

## Variaciones entre especies de anfibios en sus respuestas morfológicas a la presencia de depredadores nativos e introducidos

L.A. Vázquez<sup>1,2,\*</sup>, M.Á. Rendón<sup>2</sup>, C. Díaz-Paniagua<sup>1,2</sup>, I. Gomez-Mestre<sup>1,2</sup>

(1) Grupo de Ecología, Evolución y Desarrollo, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Sevilla, España.

(2) Departamento de Ecología de Humedales, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Sevilla, España.

\* Autor de correspondencia: I. Gomez-Mestre [[igmestre@ebd.csic.es](mailto:igmestre@ebd.csic.es)]

> Recibido el 09 de noviembre de 2016 - Aceptado el 29 de septiembre de 2017

**Vázquez, L.A., Rendón, M.Á., Díaz-Paniagua, C., Gomez-Mestre, I. 2017. Variaciones entre especies de anfibios en sus respuestas morfológicas a la presencia de depredadores nativos e introducidos. *Ecosistemas* 26(3): 32-38. Doi.: 10.7818/ECOS.2017.26-3.05**

Las larvas de anfibios son presas habituales de distintos tipos de depredadores en los medios acuáticos. Sin embargo, cuando detectan las señales químicas de los depredadores (kairomonas), las larvas de anfibios pueden producir defensas inducidas. Un aspecto principal de estas defensas es la alteración morfológica de las larvas, que en presencia de depredador adoptan una forma del cuerpo más redondeada, una cola más corta, y cola y cresta más altas. No obstante, para activar la expresión de esta morfología los anfibios deben poder detectar con precisión las kairomonas de los depredadores. En ese sentido, la introducción de depredadores invasores por el hombre en los medios acuáticos supone un grave riesgo para las presas nativas puesto que éstas pueden no reconocer las señales químicas del nuevo depredador. En este estudio analizamos la respuesta morfológica de las larvas de cuatro especies de anfibios frente a dos tipos de depredadores: larvas de libélulas nativas y cangrejo rojo americano. Encontramos que tres de las cuatro especies estudiadas alteraron su morfología en presencia de libélulas, pero ninguna respondió a la presencia del cangrejo introducido. Además, el tamaño del efecto de la respuesta morfológica parece estar asociado a la velocidad de desarrollo de la especie de anfibio, de manera que las especies con un desarrollo más lento muestran una mayor capacidad de respuesta frente a depredadores y viceversa. Esto es consistente con el hecho de que especies con desarrollo rápido habitan charcas temporales o efímeras que normalmente albergan una baja abundancia de depredadores.

**Palabras clave:** plasticidad en el desarrollo; defensas inducidas; cangrejo rojo americano; invasiones biológicas; morfología geométrica

**Vázquez, L.A., Rendón, M.Á., Díaz-Paniagua, C., Gomez-Mestre, I. 2017. Among-species variation in the morphological responses of larval amphibians to native and invasive species. *Ecosistemas* 26(3): 32-38. Doi.: 10.7818/ECOS.2017.26-3.05**

Amphibian larvae are common prey to various types of predators, according to the type of aquatic system they develop in. When they detect water-borne chemical cues from predators (kairomones), amphibian larvae often produce inducible defenses. An important component of such defenses is the alteration of the shape of the larvae, which often consists in producing rounder bodies, shorter tails and deeper tail fins in the presence of predators. However, the activation of these inducible defenses critically depends on the accurate recognition of predator cues. In that context, the human introduction of alien predators with whom local prey species have not shared a joint evolutionary history may pose a grave threat in part because the native prey may fail to recognize the cues of the novel predators and hence fail to trigger the corresponding antipredator phenotype. In this study we analyze the morphological responses of larvae of four amphibian species to two different types of predators: native dragonfly larvae and introduced red-swamp crayfish. We find that three out of the four species readily respond altering their morphology to the presence of dragonflies, but they all fail to respond to introduced crayfish. Moreover, the effect size of the morphological response seems to be congruent with the duration of the larval period of each species so that faster developing species show lesser responses to dragonflies whereas slower developing species show greater responses to them. This is congruent with faster developing species occupying temporary or even ephemeral ponds which typically have lower predator abundance.

**Key words:** developmental plasticity; inducible defenses; red swamp crayfish; biological invasions; geometric morphometrics

### Introducción

Las larvas de anfibios juegan un papel funcional determinante en los medios acuáticos ya que tienen un efecto importante sobre la abundancia y composición de las comunidades de fitoplancton y zooplancton (Seale 1980; Whiles et al. 2006; Arribas et al. 2014). Además, los anfibios son elementos clave en el flujo de energía entre el medio terrestre y el acuático (Regeer et al. 2006) y entre distintos niveles tróficos del medio acuático, ya que son importantes herbívoros, depredadores y detritívoros, además de presa de una gran variedad de depredadores (Wilbur 1997; Kats y Ferrer 2003).

El riesgo de depredación al que se exponen las larvas de anfibios en el medio acuático varía a lo largo de su desarrollo. La mayoría de las especies de anfibios poseen un ciclo de vida complejo, con fases embrionaria y larvaria acuáticas y fases juvenil y adulta terrestres (Duellman y Trueb 1986; Gomez-Mestre et al. 2012), siendo las fases tempranas acuáticas particularmente vulnerables a la depredación (Wells 2007). Durante su fase embrionaria, los anfibios presentan pocos mecanismos de defensa, y en la mayoría de los casos esas defensas son de origen maternal. Así, las hembras pueden escoger lugares de ovoposición en función de su percepción de la abundancia de depredadores en el medio acuático

(Resetarits y Wilbur 1991; Touchon y Worley 2015), ocultar los huevos, por ejemplo colocándolos sobre hojas de plantas acuáticas que pliegan y sellan alrededor de cada huevo (Díaz-Paniagua 1989; Miaud 1993; Díaz-Paniagua et al. 2005), recubrir los huevos con gelatinas compactas que los protegen de hongos y pequeños depredadores (Gomez-Mestre et al. 2006; Porthault et al. 2007) o dotar a los huevos con sustancias tóxicas para los depredadores (Kats et al. 1988; Hanifin et al. 2003; Gunzburger y Travis 2005). Aparte de las defensas de origen parental, los embriones de anfibios tienen a menudo la capacidad de percibir la presencia de depredadores y de alterar en consecuencia el momento de la eclosión para minimizar el riesgo. Así, en ocasiones pueden retrasar el momento de eclosión para evitar a los depredadores de larvas (Sih y Moore 1993), o bien adelantarla para escapar de patógenos o de depredadores de huevos (Gomez-Mestre et al. 2008; Warkentin 2011).

Sin embargo, la fase larvaria en anfibios es tanto o más vulnerable a la depredación que la fase embrionaria, por su mayor duración y por la larga lista de depredadores, tanto vertebrados como invertebrados que suelen encontrarse en el medio acuático, que incluye desde insectos como larvas de libélulas, coleópteros y heterópteros, hasta vertebrados acuáticos, como peces, serpientes, galápagos, aves, e incluso otros anfibios, como los urodelos (Wells 2007). Además, durante la fase larvaria los anfibios no cuentan por lo general con defensas de origen parental, y dependen por tanto únicamente de sus propios mecanismos antidepredadores. Algunos modelos teóricos predijeron en su momento que la presencia de depredadores podría estimular el desarrollo de las larvas de anfibios para alcanzar una metamorfosis temprana y escapar así del riesgo de depredación al que se enfrenan en el medio acuático, si bien a expensas de metamorfosear con un menor tamaño (Wilbur y Collins 1973; Werner 1986). No obstante, la evidencia empírica acumulada desde entonces ha demostrado que cuando las larvas de anfibios detectan la presencia de un depredador, por lo general reducen considerablemente su tasa de actividad (Anholt et al. 2000; Benard 2004), lo que podría tener como consecuencia un retraso en la fecha de metamorfosis, no una aceleración del desarrollo, aunque por lo general este efecto no se observa (Benard 2004; Relyea 2007; Touchon et al. 2015). De hecho, cuando las larvas de anfibios conviven con depredadores reducen su tasa metabólica estándar (Barry y Syal 2013), así como otros indicadores de actividad metabólica como la actividad de enzimas antioxidantes asociadas al catabolismo de lípidos (Burraco et al. 2013).

Además de una disminución en la tasa de actividad, las larvas de anfibios a menudo experimentan alteraciones morfológicas cuando detectan señales químicas provenientes de depredadores (Smith y Van Buskirk 1995; Relyea 2004; Van Buskirk 2009). En general, las larvas de anuros desarrollan una forma del cuerpo más esférica y menos elipsoide, una cola más corta y una cresta más alta, e incluso experimentan variaciones en la pigmentación de la cola (McCollum y Leimberger 1997; Touchon y Warkentin 2008; Gomez-Mestre y Díaz-Paniagua 2011). El efecto que estos cambios morfológicos puedan tener sobre la capacidad natatoria de las larvas de anfibios es ambiguo. Si bien en ocasiones parece conferir una mayor velocidad de natación (Van Buskirk y McCollum 2000a; Wilson et al. 2005), a menudo el beneficio antidepredador de esta forma corporal no está necesariamente relacionado con una mayor eficacia natatoria (Van Buskirk y McCollum 2000b) sino que más bien parece dirigida a desviar el ataque del depredador hacia la cola, con el fin de evitar daños a las partes vitales del cuerpo (Van Buskirk et al. 2004).

Estas alteraciones en el comportamiento y la morfología de las larvas de anfibios inducidas por depredadores contribuyen a aumentar sustancialmente su supervivencia, pero por supuesto dependen críticamente de la capacidad de los renacuajos de reconocer de manera fiable a sus depredadores, a través de las señales o señales químicas que producen. Las defensas inducidas han evolucionado como respuesta plástica adaptativa a la presencia de depredadores con los que las larvas de anfibios han tenido una historia evolutiva de interacciones (Moore et al. 2004). Por lo tanto, la creciente y reciente irrupción de especies de depredadores

introducidos supone uno de los mayores peligros para conservación de las poblaciones de anfibios, en parte porque las defensas innatas pueden no llegar ni siquiera a activarse cuando los renacuajos no reconocen a la especie introducida como especie depredadora (Polo-Cavia et al. 2010; Gomez-Mestre y Díaz-Paniagua 2011). En este estudio analizamos la capacidad de reconocimiento y activación de defensas morfológicas en las larvas de cuatro especies de anfibios anuros frente a depredadores nativos, con los que comparten una larga historia evolutiva, y frente a depredadores introducidos, con los que apenas han coexistido unas pocas decenas de años. Nuestra hipótesis inicial predice que los anfibios deben alterar su morfología frente a los depredadores nativos, pero no frente a los depredadores introducidos. Además, cabe esperar que el grado de activación de defensas inducidas varíe entre las cuatro especies en función del riesgo de depredación. Así las especies que se reproducen en ambientes más efímeros están naturalmente expuestas a una menor abundancia de depredadores. Además, las especies adaptadas a ambientes efímeros han evolucionado una tasa de desarrollo más acelerado que les permite alcanzar la metamorfosis rápidamente, si bien esta aceleración en el desarrollo puede llevar asociada una menor capacidad de respuesta fenotípica a los depredadores (Richter-Boix et al. 2006b).

## Material y Métodos

En la primavera de 2009 recolectamos una porción de tres puestas diferentes de cada una de tres especies de anfibios en la Reserva Biológica de Doñana (RBD): sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*), rana común (*Pelophylax perezi*), y sapillo pintojo (*Discoglossus galganoi*). Además recolectamos larvas recién eclosionadas (estadio 25 Gosner; Gosner 1960) de ranita meridional (*Hyla meridionalis*). Los animales fueron transportados a un laboratorio situado dentro de la RBD, donde se dispusieron en bandejas con agua de pozo. En el caso de las especies colectadas en fase embrionaria se mantuvieron en las bandejas tras su eclosión y hasta 48h después de que alcanzaran el estadio 25 Gosner. Se mezclaron entonces los individuos de las tres puestas de cada especie para producir un *pool* común. En el caso de *H. meridionalis*, las larvas se mantuvieron en bandejas durante 48h en el laboratorio antes de iniciar el experimento, para permitir a las larvas aclimatarse a las nuevas condiciones.

También colectamos en distintas lagunas de la RBD larvas de libélulas (*Anax imperator*), consideradas como depredadores nativos, y adultos de cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*), considerados como depredadores introducidos. Estas dos especies de depredadores difieren evidentemente en muchos aspectos además de en el hecho de ser nativos o introducidos en el área de estudio. No obstante, ambos son depredadores voraces y eficaces y ejercen una fuerte presión de depredación sobre las larvas de anfibios. En el Parque Nacional de Doñana no hay cangrejos autóctonos con los que poder comparar su capacidad para inducir defensas antidepredadoras en los anfibios. El cangrejo rojo se introdujo en Doñana en 1974, y se extiende a muchas de las lagunas del parque en años de gran inundación, mientras que la temporalidad que caracteriza a la mayoría de ellas impide su supervivencia (Díaz-Paniagua et al. 2014). Los animales colectados para el experimento provenían de poblaciones que han estado en contacto discontinuo con el cangrejo rojo, pero los individuos en sí fueron *naïve* con respecto a este depredador por no haber tenido experiencia directa con este depredador a nivel individual.

Dispusimos las larvas de anfibios individualmente en cubos de 3 L, y se sometieron a un experimento con tres tratamientos diferentes: ausencia de depredador, presencia de libélula nativa y presencia de cangrejo introducido. La asignación de cada individuo a cada uno de los tres tratamientos se realizó aleatoriamente. Cada uno de los tres tratamientos contó con entre 10 y 21 réplicas, dependiendo de las especies de anfibios. En cada uno de los cubos se sumergió una pequeña jaula o cilindro de plástico sujeto por alambres con fondo de malla de fibra de vidrio. Los cubos asignados a un tratamiento con depredador (libélula o cangrejo) contuvieron

en el interior de la jaula un individuo de la especie depredadora correspondiente, mientras que los cubos control tuvieron jaulas vacías. Las larvas de anfibios fueron alimentadas con pienso de conejo tres veces por semana, y renovamos el agua una vez a la semana. Los depredadores nunca comieron en los cubos experimentales, para evitar confundir el efecto de las kairomonas de los depredadores con el de las señales de alarma de las presas coespecíficas. Para alimentar a los depredadores, por tanto, mantuvimos un *pool* de los mismos en acuarios adicionales, donde las libélulas se alimentaron con renacuajos de varias de las especies estudiadas y los cangrejos con macrófitos acuáticos. Todos los depredadores fueron mantenidos en ayunas 48h antes de ser introducidos en los contenedores experimentales para evitar que hubiera abundancia de heces, y que éstas contuvieran señales de alarma en el caso de las libélulas. Cada depredador se mantuvo en los cubos experimentales durante cinco días, siendo posteriormente sustituido por otro de los mantenidos en los acuarios adicionales. Las larvas de anfibios estuvieron expuestas a las condiciones experimentales durante 20 días.

Al cabo de ese tiempo, se extrajeron las larvas de anfibios y se fotografiaron lateralmente de una en una en un contenedor de metacrilato lleno de agua que poseía una pared deslizante para ajustar una rejilla de papel milimetrado como fondo de la fotografía. Para extraer las variables de la forma corporal de las larvas de anfibios se realizó un análisis morfométrico mediante asignación de *landmarks* sobre las fotografías con el programa *tpsDig2* (Rohlf 2008). El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo mediante un sistema de doble ciego de manera que la persona que realizó el análisis morfométrico desconocía el tratamiento del que provenía cada animal. Para el análisis morfométrico se utilizaron 5 *landmarks* (apertura de la boca, centro del ojo, extremo de la cola, y las inserciones dorsal y ventral de la cresta en el cuerpo del renacuajo) y 9 *semilandmarks*, éstos determinados automáticamente a intervalos regulares a lo largo de la curva que determinaba el contorno de la cola y el cuerpo. Las coordenadas de estos *landmarks* se importaron en *tpsRelw* (Rohlf 2007) para realizar un análisis de procrustes generalizado por mínimos cuadrados que nos permitió estandarizar el tamaño y rotar las coordenadas de los *landmarks* (Rohlf y Slice 1990), con el fin de poder estimar la deformación relativa (*relative warps*) entre individuos. Estos ejes de deformación relativa son ortogonales entre sí y equivalen a los valores de componentes principales en un análisis de morfometría geométrica (Orizaola et al. 2013). Las diferencias en distorsión relativa se visualizaron mediante *splines* de capa delgada (*thin-plate splines*) con el programa *tpsRelw*. Los valores obtenidos para el primer eje de deformación relativa (RW1) se usó posteriormente como variable en modelos generales lineales para examinar posibles diferencias en la forma de los renacuajos en los distintos tratamientos de depredador (Nunes et al. 2014). En los casos en los que encontramos un efecto significativo en la forma de las larvas de anfibios inducidos por el tratamiento experimental cuantificamos el tamaño de dicho efecto mediante el estadístico *g* de Hedge. Los análisis estadísticos para examinar diferencias en la forma de los renacuajos entre las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo en R (Core Development Team). Las variables extraídas del análisis morfométrico se ajustaron a las asunciones paramétricas de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo

que se llevaron a cabo modelos generales lineales con una distribución del error gaussiana y una función de enlace identidad. Estimamos comparaciones post-hoc entre los distintos niveles del factor 'depredador' mediante tests de Tukey.

Obtuvimos datos de la duración del periodo larvario para cada especie de anfibio como estimador de la velocidad de desarrollo. Para ello recurrimos a bases de datos públicas (*AmphibiaWeb*, *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*), y publicaciones especializadas como libros (García-Paris et al. 2004; Díaz-Paniagua et al. 2005) o artículos (Díaz-Paniagua 1986, 1992; Richter-Boix et al. 2006a, 2006b; Zeng et al. 2014). De cada una de estas fuentes se obtuvo el rango de duración del periodo larvario para cada especie, y calculamos la mediana del rango.

## Resultados

Dado que los depredadores se mantuvieron separados de las larvas durante los experimentos, la supervivencia fue completa en las cuatro especies de anfibios. En cuanto a la forma, la proporción de la varianza explicada por cada uno de los tres primeros ejes de deformación se muestra en la **tabla 1**.

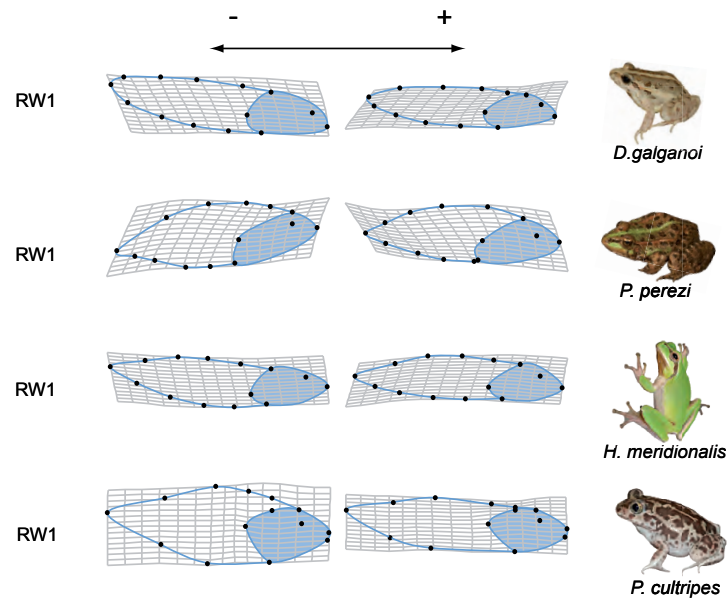
Los cambios morfológicos fueron diferentes en cada una de las especies. En la **figura 1** indicamos los extremos para el primer eje de variación en la forma (RW1). Por lo general, RW1 se relaciona con un gradiente de estilización, en el que las larvas de los anfibios variaban desde formas más alargadas y con crestas estrechas, hasta formas más cortas y con crestas más altas. El eje RW2 estuvo asociado con la posición relativa de la inserción de la cresta en el cuerpo de las larvas, tanto dorsal como ventralmente, y el ángulo que dibuja el perfil inicial de la cresta con la línea lateral del cuerpo (o con la línea vertebral). Estos ejes de variación en la forma no se debieron a simples cambios alométricos en función de variaciones en tamaño, como señaló el hecho de que no hubiera asociación entre los ejes de deformación y el tamaño del centroide en ningún caso.

Los modelos generales lineales indicaron que los tratamientos experimentales afectaron a las distintas especies de anfibios de manera diferente. En el caso de *D. galganoi*, ni la presencia de larvas de libélula ni la presencia de cangrejos produjeron cambios apreciables en la morfología de los renacuajos para los valores de ninguno de los dos ejes principales de variación de la forma (RW1:  $F_{2,34} = 0.038$ ,  $P = 0.97$ ; RW2:  $F_{2,34} = 0.93$ ,  $P = 0.41$ ). Sin embargo, los tratamientos experimentales sí alteraron la morfología de las larvas de las demás especies de anfibios. En el caso de *P. perezi*, el primer eje de deformación varió en función de la presencia de depredadores, si bien el efecto fue modesto (RW1:  $F_{2,35} = 3.47$ ,  $P = 0.042$ ), y no hubo diferencias significativas en los valores del segundo eje (RW2) en función de los tratamientos experimentales. Además, el efecto sobre RW1 se debió a la respuesta frente a las larvas de libélula, ya que las larvas de anfibios expuestas a cangrejo no se distinguieron de las de los controles (**Fig. 2**). El patrón fue similar para las otras dos especies, ya que los valores de RW1 variaron significativamente para *H. meridionalis* ( $F_{2,56} = 3.89$ ,  $P = 0.026$ ) y para *P. cultripes* ( $F_{2,34} = 23.25$ ,  $P < 0.0001$ ), y en ambos casos los cambios morfológicos se produjeron en respuesta a larvas de libélula, pero no en respuesta a cangrejos (**Fig. 2**).

**Tabla 1.** Proporción de la varianza explicada por cada uno de los ejes ortogonales de deformación morfológica (*relative warps*) obtenidos.

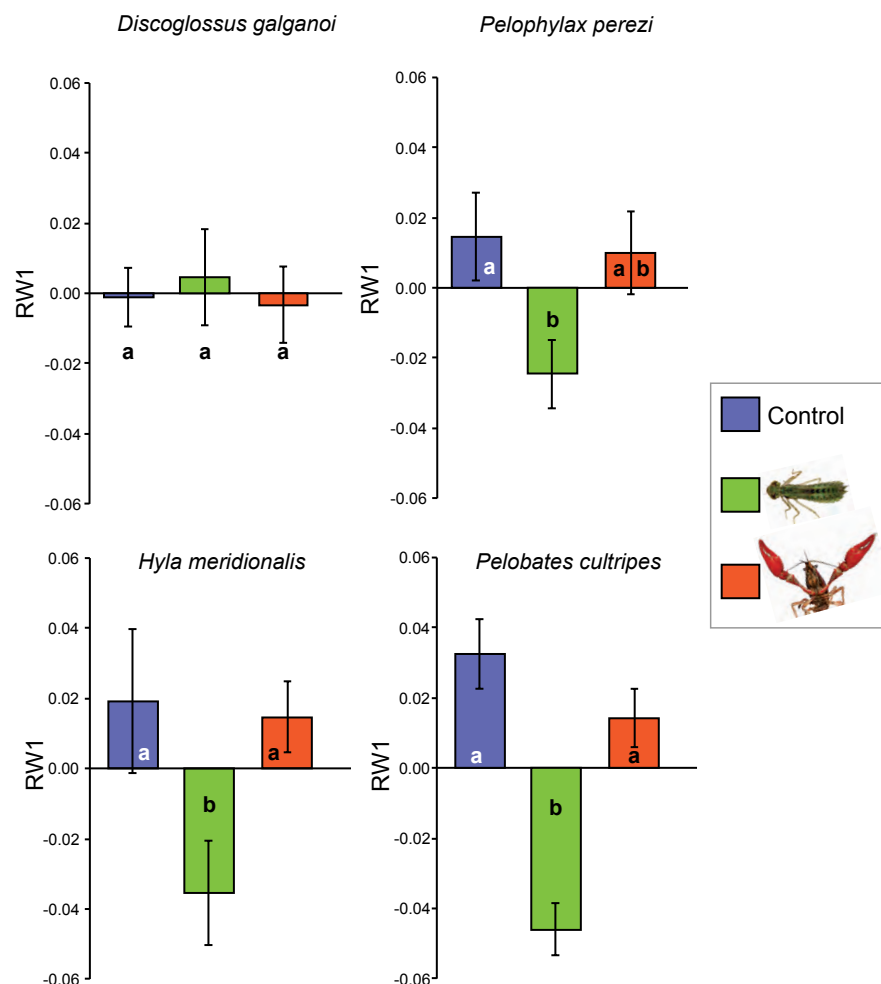
**Table 1.** Proportion of variance explained by each of the orthogonal axes of morphological distortion obtained (*relative warps*).

Variable	<i>Discoglossus galganoi</i>		<i>Hyla meridionalis</i>		<i>Pelophylax perezi</i>		<i>Pelobates cultripes</i>	
	% Var	% Var ac.	% Var	% Var ac.	% Var	% Var ac.	% Var	% Var ac.
RW1	46.40	46.43	37.92	37.92	26.48	26.48	42.81	42.81
RW2	17.65	64.07	22.35	60.27	18.04	44.52	14.70	57.53
RW3	11.65	75.72	12.23	72.50	14.80	59.32	11.07	68.59



**Figura 1.** Splines de capa fina mostrando los extremos de cada uno de los dos ejes principales de deformación morfológica larvaria para cada una de las especies de anfibios estudiadas.

**Figure 1.** Thin plate splines showing the extreme shapes of each of the two first relative warps for each of the four amphibian species studied.

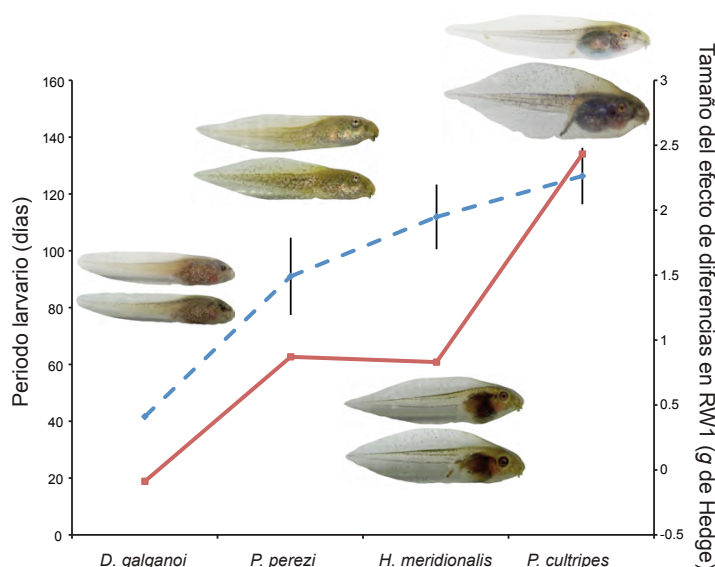


**Figura 2.** Diferencias por especies en la morfología de las larvas expuestas a distintas condiciones experimentales, según el primer eje de deformación morfológica (valores del eje RW1). En morado se indica los valores medios para cada una de las especies de las larvas mantenidas en ausencia de depredador (control). En verde se indican los valores medios para larvas expuestas a señales químicas de libélulas nativas, y en rojo los valores para renacuajos expuestos a señales químicas de cangrejo. Las barras de error señalan  $\pm$  error estándar. Los tratamientos señalados con distintas letras difieren estadísticamente entre sí.

**Figure 2.** Morphological changes in larvae of each of the four amphibian species depending on the experimental exposure to predators. In purple we indicate the mean of the RW1 values for larvae in the control treatment where no predator was present. Green and red indicate the mean values of larvae exposed to cues from dragonfly nymphs and crayfish, respectively. Brackets on the bars indicate  $\pm$  SE. Treatments marked with different letters are significantly different from each other according to post-hoc tests.



Estimamos el tamaño del efecto de la modificación morfológica inducida por libélula mediante el estadístico  $g$  de Hedge (Fig. 3). La única especie para la que encontramos cambios significativos en los valores del segundo eje de variación morfológica (RW2) fue *P. cultripes* ( $F_{2,34} = 5.31$ ,  $P < 0.01$ ) y de nuevo los tests *post-hoc* indicaron que los renacuajos expuestos a larvas de libélula cambiaron su morfología mientras que los expuestos a cangrejo no la cambiaron (Fig. 2).



**Figura 3.** Relación entre el periodo larvario y la magnitud de la respuesta morfológica inducida por libélulas nativas. El periodo larvario (i.e. tiempo transcurrido desde la eclosión hasta la metamorfosis) para cada una de las especies de anfibios, indicado por una línea discontinua azul varía notablemente entre especies. El tamaño del efecto del depredador sobre la morfología de las larvas fue determinado mediante el estadístico  $g$  de Hedge, que indica que la especie con una tasa de desarrollo más rápida (*D. galganoi*) no mostró plasticidad morfológica frente a depredador alguna, mientras que la de desarrollo más lento mostró la mayor capacidad plástica en morfología (*P. cultripes*), con las dos especies intermedias en su desarrollo mostrando plasticidades intermedias.

**Figure 3.** Relationship between the larval period and the magnitude of the morphological response induced by native dragonfly nymphs. The larval period (i.e. time elapsed from hatching until metamorphosis) for each of the amphibian species is indicated and connected with a blue dashed line. It varies conspicuously across species. The effect size of predator-induced morphological changes, as estimated by Hedge's  $g$ , indicates that the fastest developing species (*D. galganoi*) did not show any significant predator-induced alteration in its morphology. However, the species with the slowest developmental rate (*P. cultripes*) showed the largest effect size in morphological induction, with the two intermediate species showing intermediate durations of larval period and intermediate effect sizes of their morphological variation.

## Discusión

Las larvas de anfibios son capaces de discriminar notablemente entre distintos tipos de señales químicas, tanto las de alarma emitidas por otras larvas de anfibios, como las de distintos tipos de depredador (Relyea 2004; Touchon y Warkentin 2008). En ocasiones son capaces incluso de ajustar sus respuestas antidepredadoras en función de la biomasa y número de presas consumidas por los depredadores (McCoy et al. 2012), o la distancia filogenética de las otras especies de anfibios consumidas (Schoeppner y Relyea 2005). La respuesta a los depredadores nativos con los que los anfibios comparten cierta historia evolutiva es por tanto robusta y eficaz, si bien puede verse interferida por factores antropogénicos, como la contaminación del agua por fertilizantes como el ácido húmico o el nitrato de amonio (Polo-Cavia et al. 2016).

En este estudio comprobamos que las larvas de varias especies de anfibios del Parque Nacional de Doñana modificaron su morfología acortando su longitud corporal y elevando la altura de la cresta

frente a depredadores nativos como las larvas de libélula. Las diferencias en la magnitud de la respuesta frente a los depredadores nativos puede estar relacionada con la duración del periodo larvario (Richter-Boix et al. 2007), de la que también depende la posibilidad de utilizar hábitats reproductivos de menor duración, y con menor presión de depredación, o mayor duración, donde coexisten con mayor número de depredadores (Kats et al. 1988; Skelly 1997). En efecto, observamos que *D. galganoi*, la especie con un periodo larvario más corto, es decir, que alcanza la metamorfosis más rápido, no mostró capacidad de alterar su morfología en presencia de depredadores (Fig. 3). Las otras tres especies sí respondieron morfológicamente a la presencia de libélulas, pero observamos un patrón según el cual, a mayor duración del periodo larvario, mayor es el tamaño del efecto de los depredadores nativos sobre su morfología (Fig. 3). Las especies de desarrollo rápido están adaptadas a cuerpos de agua de corta duración, en los que la abundancia de depredadores es habitualmente baja. Además, uno de los mecanismos principales que posibilitan el desarrollo larvario acelerado en anfibios es el incremento basal de la producción de glucocorticoides (Denver 2013; Gomez-Mestre et al. 2013), que tiene como consecuencia una mayor actividad y tasa metabólica de las larvas. Por el contrario, la presencia de depredadores ocasiona una menor actividad metabólica (Barry y Syal 2013; Burraco et al. 2013), lo que sugiere una cierta incompatibilidad funcional entre la aceleración del desarrollo y la respuesta morfológica a los depredadores.

Por otro lado, las especies que respondieron a libélulas no activaron los cambios morfológicos en presencia de señales químicas de cangrejo rojo americano en ningún caso. La falta de respuesta podría deberse a que la morfología 'antidepredadora' no fuera eficaz frente a cangrejos introducidos, pero Gomez-Mestre y Díaz-Paniagua (2011) descartaron experimentalmente esta explicación al mostrar que las larvas de *P. perezi* inducidas por libélulas también sobrevivían mejor frente a cangrejo rojo americano. Por tanto, parece que las larvas de anfibios de estas especies no reconocen de manera innata al cangrejo rojo americano como un depredador potencial.

Algunos estudios realizados con las mismas especies en poblaciones del sur de Portugal detectaron que las larvas de algunas poblaciones sí parecían responder a la presencia de cangrejos (Nunes et al. 2012, 2014). Sin embargo, en esos experimentos los cangrejos fueron alimentados con larvas de la especie de estudio, por lo que es probable que al menos parte de la respuesta observada se haya inducido por las propias señales de alarma de la presa. En efecto, distinguiendo experimentalmente tratamientos en los que los cangrejos eran alimentados con renacuajos o con plantas, detectamos cierta respuesta comportamental y morfológica cuando los cangrejos consumían renacuajos (Gomez-Mestre y Díaz-Paniagua 2011). Existen casos documentados en los que las larvas de anfibios de poblaciones que han estado en contacto con depredadores introducidos por un espacio de al menos 80-100 años, parecen haber evolucionado el reconocimiento innato hacia ellos (Kiesecker y Blaustein 1997; Griffiths et al. 1998; Moore et al. 2004). En el caso de la introducción del cangrejo rojo americano en el área del Parque Nacional de Doñana, aún no ha transcurrido tanto tiempo como en esos casos. Sin embargo, a pesar del notable impacto del cangrejo rojo en las lagunas a las que accede, no hemos detectado extinciones locales de las poblaciones de anfibios en el Parque Nacional de Doñana, debido a que la extensa red de cuerpos de agua (> 3.000) y su gran heterogeneidad interanual constituyen un robusto conjunto de humedales que da refugio a las poblaciones de anfibios (Gómez-Rodríguez et al. 2009, 2010). Además, existe la posibilidad de que las larvas de anfibios empleen su capacidad de aprendizaje para asociar señales químicas de depredador con señales de alarma de individuos coespecíficos (Ferrari et al. 2009; Gonzalo et al. 2009; Polo-Cavia y Gomez-Mestre 2014) y de esta manera aprendan a responder a depredadores introducidos. Ese aprendizaje permite a las larvas condicionadas sobrevivir mejor frente al cangrejo rojo (Polo-Cavia y Gomez-Mestre 2014), lo que podría atenuar el impacto del depredador introducido hasta que surja el reconocimiento innato como consecuencia de la selección natural.

## Referencias

- Anholt, B.R., E. Werner, Skelly, D.K. 2000. Effect of food and predators on the activity of four larval ranid frogs. *Ecology* 81:3509-3521.
- Arribas, R., Díaz-Paniagua, C., Gomez-Mestre, I. 2014. Ecological consequences of amphibian larvae and their native and alien predators on the community structure of temporary ponds. *Freshwater Biology* 59: 1996-2008.
- Barry, M., Syal, S. 2013. Metabolic responses of tadpoles to chemical predation cues. *Hydrobiologia* 700:267-276.
- Benard, M.F. 2004. Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annual Review of Ecology and Systematics* 35:651-673.
- Burraco, P., Duarte, L.J., Gomez-Mestre, I. 2013. Predator-induced physiological responses in tadpoles challenged with herbicide pollution. *Current Zoology* 59:475-484.
- Denver, R.J. 2013. Neuroendocrinology of amphibian metamorphosis. En: S. Yun-Bo, S. (ed.) *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 103. pp. 195-227. Academic Press. New York, NY. Estados Unidos.
- Díaz-Paniagua, C. 1986. Reproductive period of amphibians in the Biological Reserve of Doñana (SW Spain). *Studies in Herpetology*: 429-432.
- Díaz-Paniagua, C. 1989. Oviposition behavior of *Triturus marmoratus pygmaeus*. *Journal of Herpetology*: 159-163.
- Díaz-Paniagua, C. 1992. Variability in timing of larval season in an amphibian community in SW Spain. *Ecography* 15:267-272.
- Díaz-Paniagua, C., Gomez Rodríguez, C., Portheault, A., de Vries, W. 2005. Los anfibios de Doñana. Ministerio de Medio Ambiente, Spain.
- Díaz-Paniagua, C., Keller, C., Florencio, M., Andreu, A.C., Portheault, A., Gómez-Rodríguez, C., Gomez-Mestre, I. 2014. Rainfall stochasticity controls the distribution of invasive crayfish and its impact on amphibian guilds in Mediterranean temporary waters. *Hydrobiologia* 728:89-101.
- Duellman, W.E., Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw-Hill, New York, NY. Estados Unidos.
- Ferrari, M., Brown, G., Messier, F., Chivers, D. 2009. Threat-sensitive generalization of predator recognition by larval amphibians. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63:1369-1375.
- García-Paris, M., Montori, A., Herrero, P. 2004. Amphibia. Lissamphibia. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC, Madrid.
- Gomez-Mestre, I., Díaz-Paniagua, C. 2011. Invasive predatory crayfish do not trigger inducible defences in tadpoles. *Proceedings of the Royal Society B* 278:3364-3370.
- Gomez-Mestre, I., Touchon, J.C., Warkentin, K.M. 2006. How amphibian eggs survive with pathogenic water molds: parental and embryo defenses and the egg-stage benefit of a larval predator. *Ecology* 87:2570-2581.
- Gomez-Mestre, I., Wiens, J.J., Warkentin, K.M. 2008. Evolution of adaptive plasticity in an ontogenetic switch point: risk-sensitive hatching in neotropical leaf-breeding treefrogs (*Agalychnis*, Hylidae). *Ecological Monographs* 78:205-224.
- Gomez-Mestre, I., Pylon, R.A., Wiens, J.J. 2012. Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. *Evolution* 66:3687-3700.
- Gomez-Mestre, I., Kulkarni, S., Buchholz, D.R. 2013. Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. *PloS One* 8:e84266.
- Gómez-Rodríguez, C., Díaz-Paniagua, C., Serrano, L., Florencio, M., Portheault, A. 2009. Mediterranean temporary ponds as amphibian breeding habitats: the importance of preserving pond networks. *Aquatic Ecology* 43:1179-1191.
- Gómez-Rodríguez, C., Díaz-Paniagua, C., Bustamante, J., Portheault, A., Florencio, M. 2010. Inter-annual variability in amphibian assemblages: implications for diversity assessment and conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 20:668-677.
- Gonzalo, A., López, P., Martín, J. 2009. Learning, memorizing and apparent forgetting of chemical cues from new predators by Iberian green frog tadpoles. *Animal Cognition* 12:745-750.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190.
- Griffiths, R.A., Schley, L., Sharp, P.E., Dennis, J.L., Román, A. 1998. Behavioural responses of Mallorcan midwife toad tadpoles to natural and unnatural snake predators. *Animal Behaviour* 55:207-214.
- Gunzburger, M.S., Travis, J. 2005. Critical literature review of the evidence for unpalatability of amphibian eggs and larvae. *Journal of Herpetology* 39:547-571.
- Hanifin, C. T., Brodie, E.D. 2003. Tetrodotoxin levels in eggs of the rough-skin newt, *Taricha granulosa*, are correlated with female toxicity. *Journal of Chemical Ecology* 29:1729-1739.
- Kats, L.B., Ferrer, R.P. 2003. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions* 9:99-110.
- Kats, L.B., Petranks, J.W., Sih, A. 1988. Antipredator defenses and the persistence of amphibian larvae with fishes. *Ecology* 69:1865-1870.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R. 1997. Population differences in responses of red-legged frogs (*Rana aurora*) to introduced bullfrogs. *Ecology* 78:1752-1760.
- McCollum, S., Leimberger, J. 1997. Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia* 109:615-621.
- McCoy, M.W., Touchon, J.C., Landberg, T., Warkentin, K.M., Vonesh, J.R. 2012. Prey responses to predator chemical cues: disentangling the importance of the number and biomass of prey consumed. *PloS One* 7:e47495.
- Miaud, C. 1993. Predation on newt eggs (*Triturus alpestris* and *T. helveticus*): identification of predators and protective role of oviposition behaviour. *Journal of Zoology* 231:575-581.
- Moore, R.D., Griffiths, R.A., O'Brien, C.M., Murphy, A., Jay, D. 2004. Induced defences in an endangered amphibian in response to an introduced snake predator. *Oecologia* 141:139-147.
- Nunes, A.L., Richter-Boix, A., Laurila, A., Rebelo, R. 2012. Do anuran larvae respond behaviourally to chemical cues from an invasive crayfish predator? A community-wide study. *Oecologia* 171:115-127.
- Nunes, A.L., Orizaola, G., Laurila, A., Rebelo, R. 2014. Rapid evolution of constitutive and inducible defenses against an invasive predator. *Ecology* 95:1520-1530.
- Orizaola, G., Dahl, E., Nicieza, A.G., Laurila, A. 2013. Larval life history and anti-predator strategies are affected by breeding phenology in an amphibian. *Oecologia* 171:873-881.
- Polo-Cavia, N., Gomez-Mestre, I. 2014. Learned recognition of introduced predators determines survival of tadpole prey. *Functional Ecology* 28:432-439.
- Polo-Cavia, N., Gonzalo, A., López, P., Martín, J. 2010. Predator recognition of native but not invasive turtle predators by naïve anuran tadpoles. *Animal Behaviour* 80:461-466.
- Polo-Cavia, N., Burraco, P., Gomez-Mestre, I. 2016. Low levels of chemical anthropogenic pollution may threaten amphibians by impairing predator recognition. *Aquatic Toxicology* 172:30-35.
- Portheault, A., Díaz-Paniagua, C., Gomez-Rodríguez, C. 2007. Predation on amphibian eggs and larvae in temporary ponds: The case of *Bufo calamita* in Southwestern Spain. *Revue D'Ecologie-La Terre Et La Vie* 62:315-322.
- Regester, K.J., Lips, K.R., Whiles, R. 2006. Energy flow and subsidies associated with the complex life cycle of ambystomatid salamanders in ponds and adjacent forest in southern Illinois. *Oecologia* 147:303-314.
- Relyea, R.A. 2004. Fine-tuned phenotypes: Tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. *Ecology* 85:172-179.
- Relyea, R.A. 2007. Getting out alive: how predators affect the decision to metamorphose. *Oecologia* 152:389-400.
- Resetarits, W.J., Wilbur, H.M. 1991. Calling site choice by *Hyla chrysoscelis*: effect of predators, competitors, and oviposition sites. *Ecology* 72:778-786.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A. 2006a. Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia* 27:549-559.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A. 2006b. 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. 2007. A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. *Hydrobiologia* 583:43-56.
- Rohlf, F.J. 2007. Program tpsRelw. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York, NY. Estados Unidos.

- Rohlf, F.J. 2008. Program tpsDig2. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York, NY. Estados Unidos.
- Rohlf, F.J., Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology* 39:40-59.
- Schoepfner, N.M., Relyea, R.A. 2005. Damage, digestion, and defence: the roles of alarm cues and kairomones for inducing prey defences. *Ecology Letters* 8:505-512.
- Seale, D.B. 1980. Influence of amphibian larvae on primary production, nutrient flux, and competition in a pond ecosystem. *Ecology* 6:1531-1550.
- Sih, A., Moore, R.D. 1993. Delayed hatching of salamander eggs in response to enhanced larval predation risk. *American Naturalist* 142:947-960.
- Skelly, D.K. 1997. Tadpole communities: pond permanence and predation are powerful forces shaping the structure of tadpole communities. *American Scientist* 85:36-45.
- Smith, D.C., Van Buskirk, J. 1995. Phenotypic design, plasticity and ecological performance in two tadpole species. *American Naturalist* 145:211-233.
- Touchon, J.C., Warkentin, K.M. 2008. Fish and dragonfly nymph predators induce opposite shifts in color and morphology of tadpoles. *Oikos* 117:634.
- Touchon, J.C., Worley, J.L. 2015. Oviposition site choice under conflicting risks demonstrates that aquatic predators drive terrestrial egg-laying. *Proceedings of the Royal Society B* 282: 20150376.
- Touchon, J.C., McCoy, M.W. Landberg, T., Vonesh, J.R., Warkentin, K.M. 2015. Putting  $\mu$ g in a new light: plasticity in life history switch points reflects fine-scale adaptive responses. *Ecology* 96:2192-2202.
- Van Buskirk, J. 2009. Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature? *Ecological Monographs* 79:681-705.
- Van Buskirk, J., McCollum, S.A. 2000a. Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles: morphology and behaviour influence mortality risk from predation. *Journal of Evolutionary Biology* 13:336-347.
- Van Buskirk, J., McCollum, S.A. 2000b. Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *Journal of Experimental Biology* 203:2149-2158.
- Van Buskirk, J., Aschwanden, J., Buckelmuller, I., Reolon, S., Ruttiman, S. 2004. Bold tail coloration protects tadpoles from dragonfly strikes. *Copeia* 2004:599-602.
- Warkentin, K.M. 2011. Plasticity of hatching in amphibians: evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology* 51:111-127.
- Wells, K.D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago Press, Chicago, IL., Estados Unidos.
- Werner, E.E. 1986. Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *American Naturalist* 128:319-341.
- Whiles, M.R., Lips, K.R., Pringle, C.M., Kilham, S.S., Bixby, R.J., Brenes, R., Connelly, S., Colon-Gaud, J.C., Hunte-Brown, M., Huryn, A.D., Montgomery, C., Peterson, S. 2006. The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4:27-34.
- Wilbur, H.M. 1997. Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. *Ecology* 78:2279-2302.
- Wilbur, H.M., Collins, J.P. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182:1305-1314.
- Wilson, R., Kraft, P., van Damme, R. 2005. Predator-specific changes in the morphology and swimming performance of larval *Rana lessonae*. *Functional Ecology* 19:238-244.
- Zeng, C., Gomez-Mestre, I., Wiens, J.J. 2014. Evolution of rapid development in spadefoot toads is unrelated to arid environments. *PloS One* 9:e96637.