siemann, E. & Rogers, W.E. (2001) Genetic differences in growth of an invasive tree species. *Ecology Letters* 4, 514–518. doi: 10.1046/j.1461-0248.2001.00274.x
- Siemann, E. & Rogers, S. (2003) Increased competitive ability of an invasive tree may be limited by an invasive beetle. *Ecological Applications* 13, 1503–1507.
- Sih, A., Crowley, P., McPeck, M., Petranka, J. & Strohmeier, K. (1985) Predation, competition, and prey communities: A review of field experiments. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 269–311.
- Simberloff, D. (1986) Introduced insects: a biogeographic and systematic perspective. Pages 3-26. In H. A. Mooney and J. A. Drake, editors. *Ecology of biological invasions of North America and Hawaii*. Wiley, New York, New York, USA.
- Simberloff, D., Rejmánek, M. (2011) *Encyclopedia of biological invasions*. Vol. 3 de *Encyclopedias of the Natural World*. University of California Press, Berkeley
- Simberloff, D., Souza, L., Nuñez, M.A., Barrios-Garcia, M.N. & Bunn, W. (2012) The natives are restless, but not often and mostly when disturbed. *Ecology* 93, 598–607.
- Sin, H., Beard, K.H., Pitt, W.C. (2008) An invasive frog, *Eleutherodactylus coqui*, increases new leaf production and leaf litter decomposition rates through nutrient cycling in Hawaii. *Biological Invasions* 10, 335–345. doi: 10.1007/s10530-007-9133-x

- Skelly, D.K. (1996) Pond drying, predators, and the distribution of *Pseudacris* tadpoles. *Copeia*, 3, 599–605
- Smith, D.C. (1983) Factors controlling tadpole populations of the chorus frog (*Pseudacris triseriata*) on Isle Royale. Michigan. *Ecology* 64(3), 501–510
- Smith, D.C. (1987) Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68, 344–350.
- Smith, G.R., Dingfelder, H.A., Vaala, D.A. (2004) Asymmetric competition between *Rana clamitans* and *Hyla versicolor* tadpoles. *Oikos* 105, 626–632.
- Smith, K. (2005) Effects of nonindigenous tadpoles on native tadpoles in Florida: evidence of competition. *Biological Conservation* 123, 433–441. doi: 10.1016/j.biocon.2005.01.005
- Snodgrass, J.W., Komoroski, M.J., Bryan, A.L. Jr. & Burger, J. (2000) Relationships among isolated wetland size, hydroperiod, and amphibian species richness: implications for wetland regulations. *Conservation Biology*, 14, 414–419.
- Soberón, J. (2010) Niche and area of distribution modeling: a population ecology perspective. *Ecography* 33: 159-167
- Soberón, J., Peterson, T.A. (2005) Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics* 2, 1–10. doi: 10.1093/wber/lhm022
- Soberón, J. & Nakamura, M. (2009). Niches and distributional areas: concepts, methods, and assumptions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106:19644-19650.
- Sol, D., Bartomeus, I., & Griffin, A. S. (2012). The paradox of invasion in birds: competitive superiority or ecological opportunism? *Oecologia*, 169(2), 553–64. <http://doi.org/10.1007/s00442-011-2203-x>
- Speybroeck, J., Beukema, W., Crochet, P.A. (2010): A tentative species list of the European herpetofauna (Amphibia and Reptilia) – an update. *Zootaxa* 2492, 1-27.
- Stohlgren, T.J., Binkley, D., Chong, G.W., Kalkan, M.A., Schell, L.D., Bull, K.A., Otsuki, Y., Newman, G., Bashkin, M. & Son, Y. (1999) Exotic plant species invade hot spots of native plant diversity. *Ecological Monographs*, 69, 25–46
- Strauss, S.Y., Rudgers, J.A., Lau, J.A., Irwin, R.E. (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* 17, 278–285. doi: 10.1016/S0169-5347(02)02483-7
- Strayer, D.L., Eviner, V.T., Jeschke, J.M., Pace, M.L. (2006) Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends in ecology & evolution*, 21, 645–51. doi: 10.1016/j.tree.2006.07.007

- Talluto, M.V., Boulangeat, I., Ameztegui, A., Aubin, I., Berteaux, D., Butler, A., Doyon, F., Drever, C.R., Fortin, M. J., Franceschini, T. et al (2016) Cross-scale integration of knowledge for predicting species ranges: A metamodelling framework. *Glob Ecol Biogeogr* 25:238–249. doi: 10.1111/geb.12395
- Tejedo, M., Semlitsch, R.D. & Hotz, H. (2000) Covariation of morphology and jumping performance in newly metamorphosed water frogs: effects of larval growth history. *Copeia* 2, 448–458. doi: 10.1643/0045-8511(2000)000[0448:COMAJP]2.0.CO;2
- Thébaud, C. & Simberloff, D. (2001) Are plants really larger in their introduced ranges? *The American naturalist* 157, 231–6. doi: 10.1086/318635
- Thomas, C.D., Bodsworth, E.J., Wilson, R.J., Simmons, A.D., Davies, Z.G., Musche, M. & Conradt, L. (2001) Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. *Nature* 411, 577–581.
- Tilman, D. (1997) Community invasibility, recruitment limitation, and grassland biodiversity. *Ecology*, 78, 81–92.
- Tilman, D. (2004) A stochastic theory of resource competition, community assembly and invasions. *PNAS* 101, 10854–10861
- Travis J.M.J. & Dytham C. (2002) Dispersal evolution during invasions. *Evolutionary Ecology Research* 4, 1119–1129.
- Unanue, G. (2015): Adjusting to an invader: competitive interaction between *Discoglossus pictus* and *Bufo calamita* changes from asymmetry to symmetry with time since colonization. Tesis de Màster. Master En Ecología Terrestre y Gestión De La Biodiversidad. Universidad Autònoma de Barcelona.
- Urban, M.C. (2004) Disturbance heterogeneity determines freshwater metacommunity structure. *Ecology* 85, 2971–2978. doi: 10.1890/03-0631
- Urban, M.C., Phillips, B.L., Skelly, D.K. & Shine, R. (2007) The cane toad's (*Chaunus [Bufo] marinus*) increasing ability to invade Australia is revealed by a dynamically updated range model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274, 1413–9, doi: 10.1098/rspb.2007.0114
- Uzzell, T. & Tunner, H.G. (1983). An immunological analysis of Spanish and French water frogs. *Journal of Herpetology* 17, 320–326
- Van Bocxlaer, I., Loader, S.P., Roelants, K., Biju, S.D., Menegon, M. & Bossuyt, F. (2010) Gradual adaptation toward a range-expansion phenotype initiated the global radiation of toads. *Science* 327, 679–682.
- Van Buskirk, J. (2003) Habitat partitioning in European and North American pond-breeding frogs and toads. *Diversity and Distributions*, 9, 399–410.

- Van Kleunen, M., Dawson, W., Schlaepfer, D., Jeschke, J.M. & Fischer, M. (2010) Are invaders different? A conceptual framework of comparative approaches for assessing determinants of invasiveness. *Ecology Letters* 13, 947–958. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01503.x
- Vander Zanden, M.J., Casselman, J.M. & Rasmussen, J.B. (1999) Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature* 401, 464–467.
- Veith, M. & Martens, H. (1987) What's the part of *Discoglossus pictus*? analysis of an ecological niche in a frog community. pp 433-436 In: Proceedings of the 4th Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica. (J.J. van Gelder, H. Strijbosch & P.J.M. Bergers editors), Nijmegen, Netherland.
- Veith, M. & Martens, H. (1997). *Discoglossus pictus*. In: Gasc et al. (eds.) Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe. Societas Europa Herpetologica, Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris.
- Vences, M. & Grossenbacher, K. (2012) Unterfamilie Discoglossinae Günther, 1858; Gattung *Discoglossus* Otth, 1837 – Scheibenzüngler. In: Grossenbacher, K. (Ed.), Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas. Froschlurche I. Aula Verlag, Wiebelsheim, pp. 177–185
- Vences, M., Pous, P., Nicolas, V., Díaz-Rodríguez, J., Donaire, D., Hugemann, K., Hauswaldt, J. S., Amat, F., Barnestein, J.A.M., Bogaerts, S. et al (2014) New insights on phylogeography and distribution of painted frogs (*Discoglossus*) in northern Africa and the Iberian Peninsula, *Amphibia-Reptilia*, 35, 305–320. <http://doi.org/10.1163/15685381-00002954>
- Vilà, M., Gómez, A. & Maron, J.L. (2003) Are alien plants more competitive than their native conspecifics? A test using *Hypericum perforatum* L. *Oecologia* 137, 211–215. doi: 10.1007/s00442-003-1342-0
- Vilà, M., Valladares, F., Traveset, A., Santamaría, L. & Castro, P. (2008) Invasiones biológicas. Madrid. 215pp.
- Weis, J.S. (2010) The role of behavior in the success of invasive crustaceans. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 43, 83–98. doi: 10.1080/10236244.2010.480838
- Welk, E., Schubert, K. & Hoffmann, M.H. (2002) Present and potential distribution of invasive garlic mustard (*Alliaria petiolata*) in North America. *Diversity and Distributions*, 8, 219–233.
- Wellborn, G. A., Skelly, D. K., & Werner, E. E. (1996) Mechanisms creating community structure across a freshwater habitat gradient. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 337–63.

- Wells, K.D. (2007) Complex life cycles and the ecology of amphibian metamorphosis. In: Wells KD (ed) The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago Press, Chicago, pp 599–644
- Wendel, J.G. (1962) A problem in geometric probability. *Mathematica Scandinavica*, 11:109–111.
- Werner, E.E., & Peacor, S.D. (2003) A review of trait-mediated indirect interactions in ecological communities. *Ecology*, 84, 1083–1100.
- Wiggins, G.B., Mackay, R.J. & Smith, I.M. (1980) Evolutionary and ecological strategies of animals in annual temporary ponds. *Archiv für Hydrobiologica Suppl.* 58, 97–206.
- Wilbur, H.M. (1977) Propagule size, number, and dispersion patterns in *Ambystoma* and *Rana sylvatica*. *The American Naturalist* 111, 43–68.
- Wilbur, H.M. (1980) Complex life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11, 67–93, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000435>
- Wilbur, H.M. (1997) Experimental Ecology of Food Webs: Complex Systems in Temporary Ponds. *Ecology*, 78(8), 2279–2302.
- Wilbur, H.M., & Alford, R.A. (1985) Priority effects in experimental pond communities: responses of *Hyla* to *Bufo* and *Rana*. *Ecology*, 66(4), 1106–1114.
- Williamson, M., Fitter, A. (1996) The varying success of invaders. *Ecology* 77, 1661–1666.
- Williamson, I.A.N. (1999) Competition between the larvae of the introduced cane toad *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae) and native anurans from the Darling Downs area of southern Queensland. *Australian Journal of Ecology* 24, 636–643
- Williamson, M.H., & Fitter, A. (1996) The characters of successful invaders. *Biological Conservation*, 78, 163–170.
- Willis, A.J., Memmott, J. & Forrester, R.I. (2000) Is there evidence for the post-invasion evolution of increased size among invasive plant species? *Ecology Letters* 3, 275–283.
- Wintrebert, P. (1908) Quinzième Assemblée Générale Annuelle, Scéance du 25 février 1908. Intervention de M. Wintrebert sur la présence à Banyuls-sur-Mer (Pyénées Orientales) du *Discoglossus pictus* Otth. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 33, 54.
- Wolfe, L.M., Elzinga, J.A. & Biere, A. (2004) Increased susceptibility to enemies following introduction in the invasive plant *Silene latifolia*. *Ecology Letters* 7, 813–820. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00649.x
- Wu, J., Levin, S.A. (1994): A spatial dynamic modelling approach to pattern and process in an annual grassland. *Ecological Monographs* 64, 447–464.

- Zangari, F., Cimmaruta, R. & Nascetti, G. (2006) Genetic relationships of the Western Mediterranean painted frogs based on allozymes and mitochondrial markers: evolutionary and taxonomic inferences (Amphibia, Anura, Discoglossidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 87, 515–536
- Zera, A.J. & Denno, R.F. (1997) Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annual Review of Entomology* 42, 207–230. doi: 10.1146/annurev.ento.42.1.207
- Zhang, W., Hendrix, P.F., Snyder, B.A., Molina, M., Li, J., Rao, X., Siemann, E. & Fu, S. (2010) Dietary flexibility aids Asian earthworm invasion in North American forests. *Ecology* 91, 2070–9.



OILATZ SAIN SEBASTIÁN MENDOZA



TESIS DOCTORAL 2016

- Capítulo 1.** San Sebastián, O., Franch, M., Montori, A., Richter-Boix, A., Llorente, G. & Sillero, N. (2015) Exploring invasiveness of exotic species at macro-scale. *Biological Invasions* (en prep.).
- Capítulo 2.** Enriquez-Urzelai, U., San Sebastián, O., Garriga, N. & Llorente, G. A. (2013) Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia*, 173:117–127.
- Capítulo 3.** Pujol-Buxó, E., San Sebastián, O., Garriga, N. & Llorente, G. A. (2013) How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators? *Oikos*, 122: 19–29.
- Capítulo 4.** San Sebastián, O., Pujol-Buxó, E., Garriga, N., Richter-Boix, A. & Llorente, G. A. (2015) Differential trophic traits between invasive and native anuran tadpoles. *Aquatic Invasions*, 10 (4): 475–484.
- Capítulo 5.** San Sebastián, O., Navarro, J., Llorente, G.A. & Richter-Boix, A. (2015) Trophic strategies of a non-native and a native amphibian species in shared ponds. *PLoS ONE*, 10 (6): e0130549.+