



**Intrinsic properties and thermal adaptations
enhancing the invasion of marsh frogs,
*Pelophylax ridibundus s.l.***



Pablo Padilla

Laboratory of Ecology and Conservation of Amphibians (LECA)

Freshwater and Oceanic science Unit of reSearch (FOCUS)

Faculty of Sciences, University of Liège

March 2024

Thesis submitted for the degree of Doctor in Sciences

Supervisors : **Prof. Mathieu Denoël & Prof. Anthony Herrel**

Photo de couverture : Fabien Pille.

© Pablo Padilla 2023 : Toute reproduction partielle ou complète de ce document, par quelque procédé que ce soit ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation écrite de l'auteur.

**Intrinsic properties and thermal adaptations
enhancing the invasion of marsh frogs,
*Pelophylax ridibundus s.l.***

Pablo Padilla

Laboratory of Ecology and Conservation of Amphibians (LECA)

Freshwater and Oceanic science Unit of reSearch (FOCUS)

Faculty of Sciences, University of Liège

JURY COMPOSITION

Prof. Jean-Christophe Plumier, President, Professor, University of Liège, Belgium

Prof. Loïc Michel, Secretary, Assistant Professor, University of Liège, Belgium

Prof. Bruno Frédérick, Assistant Professor, University of Liège, Belgium

Prof. Miguel Carretero, Principal Researcher, University of Porto, Portugal

Prof. Raoul Van Damme, Full Professor University of Antwerp, Belgium

Prof. Mathieu Denoël, Supervisor, F.R.S.-FNRS Research Director, University of Liège,
Belgium

Prof. Anthony Herrel, Co-supervisor, CNRS Research Director, National Museum of Natural
History, Paris, France

REMERCIEMENTS

Aux experts ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse : Jean-Christophe Plumier, Loïc Michel, Bruno Frédérick, Miguel Carretero, Raoul Van Damme. Mais aussi au comité d'accompagnement au cours de ces quatre années de thèse : Mathieu Denoël, Anthony Herrel, Jean-Christophe Plumier et Eric Parmentier. Enfin, aux organismes ayant aidé à financer le projet : Les Fonds de la Recherche Scientifique-FNRS (financement FRIA, PDR numéro T.0070.19, bourses de mobilités) ; une bourse de mobilité de la Royal Belgian Zoological Society ; une bourse de mobilité de l'Université de Liège.

Grand merci à mes directeurs de thèse Mathieu et Anthony pour leur disponibilité et réactivité hors-pair malgré leur charge de travail en parallèle. Mais aussi pour ces bons moments passés hors milieu professionnel.

Aux membres de l'équipe de Paris et de Liège qui m'ont toujours été sympathiques : Hugues, Thierry, Khalid, Nadine, Manuela, Yamso, Jean-Phi, Arnaud, Alain, Valérie, Fanny, Françoise.

Tous mes amis de Liège : Fabien, Clément et Pauline le quatuor de choc ; Lucas, Laurane, Aurore, Laurie, Severine et Justine ; mais aussi de Paris : Laurie, Soline, Priscilla, Loïc, Khosrow, Jaleh, Anne-Claire. Tout est passé si vite et dans de si bonnes conditions, et cela grâce à vous. Merci aussi à tous mes amis et coéquipiers du RCAE et du club d'Embourg, la liste est longue, mais merci pour votre accueil chaleureux et votre convivialité, vous avez été la première des raisons qui m'a donné envie de passer plus de temps à Liège.

Hommage à mes amis de toujours : Chouchou ton amitié immuable depuis 18 ans et pour toutes ces drafts endiablées ; Juju, my bread, pour ta tendresse amicale dont je n'ai su entretenir le lien comme je l'aurais souhaité ; Lolo la chupacabra pour tes capacités de réflexion hors normes et ta pure gentillesse ; Kam pour toutes ces anecdotes de coloc' que je n'oublierai jamais ; Pupu pour ton inconscience t'approchant toujours trop proche de la mort et ta timidité dans ton amour envers tes amis ; Hiboule pour ta ponctualité inexistante et ton humour indémodable ; et Tonio pour ta loyauté et ton extravagance qui nous fait toujours tous sourire.

Et enfin, à mes parents pour m'avoir offert la chance de faire ce qui me plaisait sans me soucier du reste. De m'avoir offert cette ouverture d'esprit et cette curiosité sur le monde. D'avoir été toujours là sans attendre de retour. Et d'être simplement l'une des sources du bonheur que j'ai pourtant longuement cherché.

ABSTRACT

Human globalization indirectly increases the number of invasive species and contributes to climate change, two major threats to Earth's biodiversity. Amphibians, which typically have to go through a complex life cycle and for which body temperature is mainly regulated by their thermal environment and behavioural thermoregulation, are one of the most threatened classes of vertebrates. Climate change and invasive species, paradoxically often other amphibians, contribute to native amphibian population declines. Marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*), are one of these invaders. Originating from various geographic areas, including the Balkans, marsh frogs now show a widespread distribution across Western Europe due to massive introductions events and because of their successful invasion. Indeed, some invasive species are able to quickly establish and spread in their introduced environment because of genetic predispositions and adaptive plasticity. Despite previous studies on their establishment and impact on native communities, few studies have attempted to better understand the factors driving the invasion success of marsh frogs, particularly from a global warming perspective, even if some authors have alerted the scientific community on how warmer temperatures may have favoured their dispersal.

The goal of this thesis is to better understand, through behavioural and physiological measurements, the intrinsic potential of marsh frogs as successful invaders. First, my PhD aims to elucidate which anatomical features favour the physical performance of marsh frogs. More specifically, we investigate whether some traits better predict physical performance than others, making them selective targets that may affect the invasion of marsh frogs. Second, since amphibians are ectotherms and because the current climate is rapidly changing, my PhD aims to assess how thermal variations affects these physical performances. By linking their thermal responses to temperature in their introduced environment we will be able to suggest if

predicted climate change would enhance or limit their invasion. Finally, as most amphibians show a complex life cycle we test if these changes in temperature may similarly impact the biological activity of each developmental stage. Even if one stage might benefit from warmer temperatures, this might not be the case of other stages during their development, bringing therefore valuable knowledge for their management.

Our results showed that invasive marsh frogs present a panel of traits and plastic responses promoting their invasion. Anatomical features, such as bigger kidneys, gonads, and glutes muscles were found to be key traits predicting their physical performance and for which selection may lead to physiological changes that may affect each step of their invasion. These physical performances were shown, in adults, to benefit from warmer climate because of their broad thermal tolerances combined with a high thermal preference and traits maximized at temperatures which can be higher than their current environmental air temperature. This may therefore allow marsh frogs to expand their activity period and colonize previously underexploited shaded habitats. We also observed that warmer temperatures affect other stages such as tadpole and climax stages (at the onset of metamorphosis). However, both stages are able to handle temperatures that are greater than the current range of temperatures of their pond. Overall, these results show that alien marsh frogs are able to establish and invade new areas over Western Europe through the association of intrinsic and plastic traits. They also suggest that, in at least the next century, invasive marsh frogs will benefit from global warming because of their wide thermal tolerance and broad thermal physical performance breadth at each life stage.

In conclusion, through these studies, we improved our understanding of an invasive species, its adaptations and its responses to temperature. Overall, our results shed light on anatomical features and on the thermal range that drives the physiology of invasive marsh frogs,

revealing selective targets that could enhance their invasion but at the same time providing essential knowledge for their management. We also hope that these data will promote the adoption of integrative research methodologies, this through the investigation of multiple traits and the use of numerous test temperatures to bring a more nuanced understanding and, therefore, enhancing the characterization of species adaptations in light of their inherent complexity.

RESUME

La mondialisation a indirectement, à la fois, favorisé l'apparition d'espèces envahissantes, et contribué aux changements climatiques, deux menaces principales à la biodiversité. Les amphibiens, qui sont caractérisés par un cycle de vie complexe et pour qui la température corporelle est régulée par leur environnement et par leur thermorégulation comportementale, sont l'une des classes de vertébrés les plus menacées. Les changements climatiques ainsi que les espèces envahissantes, paradoxalement souvent d'autres amphibiens, contribuent tous deux au déclin des populations natives d'amphibiens. La grenouille rieuse, *Pelophylax ridibundus*, est l'un de ces envahisseurs. Originaire de nombreux endroits, dont les Balkans, la grenouille rieuse présente actuellement une vaste aire de répartition à travers l'Europe de l'Ouest, due à des introductions massives qui ont résulté en leur invasion. En effet, certaines espèces envahissantes sont capables de s'établir et de se disperser rapidement dans leur nouvel environnement du fait de leurs adaptations génétiques ainsi que leur plasticité adaptative. Malgré de précédentes études sur leur établissement et leurs impacts sur les communautés natives, peu d'études n'ont essayé de mieux comprendre les facteurs déterminant la réussite de leur invasion dans un contexte de réchauffement climatique, même si certains auteurs ont alerté la communauté scientifique de l'effet bénéfique des températures plus chaudes sur leur dispersion.

Cette thèse a pour objectif de mieux comprendre, à l'aide de mesures comportementales et physio-anatomiques, le potentiel intrinsèque des grenouilles rieuses en tant que « bon » envahisseurs. Dans un premier temps, ma thèse essaye d'élucider quelles propriétés anatomiques déterminent les performances physiques des grenouilles rieuses. Plus particulièrement, nous testerons si certains traits sont capables de mieux prédire les performances physiques par rapport à d'autres, faisant de ces traits de bonnes cibles de sélection pouvant affecter l'invasion des grenouilles rieuses. Dans un second temps, du fait que les

amphibiens sont des ectothermes et que le climat actuel change rapidement, ma thèse évalue comment les variations thermiques influencent ces performances. En mettant en lien leurs réponses thermiques avec la température de leur aire d'introduction nous suggérerons si les prédictions climatiques peuvent favoriser ou limiter l'invasion des grenouilles rieuses. Enfin, puisque la majorité des amphibiens montrent un cycle de vie complexe, nous testerons, pour chaque stade de vie, si ces variations de températures peuvent entraver leurs activités biologiques. Même si certains stades de vie peuvent bénéficier des températures plus chaudes de leur environnement, cela peut ne pas être le cas pour d'autres, apportant ainsi des connaissances essentielles à la gestion de ces grenouilles invasives.

Nos résultats révèlent que les grenouilles rieuses envahissantes présentent un panel de traits favorable à leur invasion ainsi que des réponses plastiques adaptées aux variations liées à leur environnement. Des propriétés anatomiques telles que : des reins plus gros, une masse de gonades plus importante, ou de plus gros muscles du fessier (*gluteus maximus*) ; ont été découvertes comme des traits clé prédisant leurs performances physiques individuelles et la sélection de ces traits engendrerait des changements physiologiques pouvant affecter chaque étape de leur invasion. Ces performances physiques, chez les grenouilles adultes, sont favorisées par un climat plus chaud, et cela grâce à leur large tolérance thermique combinée à une préférence thermique et des traits physiques maximisés à des températures pouvant être plus chaudes que celle de l'air dans leur environnement actuel. Ceci permettra aux grenouilles rieuses d'étendre leurs périodes d'activité ainsi que de coloniser des habitats ombragés auparavant sous-exploités. Nous avons aussi observé que des températures plus chaudes affectent d'autres stades de vie, tel que chez les têtards et les stades de climax au moment de la métamorphose. Toutefois chacun de ces stades est capable de supporter des températures qui sont bien plus chaudes que celles vécues dans leurs mares. Globalement, ces résultats nous montrent que les grenouilles rieuses non-natives sont capables de s'établir, de coloniser et

d'envahir de nouvelles zones en Europe de l'Ouest par l'association de traits intrinsèques à leur invasion ainsi qu'à l'aide de leurs adaptations plastiques. Ils suggèrent aussi que, au moins jusqu'au siècle prochain, les grenouilles rieuses envahissantes bénéficieront du réchauffement global dans la région méditerranéenne du fait de leur tolérance thermique étendue et de leurs performances physiques maximisées sur de larges gammes de températures, et cela à chaque stade de leur vie.

Pour conclure, à travers ces travaux, nous avons enrichi les connaissances sur une espèce envahissante, mais aussi notre compréhension sur leurs adaptations et leurs réponses physiologiques face à la température. Globalement, nos résultats révèlent des propriétés anatomiques et une plage de températures déterminant la physiologie des grenouilles rieuses invasives, mettant ainsi en évidence des cibles sélectives pouvant accroître leur invasion, mais de la même manière pouvant être des cibles d'intérêt dans leur gestion. Nous espérons que ces travaux favoriseront l'adoption de méthodes intégratrices en recherche, cela à travers l'étude de plusieurs traits biologiques et l'utilisation de plusieurs températures lors de test comportementaux, afin d'apporter une compréhension plus nuancée, et par conséquent, de mieux caractériser les adaptations des espèces en lumière de leur complexité inhérente.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER 1 – GENERAL INTRODUCTION	1
1.1 INVASIVE SPECIES.....	3
1.1.1 <i>Definition</i>	3
1.1.2 <i>Stages of invasion</i>	4
1.1.2.1 Transport and introduction of alien populations.....	4
1.1.2.2 Establishment of introduced populations	5
1.1.2.3 Spread of naturalized populations	5
1.1.3 <i>Biological invasion in a changing climate</i>	6
1.2 ADAPTATIONS OF INVASIVE AMPHIBIANS	8
1.2.1 <i>Generalities</i>	8
1.2.2 <i>Adaptations to invasion</i>	9
1.2.3 <i>Plastic responses to thermal changes</i>	9
1.3 INVASIVE MARSH FROGS (<i>PELOPHYLAX RIDIBUNDUS</i>)	11
1.3.1 <i>Generalities</i>	12
1.3.2 <i>Invasion of the Larzac Plateau, Southern France</i>	14
1.4 OBJECTIVES AND STRUCTURE OF THE THESIS	17
CHAPTER 2 – WHAT MAKES A GREAT INVADER? ANATOMICAL TRAITS AS PREDICTORS OF INTER-INDIVIDUAL VARIATION OF LOCOMOTOR PERFORMANCE AND METABOLIC RATE IN AN INVASIVE FROG, <i>PELOPHYLAX RIDIBUNDUS</i>	19
2.1 ABSTRACT	21
2.2 INTRODUCTION	23
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	26
2.3.1 <i>Study species</i>	26
2.3.2 <i>Housing</i>	26
2.3.3 <i>Respirometry</i>	27
2.3.4 <i>Terrestrial exertion</i>	28
2.3.5 <i>Jump forces</i>	29
2.3.6 <i>Anatomy and morphometrics</i>	29
2.3.7 <i>Statistical analysis</i>	30
2.4 RESULTS	33
2.4.1 <i>Absolute predictors of performance</i>	33
2.4.2 <i>Body size corrected predictors of performance</i>	35
2.5 DISCUSSION.....	38
2.5.1 <i>Kidneys, the main predictor of energy consumption</i>	38
2.5.2 <i>Endurance may not solely rely on anatomical traits</i>	39

2.5.3	<i>Large gluteal muscles facilitate powerful leaps</i>	40
2.5.4	<i>Conclusions</i>	40
2.6	REFERENCES	42
CHAPTER 2 – SUPPLEMENTARY MATERIAL APPENDIX S1		51
CHAPTER 3 – MAY FUTURE CLIMATE CHANGE PROMOTE THE INVASION OF THE MARSH FROG? AN INTEGRATIVE THERMO-PHYSIOLOGICAL STUDY		55
3.1	ABSTRACT	57
3.2	INTRODUCTION	59
3.3	MATERIALS AND METHODS.....	63
4.3.1	<i>Study organisms</i>	63
3.3.2	<i>Transportation and housing</i>	63
3.3.3	<i>Field temperatures</i>	64
3.3.4	<i>Critical temperatures (CT)</i>	64
3.3.5	<i>Preferred temperature (T_{pref})</i>	66
3.3.6	<i>Terrestrial exertion</i>	67
3.3.7	<i>Jump forces</i>	67
3.3.8	<i>Statistical analyses</i>	68
3.4	RESULTS	70
3.4.1	<i>Critical temperature</i>	70
3.4.2	<i>Preferred temperature</i>	72
3.4.3	<i>Stamina</i>	72
3.4.4	<i>Jump force</i>	74
3.5	DISCUSSION.....	75
3.5.1	<i>Marsh frogs, an overlooked invasive species with a broad thermal tolerance</i>	76
3.5.2	<i>Is warmer better?</i>	78
3.5.3	<i>Thermal performance differs across traits</i>	79
3.5.4	<i>Conclusions</i>	80
3.6	REFERENCES	81
CHAPTER 3 – SUPPLEMENTARY MATERIAL APPENDIX S1:		93
CHAPTER 4 – INVADING NEW CLIMATES AT WHAT COST? ONTOGENETIC DIFFERENCES IN THE THERMAL DEPENDENCE OF METABOLIC RATE IN AN INVASIVE AMPHIBIAN		97
4.1	ABSTRACT	99
4.2	INTRODUCTION	101
4.3	MATERIALS AND METHODS.....	103
4.3.1	<i>Metamorphosed marsh frogs</i>	103
4.3.2	<i>Tadpoles</i>	104

4.3.3	<i>Standard metabolic rate</i>	104
4.3.4	<i>Statistical analysis</i>	107
4.4	RESULTS	107
4.5	DISCUSSION.....	109
4.5.1	<i>Not extreme enough</i>	110
4.5.2	<i>The energetic cost of metamorphosis</i>	111
4.5.3	<i>Conclusion</i>	111
4.6	REFERENCES	112
CHAPTER 5 – GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSION		121
6.1	THE GREAT ESCAPE: THE HIGH DISPERSAL CAPACITY OF MARSH FROGS	123
6.2	WARMER IS BETTER FOR INVADERS.....	127
6.3	AN OMINOUS INVASION	129
6.4	CONCLUDING REMARKS	132
BIBLIOGRAPHY		135