

# TROPHIC IMPACT OF ADULT INVASIVE MARSH FROGS ON NATIVE AMPHIBIANS AND POND ECOSYSTEMS



Fabien Pille

Laboratory of Ecology and Conservation of Amphibians (LECA)

Freshwater and Oceanic science Unit of reSearch (FOCUS)

Faculty of Sciences, University of Liège

Thesis submitted for the degree of Doctor in Sciences

March 2024

Thèse soutenue le 19 mars 2024, à l'Université de Liège.

Photo de couverture : Fabien Pille

© La permission de l'auteur doit être obtenue pour toute reproduction de ce document.



Laboratory of Ecology and Conservation of Amphibians (LECA)  
Freshwater and Oceanic science Unit of reSearch (FOCUS)  
Faculty of Sciences, University of Liège



# TROPHIC IMPACT OF ADULT INVASIVE MARSH FROGS ON NATIVE AMPHIBIANS AND POND ECOSYSTEMS

Fabien Pille

Thesis submitted for the degree of Doctor in Sciences

March 2024

Jury composition:

**Prof. Nicolas Magain**, Predisent, University of Liège, Belgium

**Prof. Rudy Caparros Medigo**, University of Liège, Belgium

**Prof. Gilles Lepoint**, University of Liège, Belgium

**Dr. Alessandra Maria Bissattini**, University of Rome, Italy

**Prof. Raoul Manenti**, University of Milan, Italy

**Prof. Mathieu Denoël**, Supervisor, FNRS research director, University of Liège,  
Belgium

## Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon promoteur, Mathieu Denoël. Merci de m'avoir fait confiance afin de réaliser ce projet de doctorat. Merci pour ta grande disponibilité, tes innombrables et minutieuses relectures de manuscrits et ton exigence, qui m'auront aidé à toujours m'améliorer davantage. Merci également de t'être battu afin que nous puissions mener à bien notre travail malgré un contexte administratif et pandémique plus que difficile. Seul un fou oserait se tenir entre un herpeto et son triton.

Parce qu'un travail de doctorat reste avant tout un travail d'équipe, je souhaite également remercier mes principaux collaborateurs, Gilles Lepoint et Benjamin Lejeune. Merci Gilles de m'avoir appris à dompter l'un de ces effrayants spectromètres pleins de boutons et de pièces qui coûtent cher. Merci également à Benjamin, pour avoir pris le temps de venir me former sur le terrain, ainsi que pour toutes ces discussions autour de mes résultats. Merci à vous deux pour votre enthousiasme et vos conseils afin d'orienter mes recherches dans le monde aussi petit que mystérieux des isotopes stables.

Je n'aurai jamais pu réaliser tout ce travail sans l'aide de notre armée de stagiaires et compteurs de grenouilles acharnés. Merci à ceux que j'ai eu le plaisir d'encadrer : Laura, Soline, Charlotte, Anne-constance et Luca. Merci aussi à tous les autres avec qui j'ai partagé de belles aventures sur le terrain : Clément, Lisa, Justine, Aurore, Pauline, Emma, Victorine et Clarisse.

Cette thèse fut aussi l'opportunité de forger de belles amitiés. Merci Pablo, mon jumeau de thèse, pour ces tous ces échanges constructifs à propos de nos projets respectifs, mais surtout pour tous ces moments de déconnades en plus de quatre ans. Merci également à Clément, toujours fidèle et présent lors de toutes nos campagnes de terrain. Pauline, s'il te plait, arrête le coca. Leca, je suis heureux que tu sois venu t'investir au sein du LUCA. Bangers.

Le service de zoologie, c'est aussi une belle équipe de gens tous plus talentueux les uns que les autres, avec lesquels on peut avoir de super conversations, partager de savoureux sandwichs le midi et bien plus encore. Merci à Laurane, Eva, Léa, Oli, Laurie, Séverine, Justine, Matthieu, Michael, Alain, Fany, Billy, Jean-phi, Arnaud, Johann et tous ceux que j'oublie.

Je souhaite également remercier les membres du jury, Nicolas Magain, Rudy Caparros Medigo, Gilles Lepoint, Alessandra Bissattini et Raoul Manenti pour avoir accepté mon invitation.

Merci au FNRS, notamment au travers du PDR T.0070-19, ainsi qu'à l'ARD pour avoir fourni les ressources financières nécessaires au bon déroulement de ces travaux de recherche.

J'adresse mes remerciements aux propriétaires terriens Larzaciens pour nous avoir offert l'accès aux mares pendant ces quatre années, ainsi qu'à ceux qui nous ont loués nos quartiers généraux, des lieux qui sont désormais liés à de nombreux très bons souvenirs.

Enfin, je ne saurais exprimer toute la gratitude que j'ai envers mes parents et ma famille, qui m'ont toujours accordé leur soutien moral et matériel afin que je puisse faire de ma passion mon métier. Si je suis épanoui dans mon travail aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous.

En bref, je suis vraiment bien tombé et c'était super cool. Vivement la suite !

## Résumé

Les invasions biologiques concernent la plupart des écosystèmes et elles sont l'une des principales causes du déclin global de la biodiversité. A cause de leur isolation spatiale et de la nature étriquée de leurs réseaux trophiques, les écosystèmes d'eaux douces sont particulièrement menacés par les espèces exotiques envahissantes. Plus particulièrement, ce sont les prédateurs invasifs qui ont généralement les impacts les plus importants sur les communautés indigènes, en exerçant directement une pression de prédation sur leurs proies natives, ou par le biais indirect de cascades trophiques. Ce type d'impact a été fréquemment observé dans les mares, notamment après les invasions de prédateurs totalement aquatiques comme les poissons. Cependant, les impacts trophiques de prédateurs invasifs semi-terrestre, tels que les anoures, n'ont pas été suffisamment étudiés.

Les grenouilles rieuses (*Pelophylax ridibundus sensu lato*) sont les anoures les plus introduits en Europe de l'ouest où ils sont devenus invasifs. Ces grenouilles ont un impact négatif sur les espèces sœurs natives du même genre en les remplaçant progressivement par le biais d'hybridations. Cependant, aucune étude n'a porté sur leur potentiel impact trophique sur les communautés d'eaux douces, et plus particulièrement sur le groupe déjà très menacé des amphibiens.

Cette thèse a pour objectif d'étudier l'écologie trophique et les impacts écologiques des grenouilles rieuses sur les communautés indigènes des mares, et en particulier sur les amphibiens natifs. Afin de mener à bien ce travail, nous avons évalué la menace potentielle que représentent les grenouilles rieuses pour les amphibiens natifs. Dans un premier temps, grâce à l'analyse de leurs contenus stomacaux, nous avons étudié la pression de prédation qu'elles exerçaient sur les espèces natives. Nous avons ensuite modélisé les préférences

d'habitat des grenouilles rieuses et des amphibiens indigènes, ainsi que le chevauchement de leurs niches environnementales, afin d'évaluer le risque encouru par les espèces indigènes à l'échelle du réseau de mares. Dans le but d'étudier leur impact sur l'ensemble des communautés des mares (invertébrés et amphibiens), nous avons modélisé la niche trophique des grenouilles rieuses envahissantes et défini leur rôle fonctionnel complexe. Enfin, nous avons testé d'effet de la densité des grenouilles rieuses sur les densités des différents organismes aquatiques, ainsi que sur la structure globale du réseau trophique, grâce aux isotopes stables. Nous avons également considéré l'effet de la végétation aquatique, qui permet de soutenir des réseaux trophiques diversifiés, ainsi que de potentiellement atténué l'impact des grenouilles rieuses envahissantes.

Nous avons mené nos études dans une région où les grenouilles rieuses sont historiquement absentes : le plateau du Larzac (sud de la France). Afin d'étudier les interactions trophiques entre les grenouilles envahissantes et les espèces invasives, nous avons sélectionné 21 mares présentant des densités variables de grenouilles rieuses. Les niches environnementales et les préférences d'habitat des amphibiens ont été modélisées à partir d'un plus vaste réseau de 140 mares.

Nous résultats ont montrés que les grenouilles rieuses envahissantes prédataient toutes les espèces d'amphibiens natifs à leurs stades larvaires et/ou adultes. Les plus grandes grenouilles pouvaient consommer de larges proies comme les rainettes méridionales adultes (*Hyla meridionalis*). La pression de prédation exercée par les grenouilles rieuses invasives atteignait son maximum pendant la période de reproduction des espèces natives au printemps. Les estimations du nombre de rainettes méridionales et de tritons palmés (*Lissotriton helveticus*) consommés par les grenouilles rieuses indiquaient une pression de prédation importante sur leurs populations respectives à l'échelle de la mare. A l'échelle paysagère, les grenouilles rieuses ont colonisé la plupart des mares de

la zone. Elles ont présenté des préférences d'habitat similaires aux amphibiens natifs mais moins marquées. Les grenouilles rieuses avaient une niche environnementale très vaste, recouvrant par conséquent la majeure partie des niches respectives des espèces native d'amphibiens. Les grenouilles rieuses coexistaient avec les espèces natives dans la plupart des mares. Plus généralement, les grenouilles rieuses présentaient des stratégies alimentaires généraliste et opportuniste, ainsi qu'une niche trophique très large. Elles consommaient la majorité des espèces de macroinvertébrés aquatiques présents dans les mares malgré que leur niche trophique était dominée par les invertébrés terrestres. Leur niche trophique aquatique était dominée par des prédateurs pélagique comme les hetéroptères et les coléoptères. Les grenouilles rieuses avaient un impact sur la composition de la guildes des prédateurs aquatiques. Certains taxons tels que les Dytiscidae présentaient des faibles densités ainsi qu'une composition isotopique altérée en présence de grandes densités de grenouilles. Cependant, nos analyses n'ont pas mis en évidence d'effet sur la structure globale du réseau trophique (incluant les consommateurs primaires et les omnivores). La végétation aquatique avait un effet positif sur les densités de certains taxons impactés par les grenouilles rieuses. Elle soutenait également une plus grande diversité trophique au sein des communautés aquatiques, ainsi qu'une plus grande diversité de ressources basales.

Cette thèse de doctorat apporte de nouveaux éléments sur le déroulement et les conséquences des invasions biologiques par les grenouilles rieuses. Malgré la persistance des communautés aquatiques en présence des grenouilles rieuses envahissantes, nous alertons sur le risque qu'elles posent pour les amphibiens natifs. En plus du remplacement progressif des espèces de *Pelophylax*, notre étude montre que les lignées de grenouilles rieuses envahissantes peuvent exercer une pression de prédation importante sur les amphibiens natifs et des macroinvertébrés aquatiques clés. Bien que les invasions de *Pelophylax* soient



longtemps passées inaperçues du fait de la ressemblance entre les taxons invasifs et leurs espèces sœurs natives, notre étude détaille l'écologie trophique et spatiale de l'une des espèces les plus répandue dans le paléarctique. Elle éclaire par ailleurs sur les conséquences de leurs introductions en dehors de leur aire de répartition native.

## **Abstract**

Biological invasions are one of the main causes of biodiversity loss, and they impact most ecosystems worldwide. Because of their spatial isolation and their spatially constrained food webs, lentic freshwater ecosystems are particularly threatened by invasive alien species. More particularly, alien predators have some of the largest impacts on aquatic communities, by directly exerting predation pressure on their native prey, or indirectly through trophic cascades. This kind of impacts are well documented for fully aquatic predators such as invasive fish. However, the trophic impacts of invasive semi-terrestrial predators, such as anurans remain poorly studied in pond ecosystems.

Marsh frogs (*Pelophylax ridibundus sensu lato*) are the most widely introduced anurans in western Europe, where they became invasive. These ranids have impacted native sister species of the same genus through genetic pollution and replacement. However, no study assessed their trophic impact on pond communities, and more particularly, on the threatened group of amphibians.

The present thesis aimed to assess the trophic ecology and the impacts of adult marsh frogs on the recipient pond communities, with an emphasis on native amphibians. To complete this objective, we first assessed the potential threat exerted by invasive marsh frogs to native amphibians, by assessing their predation pressure based on stomach contents analysis. We then modeled the respective habitat preferences of invasive marsh frogs and native amphibians, as well as their environmental niche overlap to assess the risk incurred by native species at the pondscape scale. To evaluate the impact of marsh frogs on the overall pond communities, including macroinvertebrates and amphibians, we modeled their trophic niche and highlighted their complex functional role.

Finally, we tested the effect of invasive marsh frog density on the densities on pond consumers and their trophic structure using stable isotopes. We also considered the cover of submerged aquatic vegetation (SAV) to support pond food webs and to buffer the potential impact of marsh frogs.

We conducted our studies in an area historically devoid of *Pelophylax* frogs and now invaded by alien marsh frogs (*Pelophylax ridibundus sensu lato*), the Larzac plateau (southern France). To study the trophic interactions and impacts of marsh frogs, we selected 21 ponds invaded at various densities. Environmental niches and habitat preferences of amphibians were assessed considering a larger sample size of 140 ponds.

Our results showed that alien marsh frogs consumed all species of native amphibians of the area, either at the adult or larval stage. Larger frogs consumed larger amphibians such as adult Mediterranean tree frogs (*Hyla meridionalis*). The predation pressure exerted by invasive marsh frogs reached its maximum during the reproduction period of native species, in spring. Estimations of the number of adult Mediterranean tree frogs and palmate newts (*Lissotriton helveticus*) consumed by alien marsh frogs suggested strong predation pressure on their respective populations at the pond scale. At the landscape scale, alien marsh frogs colonized most ponds of the area. They had similar but less pronounced habitat preferences than native amphibians. Invasive frogs exhibited very large environmental niche, therefore overlapping most part of the respective niche of native amphibians. Marsh frogs co-occurred with native species in most ponds, therefore presenting frequent risk to native species. More broadly, alien marsh frogs exhibited generalist and opportunistic feeding strategies, and a particularly wide trophic niche. Their diet was dominated by terrestrial prey, but they also consumed most aquatic macroinvertebrates. Pelagic predators were dominant in the aquatic diet (e.g., heteropteran and coleopteran). Marsh frogs impacted the composition of the guild of pond predators. Some taxa such as

Dytiscidae showed lower densities and altered isotopic composition in the presence of large densities of marsh frogs. However, our analyses did not reveal any influence of marsh frogs on the trophic structure of the overall aquatic communities (including primary consumers and omnivores). SAV cover had opposite effect than marsh frogs on the densities of impacted consumers and it supported larger trophic diversity and basal resources.

This doctoral thesis provides new insights on the ecological consequences of the ongoing biological invasion by marsh frogs. Despite the persistence of native aquatic communities in presence of alien marsh frogs, we alert on the risk incurred by native amphibians. In addition to the previously demonstrated replacement of native sister species of *Pelophylax*, our work showed that invasive marsh frogs exert important predation pressure on native amphibian and some keystone macro-invertebrates. As the biological invasions by water frogs remained cryptic and understudied for a long time, our research highlights the trophic and spatial ecology of one of the most widespread species of the palearctic and give insights on the consequences they may have when translocated outside their native range.

## Table of contents

<b>CHAPTER 1 General introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1. Biological invasions: a driver of biodiversity loss .....	2
1.1.1. Definition and extent.....	2
1.1.2. Settlement and invasion success .....	3
1.1.3. Invasive alien predators .....	4
1.2. Freshwater ecosystems and invasive anurans.....	6
1.2.1. General context .....	6
1.2.2. Native amphibians facing invasive anurans .....	7
1.2.3. Impacts on freshwater communities.....	8
1.3. Invasive water frogs.....	10
1.3.1. Pelophylax lineages: who is who?.....	10
1.3.2. Ecological impacts.....	13
1.4. Objectives of the thesis.....	14
<b>CHAPTER 2 General material and methods .....</b>	<b>17</b>
2.1. Study area and model species .....	18
2.2. Ponds of the Larzac plateau .....	19
2.3. Data collection and field sampling .....	23
2.3.1. Dietary analysis.....	23
2.3.2. Amphibian survey.....	24
2.3.3. Aquatic communities.....	25
2.3.4. Stable isotopes.....	25
2.3.5. Health protocol.....	26
<b>CHAPTER 3 Predation pressure of invasive marsh frogs: a threat to native amphibians? .....</b>	<b>27</b>
Abstract.....	28
3.1. Introduction .....	29

3.2. Materials and methods.....	32
3.2.1. Study area and organisms .....	32
3.2.2. Sampling and prey identification.....	33
3.2.3. Statistical analyses .....	35
3.3. Results .....	37
3.3.1. Consumed Amphibians .....	37
3.3.2. Temporal variations.....	38
3.3.3. Body size.....	41
3.3.4. Predation pressure.....	43
3.4. Discussion.....	44
3.4.1. Predation on natives .....	44
3.4.2. Predation on larval and metamorphosed life stages .....	46
3.4.3. Phenology of predation .....	47
3.4.4. Size-selective predation .....	51
3.4.5. Environmental context .....	51
3.4.6. Predation pressure and conservation concerns.....	52
3.5. Conclusion .....	54
3.6. Supplementary material .....	56
<b>CHAPTER 4 One frog to rule them all: Wide environmental niche of invasive marsh frogs induces large co-occurrence patterns with native amphibian prey in ponds .....</b>	<b>62</b>
Abstract.....	63
4.1. Introduction .....	64
4.2. Methods .....	66
4.2.1. Study sites and species .....	66
4.2.2. Sampling .....	67
4.2.3. Statistical analyses .....	68
4.3. Results .....	70
4.3.1. Occupancy models.....	70

4.3.2. Co-occurrence and environmental niche overlap .....	72
4.4. Discussion.....	74
4.4.1. Ecological niche and invasion success.....	75
4.4.2. Co-occurrence and niche overlaps.....	76
4.4.3. Potential risk for native amphibians.....	77
4.5. Conclusions .....	79
4.6. Supplementary material .....	82

**CHAPTER 5 Functional and temporal facets of predation by marsh frogs across the aquatic-terrestrial ecotone of ponds and implications in the context of biological invasions.....86**

Abstract.....	87
5.1. Introduction .....	89
5.2. Methods .....	92
5.2.1. Study sites and species .....	92
5.2.2. Diet analyses.....	93
5.2.3. Habitat use .....	95
5.2.4. Data analyses.....	95
5.3. Results .....	97
5.3.1. Prey richness and trophic niche breadth .....	97
5.3.2. Feeding strategy and prey contribution.....	99
5.3.3. Seasonal variability of terrestrial and aquatic trophic diet composition .....	100
5.3.4. Occurrence and the relative part of predation in aquatic communities .....	102
5.3.5. Functional feeding groups and aquatic microhabitats.....	104
5.4. Discussion.....	105
5.4.1. Aquatic and terrestrial prey catchability.....	106
5.4.2. Asymmetrical predation in terrestrial and aquatic environments. ....	106
5.4.3. Trophic niche seasonal variations.....	108

5.4.4.	Functional and microhabitat diversity of aquatic prey .....	109
5.4.5.	Feeding opportunities across the water-air interface of ponds .....	110
5.5.	Conclusions .....	111
5.6.	Supplementary material .....	113
<b>CHAPTER 6 Submerged aquatic vegetation helps maintain the trophic structure of pond communities despite the impact of alien invasive marsh frogs .....</b>		<b>118</b>
	Abstract.....	119
6.1.	Introduction .....	120
6.2.	Methods .....	124
6.2.1.	Study area and species .....	124
6.2.2.	Habitat features and marsh frog densities.....	125
6.2.3.	Sampling and treatment .....	126
6.2.4.	Statistical analyses .....	128
6.3.	Results .....	131
6.3.1.	Diversity and densities of aquatic consumers .....	131
6.3.2.	Composition of aquatic communities.....	132
6.3.3.	Trophic structure .....	135
6.4.	Discussion.....	140
6.4.1.	Impact of invasive marsh frogs on aquatic communities and food web structure of ponds .....	140
6.4.2.	Habitat features as a driver of community structure .....	143
6.4.3.	Influence of SAV in the context of biological invasions and potential buffers against the impact of invasive predators .....	146
6.5.	Conclusions .....	147
6.6.	Supplementary material .....	149
<b>CHAPTER 7 General discussion .....</b>		<b>158</b>
7.1.	The success of water frogs' biological invasions .....	159
7.1.1.	Generalist strategies as drivers of invasions .....	159



7.1.2.	A new dominant species of amphibian communities.....	161
7.2.	The impacts of invasive marsh frogs on native amphibians.....	162
7.2.1.	Impact to populations of native amphibians.....	163
7.2.2.	The need of long-term survey of amphibian populations.....	164
7.2.3.	Other potential impacts on native amphibians.....	166
7.3.	Pond communities facing water frog invasions.....	168
7.3.1.	Trophic niche and predation pressure by adult alien marsh frogs .....	168
7.3.2.	Invasive marsh frogs' tadpoles in ponds communities.....	170
7.3.3.	Potential impacts on higher trophic ranks.....	171
7.3.4.	Trophic impact in hybrid populations of <i>Pelophylax</i> .....	171
7.3.5.	Pond communities facing multiple invaders.....	172
7.3.6.	Management of invasive <i>Pelophylax</i> .....	173
7.4.	Concluding remarks.....	175
<b>References</b>	.....	<b>177</b>