

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
OPCIÓN ETOLOGÍA**

**Capacidad de la rana nativa *Pseudis minuta*
de reconocer y responder a las señales
químicas de un depredador introducido
(*Lithobates catesbeianus*)**

Nadia Kacevas Moreno

Orientador: Dr. Gabriel Laufer

Co-orientador: Dra. Lucía Ziegler

*Centro Universitario Regional Este, Maldonado, Udelar
Área Biodiversidad y Conservación, Museo Nacional de Historia Natural*

Febrero 2018

TESINA DE GRADO, LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROFUNDIZACIÓN EN ETOLOGÍA

Tribunal:

Dr. Marcelo Loureiro

Departamento de Ecología y Evolución. Universidad de la República.

Dra. María José Albo

Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Dr. Gabriel Laufer

Área de Biodiversidad y Conservación. Museo Nacional de Historia Natural.

Dra. Lucía Ziegler

Departamento de Ecología y Gestión Ambiental. Centro Universitario Regional Este, Maldonado. Universidad de la República.

Contenido

Resumen	1
Introducción	2
Hipótesis	6
Materiales y métodos.....	6
<i>Obtención y mantenimiento de los animales</i>	7
<i>Montaje del experimento</i>	8
<i>Registro y medición de actividad</i>	10
<i>Análisis de datos</i>	11
Resultados.....	12
Discusión	17
Bibliografía.....	21
Agradecimientos	28
Anexo	29

Resumen

Las invasiones biológicas son una de las principales causas de pérdida de biodiversidad tanto a nivel regional como global. El efecto de un depredador exótico en las poblaciones de presas nativas puede ser mayor si éstas no son capaces de detectar sus señales como una amenaza. La invasión de rana toro en Uruguay nos permite poner a prueba si las presas nativas susceptibles a la depredación por esta invasora son capaces de detectarla y responder a sus señales como lo harían frente a un depredador nativo. En un experimento de laboratorio se evaluó si los individuos adultos de la rana nativa *Pseudis minuta* de un sitio invadido, detectan las señales químicas de rana toro (adulto y renacuajo). Se utilizaron como controles positivos las señales químicas de depredadores nativos tortuga y tararira, como control negativo agua de clorada y para calibrar respuesta anti-depredador, señales de estrés de un conespecífico. Se colocó un individuo de *P. minuta* en un acuario con agua y se midió su actividad por un intervalo de diez minutos antes y después de recibir la señal química del correspondiente tratamiento. Las variables de actividad evaluadas fueron las diferencias (después-antes) del tiempo total de movimiento, número de eventos de movimiento, número de cambios de cuadrante y distancias recorridas. Pese a que los resultados no fueron del todo concluyentes se observó cierta tendencia en las diferencias entre los controles positivos y negativos en las variables analizadas. De los diferentes tratamientos analizados, las señales químicas del depredador nativo tortuga fue la que evidenció una mayor intensidad de respuesta anti-depredador en *P. minuta*, reduciendo la actividad luego de recibir el estímulo. Esta experiencia es una primera aproximación que aporta significativamente a su futuro desarrollo como modelo experimental. Corregir algunos aspectos de la metodología y como principal medida aumentar el número de réplicas por tratamiento permitirán obtener resultados concluyentes en el futuro.

Introducción

Las invasiones biológicas, originadas por la introducción de especies exóticas, son una de las mayores amenazas a la conservación de la biodiversidad a nivel global (Simberloff et al., 2013). Tanto de forma intencional como accidentalmente, el ser humano ha trasladado diversas especies desde sus áreas de distribución original a sus nuevas regiones. Las actividades humanas, como el comercio, migraciones y transporte permiten a algunas especies superar importantes barreras geográficas e ingresar en nuevos sitios. Son pocas las especies que logran establecerse en poblaciones, sin embargo, algunas son capaces de colonizar y generar efectos negativos sobre las poblaciones, comunidades y ecosistemas nativos (Reid et al., 2005). Dichos efectos terminan impactando en la biodiversidad, la salud humana o animal y las funciones ecosistémicas (Lockwood et al., 2006; Mack et al., 2000).

Una invasión biológica consiste en un proceso que atraviesa diferentes etapas, comenzando con el transporte y la introducción en un nuevo sistema. Si la población consigue establecerse en el nuevo sitio, puede ingresar en la etapa de dispersión o crecimiento exponencial, en la que la población aumenta rápidamente de tamaño, para finalizar en la saturación, donde la especie invasora ya ocupa todo el espacio disponible (Crooks, 2005; Lockwood et al., 2006; Neill y Arim, 2011). Durante dichas etapas, las especies exóticas deben superar una serie de barreras, que involucran desde aspectos genéticos y poblacionales del invasor, hasta condiciones del medio invadido.

Algunas hipótesis no mutuamente excluyentes han sido planteadas para explicar los posibles mecanismos que estarían facilitando las invasiones biológicas. Elton (1958), propuso la hipótesis de *liberación del enemigo*, en la cual explica el éxito del invasor frente a los nativos debido a la ausencia de patógenos, parásitos y depredadores en el nuevo ambiente. Por otra parte, Simberloff y Von Holle (1999) proponen la hipótesis del *derretimiento biótico*, en la cual, el ingreso previo de una especie invasora generaría grandes cambios en el sistema que facilitarían el establecimiento de subsecuentes especies invasoras. Mientras que MacDougall y Turkington (2005) proponen la hipótesis de *conductores y pasajeros*, donde la propia especie invasora estaría conduciendo a cambios en el ambiente que benefician su invasión, o actuando simplemente como pasajeros pasivos que aprovechan cambios provocados por agentes externos al ambiente que facilitarían la invasión (e.g. actividades humanas). Por último, Davis y colaboradores (2000) proponen la hipótesis de *disponibilidad de recursos*, en la cual la invasión sería facilitada si en el sistema

existen recursos disponibles para explotar. Si bien la evidencia disponible es contradictoria y no hay fuertes consensos acerca de cuáles son los factores que determinan una invasión, la magnitud de este problema genera la urgente necesidad de conocimiento, ya que la comprensión de los mecanismos subyacentes resultaría fundamental para la prevención y el manejo de sus consecuencias.

Las poblaciones nativas a lo largo de su historia evolutiva desarrollan adaptaciones al medio que permiten a los individuos incrementar el éxito reproductivo y la supervivencia (Schlaepfer et al., 2002). Estas adaptaciones o ajustes incluyen los patrones de actividad espacio-temporal, la obtención y consumo de recursos, y los patrones de coexistencia con otras especies, como competidores y depredadores. En particular en este último punto, la depredación es considerada una fuerza selectiva muy fuerte a la que se ven sometidas las presas (Lima y Dill, 1990) y frente a las que desarrollan diferentes mecanismos de defensa. Salo y colaboradores (2007) proponen que el ingreso de un depredador exótico a un nuevo sistema tendrá un efecto mayor sobre las presas nativas que los provocados por los depredadores nativos, ya que serían más efectivos en la obtención de recursos. Esta mayor efectividad plantea una nueva hipótesis, en la cual las presas nativas no tendrían defensas ante estos nuevos y desconocidos depredadores. En el caso de una invasión reciente, el depredador corre con la ventaja de no ser reconocido como una amenaza y por tanto puede explotar fuertemente el recurso de las presas nativas (Sih et al., 2010). Luego, con el tiempo las presas nativas irán aprendiendo a reconocer al depredador, mediante el mecanismo de asociación de estímulos (Chivers y Smith, 1994; Gonzalo et al., 2007; Mirza et al., 2006). Se ha reportado para una especie nativa de Estados Unidos, *Rana aurora*, la adquisición de la capacidad de responder con comportamientos anti-depredador a las señales del depredador exótico *Lithobates catesbeianus* de la misma forma e intensidad que lo hacen frente a las señales de depredadores nativos, en una localidad invadida hace más de 60 años (Kiesecker y Blaustein, 1997). Por lo que, esta ventaja de no ser reconocido sería un arma importante del depredador exótico, durante su establecimiento y en su frente de invasión (Sih et al., 2010).

En el presente estudio planteamos evaluar la capacidad de las presas nativas de identificar a un depredador exótico que recientemente está invadiendo en Uruguay, la rana toro *Lithobates catesbeianus* (Shaw 1802), de forma de contribuir a determinar los mecanismos que facilitan su establecimiento. Esta especie que ha sido introducida en varias regiones del mundo para acuicultura ha generado diversos focos de invasión (Akmentins y Cardozo, 2010; Both et al., 2011; Ferreira y de Lima, 2012; Kraus, 2009; Laufer et al., 2008, 2009; Pereyra et al., 2006). En Uruguay esta industria tuvo su

expansión máxima durante los años 80, y luego con la crisis del país en el año 2000 se produjo un colapso del negocio y cierre de los criaderos sin un seguimiento del destino de las ranas. Como consecuencia, se liberaron animales y aparecieron poblaciones silvestres en cuatro sitios, Rincón de Pando, Canelones (Laufer et al., 2008) y Paraje Bizcocho, Soriano (Laufer et al., 2009), poblaciones en las que no se han registrado individuos en los últimos relevamientos (Laufer et al., 2017) y en las localidades de Aceguá, Cerro Largo (Laufer et al., 2009; Ruibal y Laufer, 2012) y San Carlos, Maldonado (Lombardo et al., 2016) donde se encuentran establecidas y en una etapa de expansión (Laufer et al., 2017). Si bien los efectos de estas invasiones resultan poco conocidos en Uruguay (pero ver Laufer, 2017) la evidencia disponible de otras regiones nos indica que la rana toro puede ocasionar fuertes declives en las poblaciones de anfibios nativos (Collins, 2010; Kiesecker et al., 2001; Kiesecker y Blaustein, 1997, 1998; Kupferberg, 1997).

La rana toro es una especie perteneciente a la familia *Ranidae* originaria de la costa este de América del Norte (Bury y Whelan, 1984). Se caracteriza por ser una especie plástica, con gran capacidad de adaptarse a nuevos ambientes e invadir (Boone et al., 2007; Bury y Whelan, 1984). Debido a sus efectos ha sido considerada una de las peores invasoras en diferentes categorizaciones globales (Kraus, 2009; Kumschick et al., 2017; Lowe et al., 2000). Es un anuro acuático de gran tamaño corporal en todos sus estadios ontogénicos, capaz de ocupar y establecerse en una amplia gama de ambientes, incluyendo lagos, estanques, pantanos y reservorios de aguas y arroyos (Kraus, 2009). Presenta una serie de atributos que la hacen una especie fuertemente competitiva, tales como su elevada fecundidad y tasa de crecimiento (Bury y Whelan, 1984; Cecil y Just, 1979), su tolerancia a altas densidades poblacionales (Adams y Pearl, 2007) y particularmente, su rol como depredador (Pearl et al., 2004). Es un depredador generalista, se alimenta de una gran diversidad amplio espectro de presas que incluye desde macro-invertebrados hasta vertebrados como anfibios, reptiles, aves y pequeños mamíferos (Barrasso et al., 2009; Boelter y Cechin, 2007; Bury y Whelan, 1984; Hirai, 2004; Laufer, 2017; Leivas et al., 2012; Quiroga et al., 2015; Silva et al., 2009, 2011, 2016; Werner et al., 1995; Wu et al., 2005). Los individuos adultos se caracterizan por ser depredadores muy voraces, oportunistas e incluso caníbales (Govindarajulu et al., 2006; Quiroga et al., 2015; Toledo et al., 2007). También para las larvas se ha reportado la capacidad de afectar a especies nativas reduciendo su supervivencia y crecimiento como consecuencia de la competencia por el acceso a los recursos (Kiesecker y Blaustein, 1998; Kraus, 2015; Kupferberg, 1997; Lawler, 1989), mediante depredación de huevos (Ruibal y Laufer, 2012) y modificación

del hábitat (Kraus, 2015). Además, la rana toro ha sido identificada como un vector global de quitridiomycosis, enfermedad generada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Garner et al., 2006).

En los últimos años se han realizado una serie de estudios que demuestran la ocurrencia de cambios significativos en la estructura de los ensamblajes de anuros en los sitios invadidos por rana toro en Uruguay. Se ha reportado un fuerte declive en la riqueza y abundancia de anuros nativos tanto a nivel de larvas (Gobel, 2013) como de adultos (Cortizas, 2014; Laufer, 2017). Al tratarse de un anuro principalmente acuático, esperamos que las consecuencias de la invasión estén afectando en mayor medida a las especies nativas con las que comparte el medio acuático. Una especie nativa que parecería estar siendo muy afectada por la interacción con la rana toro es la rana boyadora grande (*Pseudis minuta*, Günther, 1858) (Laufer, 2017). Este hylido sería más vulnerable por sus hábitos acuáticos ya que utiliza únicamente ambientes lénticos permanentes al igual que la rana toro (Huckembeck et al., 2012; Melchiors et al., 2004; Pearl et al., 2004). Las larvas de *P. minuta* son nadadoras muy activas y su desarrollo es lento, pudiendo necesitar varios meses para completarlo (Langone, 1995). Los adultos tampoco abandonan el medio acuático, presentan adaptaciones a la vida acuática—como ojos en posición dorsal, membrana interdigital muy desarrollada en las patas posteriores—que le permiten nadar y mantenerse en la superficie del agua (Kwet, 2000). Además, *P. minuta* también prefiere para su reproducción cuerpos de agua lénticos con vegetación acuática, a la que adhieren sus huevos durante la puesta (Melchiors et al., 2004; Zank et al., 2010). Ambas especies presentan atributos y hábitos de vida similares, incluso los estadios juveniles de rana toro son morfológicamente similares a los adultos de *P. minuta* (Both y Melo, 2015). Esto podría explicar por qué las ranas boyadoras tendrían una mayor tasa de encuentro con la rana toro que otras especies y por tanto ser más susceptible a la depredación (Pearl et al., 2004). Si *P. minuta* no es capaz de reconocer a la rana toro como depredadora, tal como se ha reportado en la literatura para otras especies nativas, los efectos negativos de la depredación se verán acentuados. Posiblemente esto podría contribuir a generar el patrón observado de ausencia de *Pseudis* en los sitios invadidos por *L. catesbeianus* (Both y Melo, 2015).

El objetivo de este estudio fue evaluar por primera vez la capacidad de la especie nativa *P. minuta* de reconocer señales de *L. catesbeianus* como potencial depredador, en un sistema experimental.

Hipótesis

Durante la historia de la coexistencia, y como resultado de la evolución, las presas logran detectar a los depredadores y son capaces de responder a su presencia con comportamientos anti-depredador. Este fenómeno se ve facilitado en el medio acuático por una mayor capacidad de transmisión de señales químicas (Wisenden, 2000). *Pseudis minuta* es capaz de detectar las señales químicas de los depredadores nativos, como macro-invertebrados, peces depredadores y tortugas, lo que permite su coexistencia en las comunidades. En cambio, al enfrentarse a un depredador exótico, con el que no comparte una historia evolutiva por haber sido recientemente introducido, *P. minuta* no es capaz de reconocerlo. La ausencia de capacidad de detección y por tanto de respuesta ante este depredador exótico sería lo que explica los patrones observados de ausencia de *Pseudis* en los charcos de las zonas recientemente invadidas.

A partir de esta hipótesis podemos predecir que los individuos de *P. minuta* de un cuerpo de agua recién invadido no exhibirán respuesta ante la exposición a señales de rana toro, tal como lo harán frente a señales de depredadores nativos.

Materiales y métodos

Para poner a prueba la capacidad de *P. minuta* de reconocer a la rana toro como depredador se realizaron experimentos comportamentales bajo condiciones controladas de laboratorio. Dicho procedimiento tuvo el objetivo de determinar si esta especie nativa responde cuando es expuesta a señales químicas de la especie invasora, de igual forma que lo haría ante las señales químicas de un depredador nativo conocido. Con este objetivo se realizaron cuatro tratamientos experimentales y dos controles. Los tratamientos incluyeron dos importantes depredadores nativos con los que *P. minuta* coexiste en toda su distribución, la tararira *Hoplias malabaricus* y la tortuga morrocoyo *Trachemys dorbigni* (Carreira et al., 2005; Maneyro y Carreira, 2012; Teixeira de Mello et al., 2011) Estos depredadores fueron seleccionados debido a que, tanto las tortugas como los peces depredadores han sido ampliamente reportados en diversas regiones como importantes depredadores de anfibios adultos y larvas y con fuertes efectos sobre sus poblaciones (Bronmark y Edenhamn, 1994; Burbidge, 1981; Hecnar y M'Closkey, 1997; Heyer et al., 1975; Norris y Wensing,

1986; Sexton y Phillips, 1986; Toledo et al., 2007). En particular, *T. dorbigni* se encuentra asociada a cuerpos de agua, tanto loticos como lénticos y presenta una dieta omnívora, se alimenta ocasionalmente de material vegetal y principalmente de invertebrados y pequeños vertebrados como anuros y peces (Carreira et al., 2005). Por otra parte, *H. malabaricus* es un depredador muy agresivo que se alimenta de macro-invertebrados, peces y anfibios (Andrade et al., 2012; Bistoni et al., 1995). Se utilizaron dos tratamientos con señales del depredador exótico rana toro, adultos y larvas por separado. Por último, los dos controles consistieron en una señal de estrés de conspecíficos para calibrar la respuesta anti-depredador de *P. minuta* (control positivo) y agua declorada (control negativo).

A continuación, se describe la forma de obtención de los animales utilizados en el experimento (depredadores y ranas boyadoras), su mantenimiento en laboratorio y finalmente el procedimiento experimental y análisis de datos.

Obtención y mantenimiento de los animales

Ranas toro y boyadoras— El día 17 de marzo de 2017 se colectaron los ejemplares de *P. minuta* y *L. catesbeianus* en la localidad de San Carlos, Maldonado (34°47'S, 54°53'W), en la que se ha reportado por primera vez la invasión de rana toro en 2015 (Laufer et al., 2017; Lombardo et al., 2016). Esta localidad se encuentra ubicada en la confluencia de los arroyos San Carlos y Maldonado, 15 km al norte de la capital departamental Maldonado. Se realizó colecta diurna de larvas de rana toro, con la participación de cuatro colectores, utilizando como método de muestreo la pesca con calderín de 30 cm de diámetro y 0,5 mm de malla (Heyer et al., 2014; Skelley y Richardson, 2010). Así se capturaron diez renacuajos de rana toro, que fueron acondicionados en bolsas con agua y aire para su posterior transporte. En la noche se realizó la búsqueda (con linternas) y colecta manual de adultos (Harper et al., 2010; Heyer et al., 2014). Así se capturaron 35 ejemplares adultos de *P. minuta* y un adulto de *L. catesbeianus* que fueron acondicionadas en bolsas y recipientes para su posterior traslado. Esa misma noche, los ejemplares fueron trasladados al laboratorio de organismos acuáticos del Centro Universitario Regional Este, donde fueron alojados y posteriormente utilizados para experimentación.

Los individuos colectados en campo fueron alojados en acuarios previamente acondicionados (50x25x40 cm; 50 L). En la preparación de dichos acuarios se puso especial énfasis en la higiene, se llenaron con agua declorada y se equiparon con

filtros biológicos y aireadores. La rana toro adulta fue alojada en forma individual y los diez renacuajos de esta especie se dispusieron en un único acuario. Los ejemplares de *P. minuta* fueron separados en tres grupos por sus tamaños corporales (dos grupos de 12 individuos y un grupo de 11), para evitar su hacinamiento y el canibalismo.

Depredadores nativos—Se utilizó para las experiencias, una tararira *Hoplias malabaricus* (30 cm de largo total aproximadamente), cedida por el Grupo de Ecología y rehabilitación de sistemas acuáticos del Centro Universitario Regional Este y alojada en el laboratorio de organismos acuáticos en uno de los acuarios acondicionados. Por otra parte, se contó con 15 L de agua extraídos de un acuario con dos tortugas *Trachemys dorbigni* (15 cm de largo de caparazón aproximadamente), procedentes de un criadero.

Para todos los animales alojados en el laboratorio se mantuvo condiciones de luz natural y un régimen de temperatura constante (18 °C). La alimentación se realizó dos veces por semana con alimento vivo Tubifex, obtenido en un acuario y con pellets comerciales a los renacuajos (Tetra Reptomin). Semanalmente se les realizó cambio de agua y mantenimiento de los filtros. Antes de realizar los experimentos se esperó un período de aclimatación a las condiciones de laboratorio de 20 días.

Montaje del experimento

El experimento tuvo un diseño factorial con los seis tratamientos diferentes, definidos como señales químicas de tortuga, tararira, rana toro adulto y renacuajo, señales de estrés de un conspecífico y agua de clorada. Para cada tratamiento se realizaron cinco réplicas. Cada individuo fue utilizado una única vez, totalizando cinco individuos en seis tratamientos. Los individuos de *P. minuta* fueron aislados en acuarios de 20x10x15 cm, con 250 mL de agua de clorada y cubiertos con film transparente que permitía filmar las experiencias evitando el posible escape de los individuos. En la base de estos acuarios se marcó previamente subdivisiones en seis cuadrantes y en sus paredes laterales se colocó nylon negro, para evitar interacciones entre individuos experimentales vecinos (Fig. 1). No se tomaron en cuenta las experiencias en las que los individuos de *P. minuta* permanecieron trepados a las paredes de los acuarios y no tuvieron contacto con el agua. Por lo que se descartaron dos experiencias, una correspondiente al tratamiento con señal de tortuga y otra de



Figura 1. Acuarios utilizados para experimentos de respuesta de adultos de *P. minuta* a señales químicas de los depredadores.

tararira.

Cada individuo se mantuvo en el acuario durante cinco minutos de aclimatación para luego ser sometido a 15 minutos de observación previo a recibir la señal (ver video en Anexo: Link 1). Posteriormente se le agregó a su acuario 40 mL de agua con señal, de acuerdo al tratamiento y se mantuvo otros 15 minutos en observación (Fig. 2). Las señales químicas fueron incorporadas a los acuarios utilizando jeringas con 40 mL de señal, suministradas en el centro de la pecera (ver video en Anexo: Link 2). Los tiempos de aclimatación y de muestreo se determinaron siguiendo la metodología propuesta por Polo-Cavia y colaboradores (2010).

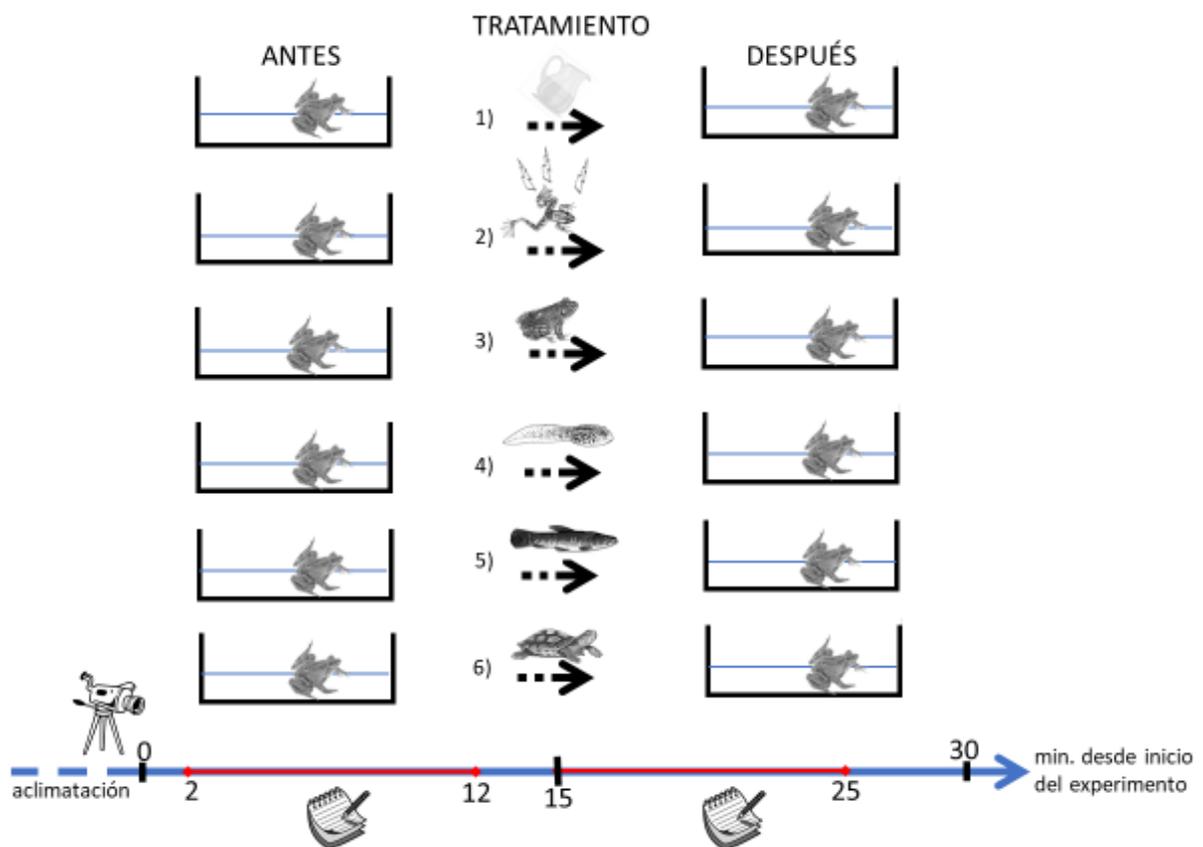


Figura 2. Diseño experimental. Cada acuario contaba con 250 mL de agua y un individuo de *Pseudis minuta*. Transcurridos 15 minutos se adiciona una señal química correspondiente a un tratamiento: 1) control (agua decaorada), 2) señal de estrés, 3) rana toro adulto, 4) rana toro larva, 5) tararira, 6) tortuga, hasta completar 30 minutos. Se miden las variables de actividad de *P. minuta* en dos intervalos de 10 minutos (antes y después).

Los tratamientos consistieron en señales químicas de depredación obtenidas mediante la extracción de muestras de agua de los acuarios donde cada depredador se encontraba alojado. Para esto, 48 horas previo a la realización de los experimentos se realizó un cambio de agua a todos los depredadores (tortugas, tararira y rana toro adulto y renacuajos), dejándolos en un volumen de 15 L e interrumpiendo el suministro

de alimento hasta una vez extraída la muestra de agua, minimizando así posibles contaminantes en la señal. Se tuvo especial atención y precaución en utilizar recipientes diferentes para realizar los cambios de agua de los acuarios con depredadores, evitando posible mezcla de las señales químicas de los diferentes tratamientos. Se utilizó como señales de estrés de un conspecífico, el agua obtenida de un recipiente en el que se colocó un adulto de *P. minuta* el cual fue sometido a movimientos bruscos del agua durante cinco minutos.

Registro y medición de actividad

Durante todo el tiempo de experimentación se hizo el registro utilizando dos filmadoras (Sony HDR-CX290), colocadas a una altura de 50 cm de los acuarios y se dispuso una malla sombra rodeando los acuarios, de forma de evitar que el individuo



Figura 3. Disposición de los acuarios de experimentación y filmadora en el laboratorio.

visualice al investigador y minimizar efectos no deseados por su presencia. Estas filmadoras registraron la actividad de los ejemplares, con los cuadrantes de fondo, cubriendo tres acuarios a la vez (Fig. 3). En anfibios se conoce que las respuestas comportamentales frente a los depredadores usualmente se encuentran vinculadas a cambios en la actividad luego de recibir la señal, siendo la reducción en los niveles de actividad la respuesta mayormente registrada (revisión en Kats y Dill, 1998). Por lo que, como variable de respuesta se registró el movimiento de adultos de *P. minuta* antes y después de ser sometidos a los tratamientos, a partir de los registros de videos. Para el análisis de estos se utilizó el software libre de análisis de videos JWatcher (Blumstein et al., 2012). Se registró el tiempo total en que los individuos de *P. minuta* se encontraban en movimiento en dos intervalos de 10 minutos, antes de haber recibido la señal química (desde el minuto 2 al minuto 12) y posteriormente (desde el agregado de la

señal hasta completados los 10 minutos). También se realizó un conteo del número de eventos en los que se movió el individuo y en los que cambió de cuadrante de la pecera. Se tomó como criterio el cambio de cuadrante cuando la región de la cloaca pasó completamente la línea que subdivide los cuadrantes.

Se midió la distancia recorrida por los individuos utilizando en primera instancia la herramienta informática Ardesia, que nos permitió dibujar en la pantalla durante el transcurso del video la secuencia de puntos de los desplazamientos de los individuos y tomar capturas de pantalla (ver en Anexo Fig. A 1). Posteriormente, a partir de estas imágenes generadas, se utilizó el software de análisis de imagen ImageJ (Schneider et al., 2012) para medir las distancias totales recorridas antes y después de recibida la señal química. Se tomó como punto de referencia para seguir al individuo en los desplazamientos el extremo del hocico de la rana y como escala se utilizó la medida del borde de las peceras.

Una vez finalizados los experimentos, se midió en todos los individuos la longitud hocico-cloaca (SVL) utilizando un calibre digital y se pesó todos los individuos con una balanza de precisión. Posteriormente, se procedió a sacrificar a los ejemplares de *P. minuta*, la tararira, los renacuajos y el adulto de rana toro, utilizando una sobredosis de Eugenol en agua (500 mg/L). Finalmente, fueron depositados en la colección herpetológica del Museo Nacional de Historia Natural. El protocolo experimental fue evaluado y aprobado por CEUA-CURE (protocolo N° 463).

Análisis de datos

Para explorar los efectos de los diferentes tratamientos experimentales, se utilizó un modelo lineal (lm) aplicado a los datos obtenidos y se buscó diferencias entre tratamientos por Análisis de Varianza ANOVA. Las variables de respuesta seleccionadas para los análisis fueron las diferencias en: (1) el tiempo total de movimiento (sumatoria del tiempo total (s) de movimiento de los individuos), (2) el número total de eventos de movimiento (conteo del número de eventos en que el individuo abandona el estado de quietud y comienza a moverse), (3) el número total de cambios de cuadrante (conteo del número de eventos en que un individuo atraviesa completamente una de las líneas que subdivide el acuario), (4) la distancia total recorrida (medida de la distancia total (cm) que recorre el individuo, considerando los movimientos en el plano horizontal del acuario) en el intervalo de diez minutos de observación. Para obtener estas variables se realizó la diferencia del valor observado antes y después del suministro de las señales, para cada individuo, calculado como (después – antes). De esta forma se trabajó con el cambio de comportamiento, reduciendo la variación entre posibles patrones comportamentales individuales. Como variable independiente o factorial fue utilizado el tratamiento (tararira, tortuga, rana toro adulto y renacuajo, estrés y agua). Finalmente, se exploró mediante Análisis de Varianza ANOVA si hubo diferencias en el largo y peso de los individuos según el

tratamiento. En todos los análisis se trabajó considerando un α de 0,05 y los análisis se realizaron utilizando el software libre R (R Core Team, 2014).

Resultados

Las diferentes variables (tiempo de movimiento, número de eventos de movimiento, número de cambios de cuadrante y de distancias recorridas) de reconocimiento de rana toro por adultos de *Pseudis minuta* se comportaron en forma relativamente similar, pudiendo identificar un patrón más claro al considerar las diferencias “después – antes” de recibida la señal. En esta aproximación se observó una menor variabilidad en los resultados. A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada una de las variables exploradas, tanto para la diferencia “después – antes” (ver los resultados de cada uno de los tiempos en forma independiente en Anexo: Fig. A 1, Fig. A 2).

1) Diferencia de tiempo total de movimiento (DTM)

El análisis de ANOVA reveló diferencias estadísticamente significativas entre la diferencia “después – antes” de tiempo total de movimiento de los individuos de *P. minuta* entre los diferentes tratamientos ($F_{22} = 2.702$; $P = 0.047$). Las ranas boyadoras presentaron una actividad media menor al enfrentarse a las señales químicas de los dos depredadores nativos (tortuga y tararira, Fig. 4). Por lo que, para ambos tratamientos el valor medio de la DTM fue negativo (tararira $\bar{x} = -20.67 \pm 3.8$ s, tortuga $\bar{x} = -31.38 \pm 4.9$ s — \bar{x} = valor medio \pm desvío estándar). A pesar de la tendencia observada, únicamente el tratamiento tortuga resultó marginalmente diferente del control ($P = 0.0598$). Por otra parte, las observaciones obtenidas de los tratamientos de señal de rana toro (adulto y larva) y señales de estrés no mostraron una diferencia en el DTM medio con respecto al control (rana toro adulto $\bar{x} = 0.644 \pm 5.8$ s, rana toro larva $\bar{x} = 19.45 \pm 5.6$ s, estrés $\bar{x} = 7.52 \pm 4.3$ s), y presentaron una gran dispersión. Esta dispersión fue considerablemente menor en el control negativo, en el que se observó una media de $\bar{x} = 0.31 \pm 3.1$ s.

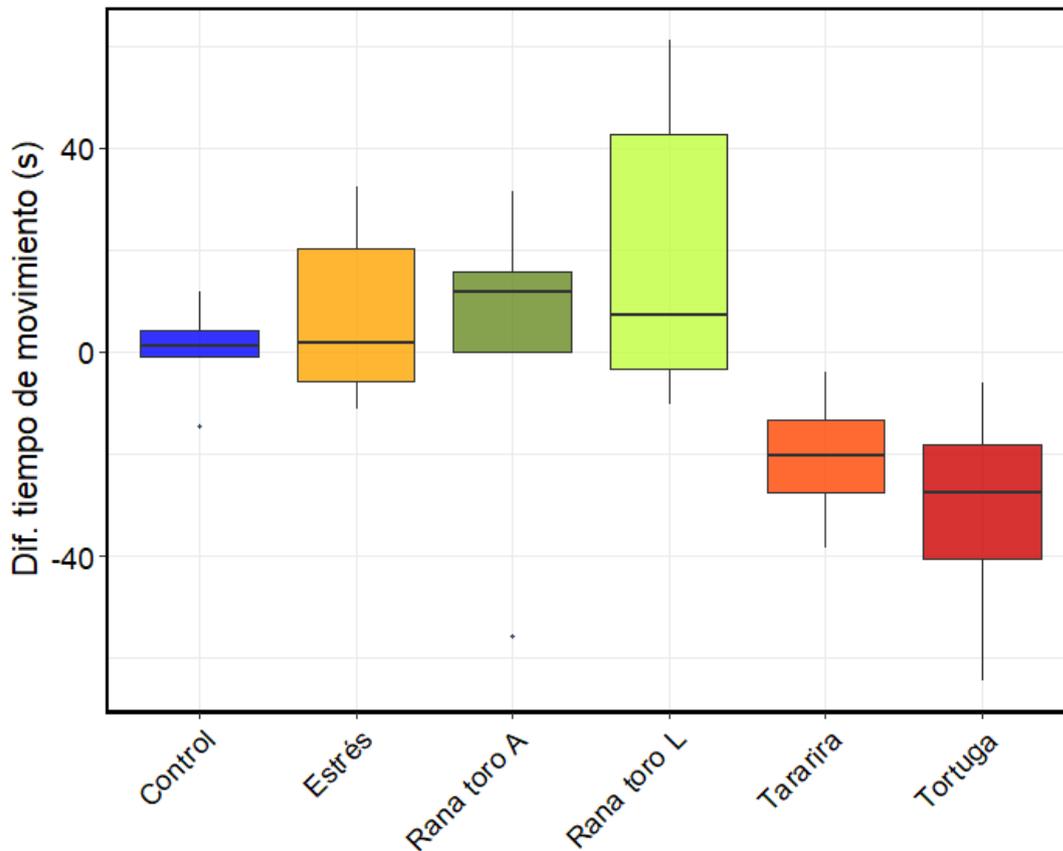


Figura 4. Diferencia (después – antes) en el tiempo total de movimiento de los adultos de *Pseudis minuta* en respuesta a los diferentes tratamientos: agua declarada (azul), estrés (amarillo), rana toro adulto (verde oscuro), rana toro larva (verde claro), tararira (anaranjado) y tortuga (rojo). La línea gruesa indica la mediana, las líneas finas de las cajas percentiles 25 y 75%.

2) Diferencia en el número total de eventos de movimiento (DNM)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable DNM entre los tratamientos ($F_{22} = 1.829$; $P = 0.1487$). Para los tratamientos con señales de depredadores nativos se observó una disminución en el número de eventos de movimiento (valor medio: tararira $\bar{x} = -24.75 \pm 4.2$, tortuga $\bar{x} = -19.75 \pm 4.6$) en comparación al control, pero esto no resultó estadísticamente significativo (Fig.5). La respuesta de *P. minuta* a los tratamientos con señales de rana toro y de estrés tampoco resultaron estadísticamente diferentes del control con valores medios superiores a los registrados para los depredadores nativos (rana toro adulto $\bar{x} = 0.00 \pm 5.7$, estrés $\bar{x} = 1.40 \pm 4.1$, rana toro larva $\bar{x} = 20.00 \pm 6.2$). La variable DNM presentó una importante dispersión de las observaciones de respuesta a los diferentes tratamientos, con excepción del control negativo (valor medio $\bar{x} = -2.2 \pm 3.0$).

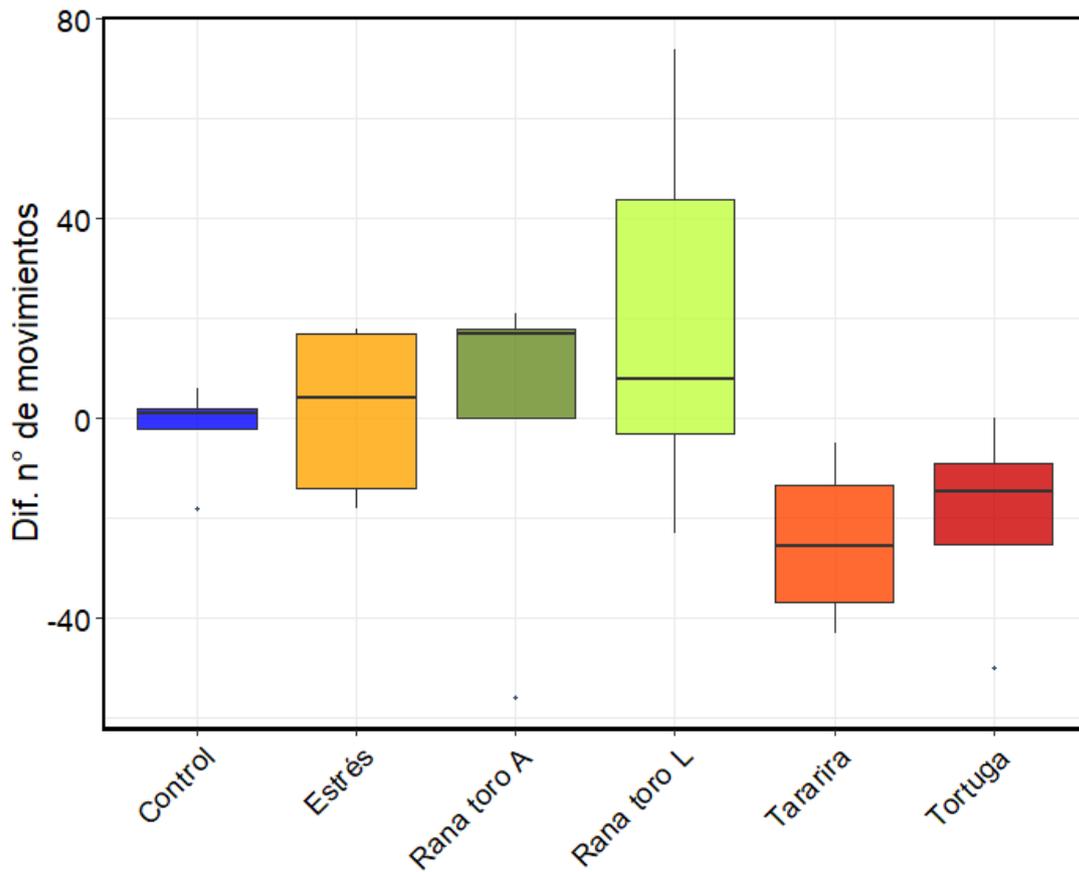


Figura 5. Diferencia (después – antes) en el número de eventos de movimiento de los adultos de *Pseudis minuta* en respuesta a los diferentes tratamientos: agua clorada (azul), estrés (amarillo), rana toro adulto (verde oscuro), rana toro larva (verde claro), tararira (anaranjado) y tortuga (rojo). La línea gruesa indica la mediana, las líneas finas de las cajas percentiles 25 y 75%.

3) Diferencia en el número total de cambios de cuadrantes (“DNCC”)

El análisis de ANOVA, para los diferentes tratamientos, no reveló diferencias estadísticamente significativas para la variable DNCC ($F_{22} = 2.029$; $P = 0.114$). Los valores medios de respuesta de los individuos de *P. minuta* frente a los diferentes tratamientos resultaron muy variables (tortuga $\bar{x} = -15.00 \pm 4.0$, tararira $\bar{x} = -13.5 \pm 3.2$, estrés $\bar{x} = -2.4 \pm 3.7$, rana toro adulto $\bar{x} = -1.2 \pm 3.8$, rana toro larva $\bar{x} = 13.4 \pm 4.9$), no difiriendo estadísticamente con el control negativo (Fig. 6). Se obtuvo una importante dispersión de las observaciones de respuesta a los tratamientos, con excepción del control negativo, cuyo valor medio fue $\bar{x} = -1.2 \pm 1.8$.

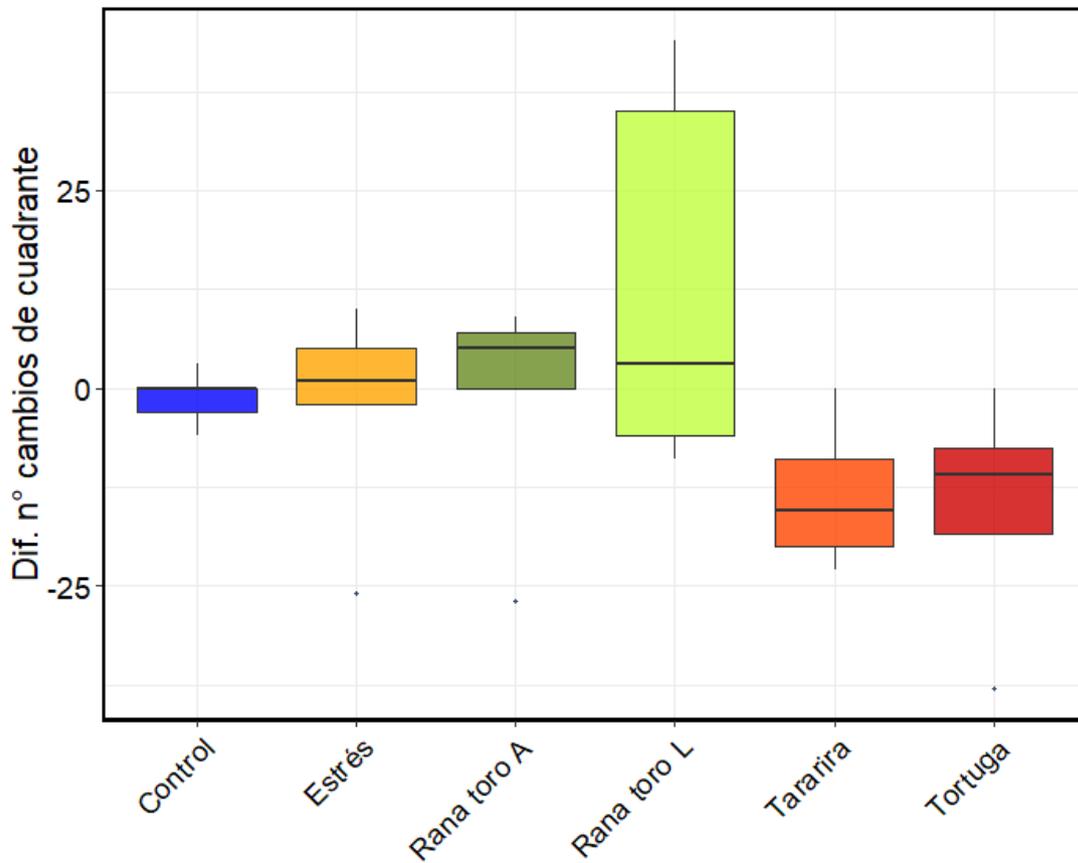


Figura 6. Diferencia (después – antes) en el número de cambios de cuadrante de los adultos de *Pseudis minuta* en respuesta a los diferentes tratamientos: agua dechlorada (azul), estrés (amarillo), rana toro adulto (verde oscuro), rana toro larva (verde claro), tararira (anaranjado) y tortuga (rojo). La línea gruesa indica la mediana, las líneas finas de las cajas percentiles 25 y 75%.

4) Diferencia de distancia total recorrida (“DDR”)

El Análisis de Varianza (ANOVA) para los diferentes tratamientos reveló diferencias marginalmente significativas para la variable DDR ($F_{22} = 2.217$; $P = 0.089$). Las diferencias (después – antes) de las distancias recorridas por los individuos de *P. minuta* en los tratamientos con señales químicas de depredadores nativos, registraron los menores valores medios (tararira $\bar{x} = -98.12 \pm 8.8$ cm, tortuga $\bar{x} = -90.28 \pm 9.8$ cm), en comparación con los obtenidos para los tratamientos con rana toro y señal de estrés (rana toro adulto $\bar{x} = 0.36 \pm 11.1$ cm, estrés $\bar{x} = 21.13 \pm 8.4$ cm, rana toro larva $\bar{x} = 105.34 \pm 13.1$ cm; Fig. 7). No obstante, para ninguno de estos tratamientos se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo (valor medio $\bar{x} = 2.54 \pm 6.4$ cm). La variable DDR registró una importante dispersión en los datos para todos los tratamientos, especialmente en los individuos sometidos al tratamiento de señal de larvas de rana toro.

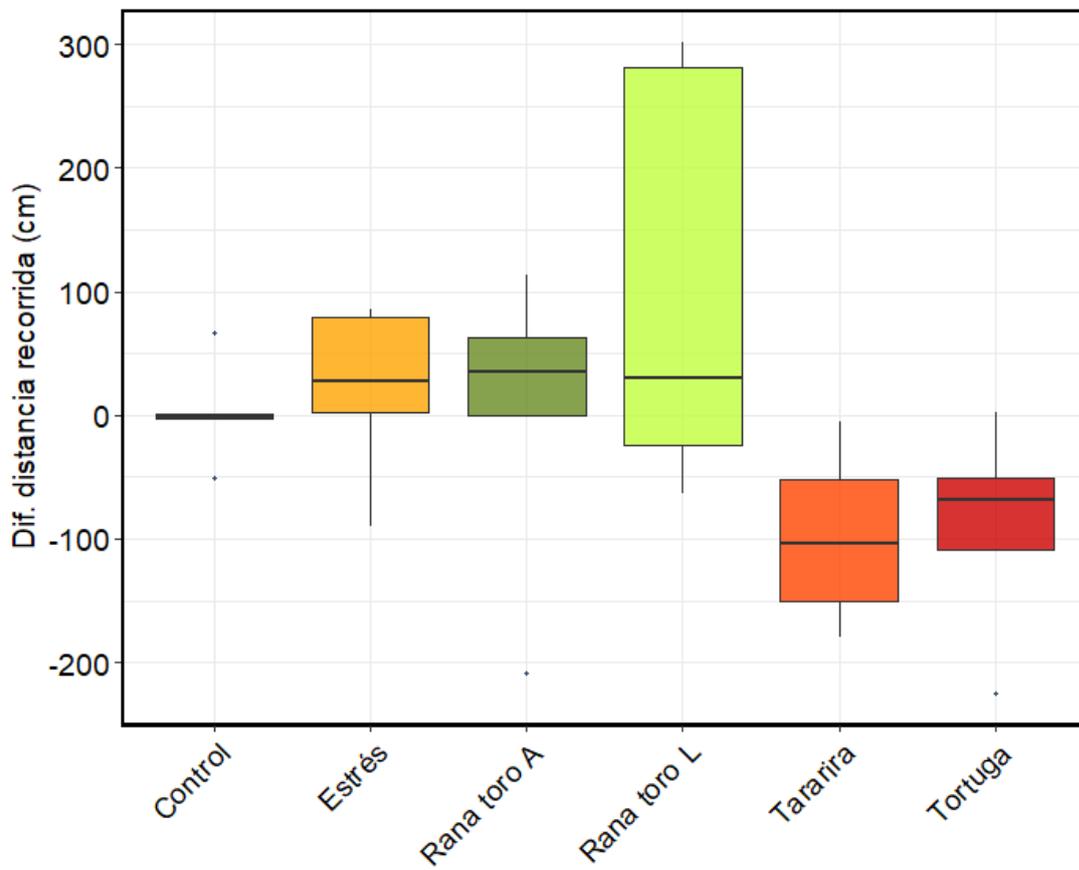


Figura 7. Diferencia (después – antes) de la distancia total recorrida (cm) por los adultos de *Pseudis minuta* en respuesta a los diferentes tratamientos: agua dechlorada (azul), estrés (amarillo), rana toro adulto (verde oscuro), rana toro larva (verde claro), tararira (anaranjado) y tortuga (rojo). La línea gruesa indica la mediana, las líneas finas de las cajas percentiles 25 y 75%.

No se encontró un efecto estadísticamente significativo del tamaño corporal de los individuos de *P. minuta* en los tratamientos (largo: $F_5 = 0.59$; $P = 0.71$; peso: $F_5 = 0.33$; $P = 0.89$). El valor medio del largo hocico-cloaca (SVL) fue $\bar{x} = (31.82 \pm 3.5)$ mm y un rango (21.47-36.24) mm (Fig. 8 a). El valor medio del peso fue $\bar{x} = (3.92 \pm 1.2)$ g y un rango (1.20-6.05) g (Fig. 8 b).

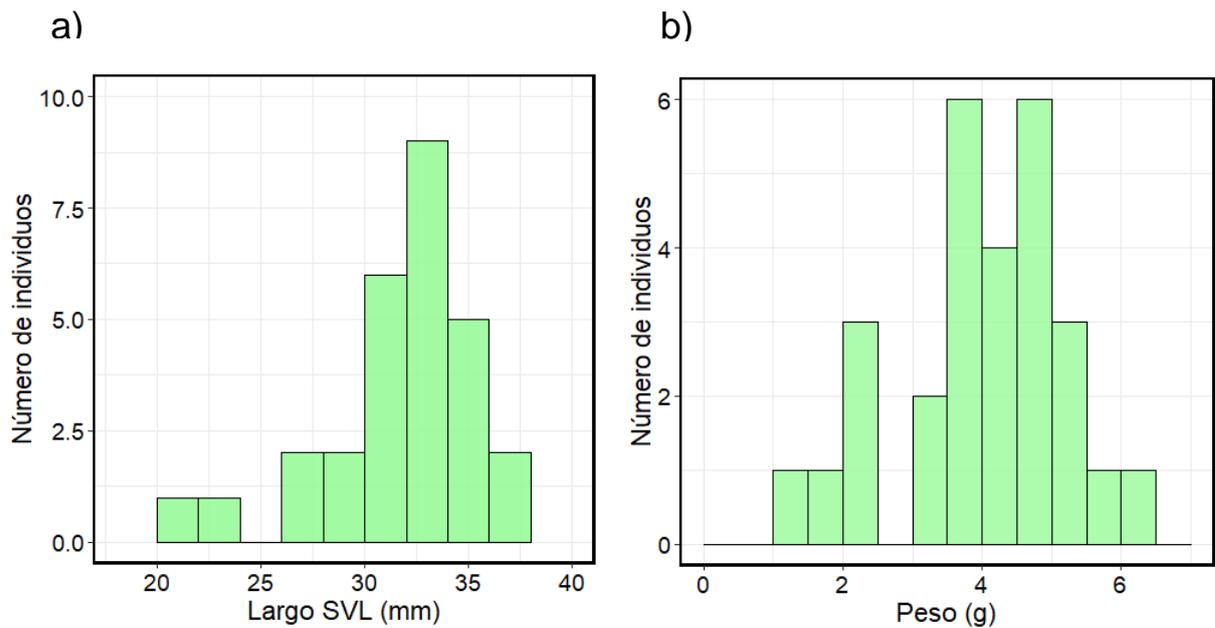


Figura 8. Distribución de frecuencias de a) largo SVL (mm) y b) peso (g) de los individuos de *Pseudis minuta* utilizados en experiencias.

Discusión

El presente trabajo fue la primera evaluación experimental de la capacidad de detección de una rana acuática nativa *Pseudis minuta*, en estadio post-metamórfico, a la rana toro como un nuevo depredador. En este sentido contribuye a comprender la interacción de esta invasora con una de las especies nativas que, por sus hábitos similares a los de rana toro, podría ser una de las especies más vulnerables (Huckembeck et al., 2012; Zank et al., 2010). Si bien el trabajo realizado resulta un importante aporte, por tratarse de una primera aproximación a un contexto ambiental poco conocido para *P. minuta*, los resultados observados en los experimentos no resultan del todo concluyentes y no podemos avanzar en la hipótesis planteada. Pese a esto, podemos destacar que se observaron ciertas tendencias en las diferencias entre los controles positivos (señal de tararira y de tortuga) y los negativos (agua declorada) que parecerían ser consistentes en todas las variables analizadas. En base a los resultados obtenidos, parecería que el tratamiento con señales del depredador nativo tortuga sería el que genera una respuesta anti-depredador más evidente en *P. minuta*, registrándose una disminución del tiempo de movimiento luego de recibir la señal. Esta respuesta conductual de reducción de la actividad frente al riesgo de depredación percibido coincidiría con el tipo de respuesta esperada, según la

bibliografía, para anfibios en el medio acuático (Chivers y Smith, 1998; Kiesecker y Blaustein, 1997; Polo-Cavia et al., 2010; Zhang et al., 2015)

Si bien las tendencias de las medias coinciden con lo esperado por las predicciones, muchos de los resultados a los tratamientos se caracterizan por una importante varianza. Para poder mejorar el procedimiento experimental resultaría interesante entender el origen de esta amplia variación entre individuos. Sin duda una primera explicación puede ser la ocurrencia de diferencias en atributos entre los individuos experimentales. Si bien los ejemplares de *P. minuta* utilizados fueron seleccionados al azar, se podría haber utilizado individuos de un menor rango de peso y largo; sin embargo, la evaluación de estas variables de tamaño corporal no arrojó diferencias. La otra variable que podría ser controlada es el sexo, ya que no se sexaron los individuos. De todas formas, los antecedentes experimentales existentes no provienen de individuos de un único sexo (Chivers et al., 1999, 2001). Resultaría razonable incluso considerar la existencia de variaciones en el comportamiento entre los individuos debido a diferencias en las personalidades inherentes a cada individuo. Wilson y Krause (2012) realizan un estudio de medición personalidades mediante ensayos conductuales en una especie de rana acuática *Rana ridibunda*, en el cual identificaron de manera experimental la existencia de individuos más activos y exploradores que otros, en respuesta a un mismo estímulo y comprobaron que estos comportamientos eran consistentes a través de la metamorfosis. Por lo que, considerar a los individuos como unidades experimentales similares y replicables podría ser un posible factor para tener en cuenta. Como primera medida se podría reutilizar los individuos frente a diferentes tratamientos, comparar las respuestas propias del individuo y categorizarlos si se observan diferencias. Por otra parte, en nuestro estudio partimos de la utilización de individuos adultos capturados en el campo, de los cuales no tenemos conocimiento de la historia de cada uno. Posible experiencia previa en enfrentamientos con depredadores, podrían afectar la intensidad de respuesta en nuestros experimentos.

En cuanto al procedimiento experimental, se podría mejorar la metodología empleada para suministrar la señal. En este sentido, un factor para tener en cuenta es la distancia que separa al individuo del sitio de inyección en el momento de administrar la señal. Esto se podría corregir con un sistema de administración más gradual y mejor repartida de la señal. De todas formas, esto podría haber afectado nuestras observaciones por tratarse de un incremento en el tiempo que el investigador pasa manipulando, pudiendo afectar a los individuos experimentales. Posiblemente la situación de estrés a la que estuvieron sometidos los diferentes individuos puede estar

enmascarando las diferencias de los tratamientos. Esto se podría mejorar aumentando el aislamiento (e.g. paredes oscuras, menos luz) y posiblemente trabajando en grupos y no individuos aislados (situación que reproduce mejor las condiciones naturales: Zank et al., 2010). De todas formas, se hace necesario probar estas condiciones porque tendrían un costo en el desarrollo experimental e implicarían una mayor colecta de individuos de la naturaleza.

Otro aspecto que se podría considerar es la homogeneidad del agua utilizada como señal. El hecho de que el control negativo haya tenido menor dispersión en sus observaciones nos hace sospechar que el agua con señal puede haber tenido cierta heterogeneidad que no hayamos detectado. Esto puede haber sido causado por los diferentes tiempos entre la preparación y la utilización de la señal, o, por ejemplo, la presencia de diferentes compuestos disueltos no en forma suficientemente homogénea en las aguas utilizadas. Considerando esto, se debería prestar más atención al manejo de las muestras de agua para señales químicas en el futuro. Un procedimiento que se puede agregar es el filtrado y posterior homogenización del agua, previo a su utilización. Si bien existe diversas formas de obtención de estas señales, no hay un fuerte conocimiento de las concentraciones, dosis mínimas, forma de administración y otros parámetros (Chivers et al., 2001; Gonzalo et al., 2007, 2009; Polo-Cavia et al., 2010; Zhang et al., 2015) que deberían ser evaluados y estandarizados para el modelo experimental en cuestión.

La calibración de la respuesta a los depredadores mediante señales de estrés de conspecíficos es una práctica normal en experimentos con larvas de anuros (e.g. Gonzalo et al., 2007, 2009; Mandrillon y Saglio, 2005; Marquis et al., 2004), pero escasamente explorada para adultos. En las experiencias presentadas aquí no se logró que los individuos de *P. minuta* respondieran a las señales de estrés como se esperaba. Esto pudo deberse a que el método empleado de movimientos del agua no haya provocado la suficiente liberación de señales de estrés, simulando un riesgo inminente de depredación. La utilización de técnicas más invasivas como el uso de triturados podría ser las que permitan calibrar la respuesta anti-depredadora.

Una alternativa para controlar la variación, aun ignorando las causas, puede ser el aumentar el número de réplicas por tratamiento. Un mayor número de réplicas r , proporciona la posibilidad de aumentar la precisión de la estimación de las medias de los tratamientos, disminuyendo la varianza s^2 en una proporción de s^2/r (Kuehl, 2000).

Si bien nuestras observaciones no nos permiten asegurar que *P. minuta* utiliza las señales químicas transportadas por el medio acuático para medir el riesgo de

depredación, sabemos que la explotación del canal químico en la detección de potenciales depredadores es una estrategia primitiva y muy expandida entre los diferentes taxa de presas acuáticas (Chivers y Smith, 1998; Kats y Dill, 1998). La coexistencia prolongada en el tiempo de las poblaciones de *P. minuta* con la especie invasora *L. catesbeianus* podría favorecer el desarrollo de estrategias anti-depredadoras. El impacto de esta invasión sobre las poblaciones de esta especie nativa va a estar relacionada, entre otros factores, con la duración del tiempo de coexistencia. Sin embargo, mientras las especies nativas no sean capaces de identificarla como depredador (situación que ocurre en nuevos focos y/o en el frente de invasión), la rana toro contará con la ventaja de un mayor acceso a los recursos y generará un mayor impacto en las comunidades invadidas (Sih et al., 2010). Esperamos que, dado el gran solapamiento en los hábitos de vida de ambas especies, exista una gran presión de selección actuando sobre *P. minuta*.

Esta experiencia es una primera aproximación que aporta significativamente a su futuro desarrollo como modelo experimental, para un tema prioritario en conservación de la biodiversidad regional de anuros, como es la invasión de la rana toro (Akmentins y Cardozo, 2010; Laufer, 2017; Nori et al., 2011). Además, resulta una experiencia interesante por tratarse de un modelo experimental de respuesta a depredadores en ejemplares post-metamórficos de un anuro sudamericano, cuando la mayor parte de la evidencia en la literatura proviene de larvas de especies del hemisferio norte (Kats et al., 1988; Kiesecker y Blaustein, 1997; Marquis et al., 2004; Pearl et al., 2003; Zhang et al., 2015). El éxito a futuro en este tipo de experimentos dependerá del desarrollo y comprensión de la metodología, para poder ser aprovechada en todo su potencial.

Bibliografía

- Adams, M.J., Pearl, C.A., 2007. Problems and opportunities managing invasive bullfrogs: is there any hope? *Biological Invaders in Inland Waters: Profiles, Distribution, and Threats*. Springer, pp. 679–693.
- Akmentins, M.S., Cardozo, D.E., 2010. American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) invasion in Argentina. *Biological Invasions* 12, 735–737.
- Andrade, E.B., Júnior, T.L., Júnior, J., Leite, J., 2012. Predation by native fish and feeding by crab species on *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro, 1926 (Anura: *Leptodactylidae*) in northeastern, Brazil. *Herpetology Notes* 5, 173–175.
- Barrasso, D.A., Cajade, R., Nenda, S.J., Baloriani, G., Herrera, R., 2009. Introduction of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Anura: *Ranidae*) in natural and modified environments: an increasing conservation problem in Argentina. *South American Journal of Herpetology* 4, 69–75.
- Bistoni, M. de los A., Haro, J.G., Gutiérrez, M., 1995. Feeding of *Hoplias malabaricus* in the wetlands of Dulce river (Córdoba, Argentina). *Hydrobiologia* 316, 103–107.
- Blumstein, D.T., Evans, C.S., Daniel, J.C., 2012. JWatcher, <http://www.jwatcher.ucla.edu/>.
- Boelter, R.A., Cechin, S.Z., 2007. Impact of the Bullfrog diet (*Lithobates catesbeianus* - Anura, *Ranidae*) on native fauna: case study from the region of Agudo - RS - Brazil. *Natureza & Conservação* 5, 115–123.
- Boone, M.D., Semlitsch, R.D., Little, E.E., Doyle, M.C., 2007. Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecological Applications* 17, 291–301.
- Both, C., Lingnau, R., Santos-Jr, A., Madalozzo, B., Lima, L.P., Grant, T., 2011. Widespread occurrence of the American bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: *Ranidae*), in Brazil. *South American Journal of Herpetology* 6, 127–134.
- Both, C., Melo, A.S., 2015. Diversity of anuran communities facing bullfrog invasion in Atlantic Forest ponds. *Biological Invasions* 17, 1137–1147.
- Bronmark, C., Edenhamn, P., 1994. Does the presence of fish affect the distribution of tree frogs (*Hyla arborea*)? *Conservation Biology* 8, 841–845.
- Burbidge, A., 1981. The ecology of the western swamp tortoise *Pseudemys umbrina* (Testudines: *Chelidae*). *Wildlife Research* 8, 203–223.
- Bury, R.B., Whelan, J.A., 1984. Ecology and management of the bullfrog. *Resour. Publ.* 155, U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC 23.
- Carreira, S., Meneghel, M., Achaval, F., 2005. *Reptiles de Uruguay*. DIRAC, Facultad de Ciencias Montevideo.
- Cecil, S.G., Just, J.J., 1979. Survival rate, population density and development of a naturally occurring anuran larvae (*Rana catesbeiana*). *Copeia* 1979, 447.

- Chivers, D.P., Kiesecker, J.M., Wildy, E.L., Belden, L.K., Kats, L.B., Blaustein, A.R., 1999. Avoidance response of post-metamorphic anurans to cues of injured conspecifics and predators. *Journal of Herpetology* 33, 472–476.
- Chivers, D.P., Smith, R.J.F., 1994. The role of experience and chemical alarm signalling in predator recognition by fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Journal of Fish Biology* 44, 273–285.
- Chivers, D.P., Smith, R.J.F., 1998. Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. *Écoscience* 5, 338–352.
- Chivers, D.P., Wildy, E.L., Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., 2001. Avoidance response of juvenile pacific treefrogs to chemical cues of introduced predatory bullfrogs. *Journal of chemical ecology* 27, 1667–1676.
- Collins, J., 2010. Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms* 92, 93–99.
- Cortizas, S., 2014. Respuestas asimétricas de los anuros nativos ante la invasión de rana toro (*Lithobates catesbeianus*). Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay, p. 54.
- Crooks, J.A., 2005. Lag times and exotic species: The ecology and management of biological invasions in slow-motion. *Écoscience* 12, 316–329.
- Davis, M.A., Grime, J.P., Thompson, K., 2000. Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *Journal of ecology* 88, 528–534.
- Elton, C.S., 1958. The ecology of invasion by plants and animals. Methuen, London 181.
- Ferreira, R.B., de Lima, C.S., 2012. Anuran hotspot at Brazilian Atlantic rainforest invaded by the non-native *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 (Anura: *Ranidae*). *North-Western Journal of Zoology* 8, 386–389.
- Garner, T.W., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A.A., Fisher, M.C., 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters* 2, 455–459.
- Gobel, N., 2013. Efectos comunitarios de la invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Cerro Largo. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay, p. 51.
- Gonzalo, A., López, P., Martín, J., 2007. Iberian green frog tadpoles may learn to recognize novel predators from chemical alarm cues of conspecifics. *Animal Behaviour* 74, 447–453.
- 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.
- Govindarajulu, P., Price, W.M.S., Anholt, B.R., 2006. Introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in Western Canada: has their ecology diverged? *Journal of Herpetology* 40, 249–260.

- Harper, E.B., Pechmann, J.H., Petranka, J.W., 2010. En: Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques. Dodd, C.K., 2010. Oxford University Press, p. 246.
- Hecnar, S.J., M'Closkey, R.T., 1997. The effects of predatory fish on amphibian species richness and distribution. *Biological conservation* 79, 123–131.
- Heyer, R., Donnelly, M.A., Foster, M., McDiarmid, R., 2014. Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution.
- Heyer, W.R., McDiarmid, R.W., Weigmann, D.L., 1975. Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics. *Biotropica* 7, 100.
- Hirai, T., 2004. Diet composition of introduced bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Mizorogaike Pond of Kyoto, Japan. *Ecological Research* 19, 375–380.
- Huckembeck, S., Claudino, M., Correa, F., Bastos, R.F., Loebmann, D., Tozetti, A.M., Garcia, A.M., 2012. The activity patterns and microhabitat use of *Pseudis minuta* Günther, 1858 (Anura, *Hylidae*) in the Lagoa do Peixe National Park, a biosphere reserve of the Brazilian subtropics. *Brazilian Journal of Biology* 72, 331–336.
- Kats, L.B., Dill, L.M., 1998. The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Écoscience* 5, 361–394.
- Kats, L.B., Petranka, 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.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., 1998. Effects of introduced bullfrogs and smallmouth bass on microhabitat use, growth, and survival of native red-legged frogs (*Rana aurora*). *Conservation Biology* 12, 776–787.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., Miller, C.L., 2001. Potential mechanisms underlying the displacement of native red-legged frogs by introduced bullfrogs. *Ecology* 82, 1964–1970.
- Kraus, F., 2009. Alien reptiles and amphibians: a scientific compendium and analysis, *Invading nature: Springer series in invasion ecology*. Springer, Dordrecht.
- Kraus, F., 2015. Impacts from Invasive Reptiles and Amphibians. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 46, 75–97.
- Kuehl, R.O., 2000. Design of experiments: statistical principles of research design and analysis, 2nd ed. ed. Duxbury/Thomson Learning, Pacific Grove, CA.
- Kumschick, S., Vimercati, G., de Villiers, F.A., Mokhatla, M.M., Davies, S.J., Thorp, C.J., Rebelo, A.D., Measey, G.J., 2017. Impact assessment with different scoring tools: How well do alien amphibian assessments match? *Neobiota* 33, 53–66.
- Kupferberg, S.J., 1997. Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: the role of larval competition. *Ecology* 78, 1736–1751.
- Kwet, A., 2000. The genus *Pseudis* (Anura: *Pseudidae*) in Rio Grande do Sul, southern Brazil, with description of a new species. *Amphibia-Reptilia* 21, 39–55.

- Langone, J.A., 1995. Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos). Serie de divulgación 5, p. 123.
- Laufer, G., 2017. Invasión de rana toro y quitridiomycosis: dos amenazas a la conservación de los anfibios en Uruguay. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay, p. 140.
- Laufer, G., Arim, M., Loureiro, M., 2009. Informe de dos nuevas poblaciones invasoras de rana toro en Uruguay. Proyecto Invasiones Acuáticas en Uruguay PDT 71/10.
- Laufer, G., Canavero, A., Núñez, D., Maneyro, R., 2008. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biological Invasions* 10, 1183–1189.
- Laufer, G., Gobel, N., Borteiro, C., Soutullo, A., Martínez-Debat, C., de Sá, R.O., 2017. Current status of American bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, invasion in Uruguay and exploration of chytrid infection. *Biological Invasions*. doi: 10.1007/s10530-017-1540-z.
- Lawler, S.P., 1989. Behavioural responses to predators and predation risk in four species of larval anurans. *Animal Behaviour* 38, 1039–1047.
- Leivas, P.T., Leivas, F.W.T., Moura, M.O., 2012. Diet and trophic niche of *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Anura). *Zoologia (Curitiba)* 29, 405–412.
- Lima, S.L., Dill, L.M., 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Can. J. Zool.* 68, 619–640.
- Lockwood, J.L., Hoopes, M.F., Marchetti, M.P., 2006. *Invasion Ecology*, Edición: 1. Wiley-Blackwell.
- Lombardo, I., Elgue, E., Villamil, J., Maneyro, R., 2016. Registro de una población asilvestrada de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) (Amphibia: Anura: *Ranidae*) en el departamento de Maldonado, Uruguay. *Boletín Sociedad Zoológica del Uruguay (segunda época)* 25 (1), 61–65.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M., 2000. 100 of the world's worst invasive alien species a selection from the global invasive species database. Hollands Printing Ltd., The Invasive Species Specialist Group (IUCN), Aucland.
- MacDougall, A.S., Turkington, R., 2005. Are invasive species the drivers or passengers of change in degraded ecosystems? *Ecology* 86, 42–55.
- Mack, R.N., Simberloff, D., Mark Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M., Bazzaz, F.A., 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological applications* 10, 689–710.
- Maneyro, R., Carreira, S., 2012. *Guía de anfibios del Uruguay*. Edición de la Fuga. Montevideo, Uruguay.
- Mandrillon, A.L., Saglio, P., 2005. Prior exposure to conspecific chemical cues affects predator recognition in larval common toad (*Bufo bufo*). *Archiv für Hydrobiologie* 164, 1–12.
- Marquis, O., Saglio, P., Neveu, A., 2004. Effects of predators and conspecific chemical cues on the swimming activity of *Rana temporaria* and *Bufo bufo* tadpoles. *Archiv für Hydrobiologie* 160, 153–170.

- Melchioris, J., Di-Bernardo, M., Pontes, G.M.F., Oliveira, R.B. de, Solé, M., Kwet, A., 2004. Reproduction of *Pseudis minuta* (Anura, *Hylidae*) in southern Brazil. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 3, 61–68.
- Mirza, R., Ferrari, M., Chivers, D., Kiesecker, J., 2006. Responses of American toad tadpoles to predation cues: behavioural response thresholds, threat-sensitivity and acquired predation recognition. *Behaviour* 143, 877–889.
- Neill, P.E., Arim, M., 2011. Human health link to invasive species, in: *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier, pp. 116–123.
- Nori, J., Urbina-Cardona, J.N., Loyola, R.D., Lescano, J.N., Leynaud, G.C., 2011. Climate change and American Bullfrog invasion: what could we expect in South America? *PLoS One* 6 (10), p. 8.
- Norris, R.H., Wensing, L., 1986. Diet of the fresh-water turtle *Chelodina longicollis* (Testudines, *Chelidae*) from the coastal dune lakes of the jervis bay territory. *Wildlife Research* 13, 301–308.
- Patrick, S.C., Weimerskirch, H., 2014. Personality, foraging and fitness consequences in a long lived seabird. *PLoS One* 9 (2), p.11.
- Pearl, C.A., Adams, M.J., Bury, R.B., McCreary, B., 2004. Asymmetrical effects of introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) on native ranid frogs in Oregon. *Copeia*, 11–20.
- Pearl, C.A., Adams, M.J., Schuytema, G.S., Nebeker, A.V., 2003. Behavioral responses of anuran larvae to chemical cues of native and introduced predators in the Pacific Northwestern United States. *Journal of Herpetology* 37, 572–576.
- Pereyra, M.O., Baldo, J.D., Krauczuk, E.R., 2006. La "rana toro" en la selva atlántica interior Argentina: un nuevo problema de conservación. *Cuadernos de Herpetología* 20.
- 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.
- Quiroga, L.B., Moreno, M.D., Cataldo, A.A., Aragón-Traverso, J.H., Pantano, M.V., Olivares, J.P.S., Sanabria, E.A., 2015. Diet composition of an invasive population of *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog) from Argentina. *Journal of Natural History* 49, 1703–1716.
- R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reid, W.V., Mooney, H.A., Cropper, A., Capistrano, D., Carpenter, S.R., Chopra, K., Dasgupta, P., Dietz, T., Duraiappah, A.K., Hassan, R., et al., 2005. Ecosystems and human well-being - Synthesis: A Report of the Millennium Ecosystem Assessment. Island Press, Washington D.C.
- Ruibal, M., Laufer, G., 2012. Bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: *Ranidae*) tadpole diet: description and analysis for three invasive populations in Uruguay. *Amphibia-Reptilia* 33, 355–363.

- Salo, P., Korpimäki, E., Banks, P.B., Nordström, M., Dickman, C.R., 2007. Alien predators are more dangerous than native predators to prey populations. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 274, 1237–1243.
- Schlaepfer, M.A., Runge, M.C., Sherman, P.W., 2002. Ecological and evolutionary traps. *Trends in Ecology & Evolution* 17 (10), 474–480.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Natura methods* 9 (7), 671–675.
- Sexton, O.J., Phillips, C., 1986. A qualitative study of fish-amphibian interactions in 3 Missouri ponds. *Transactions of the Missouri Academy of Science* 20, 25–35.
- Sih, A., Bolnick, D.I., Luttbeg, B., Orrock, J.L., Peacor, S.D., Pintor, L.M., Preisser, E., Rehage, J.S., Vonesh, J.R., 2010. Predator–prey naïveté, antipredator behavior, and the ecology of predator invasions. *Oikos* 119, 610–621.
- Silva, E.T. da, Both, C., Filho, O.P.R., 2016. Food habits of invasive bullfrogs and native thin-toed frogs occurring in sympatry in southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology* 11, 25–33.
- Silva, E.T., Filho, O.P.R., Feio, R.N., 2011. Predation of native anurans by invasive bullfrogs in southeastern Brazil: spatial variation and effect of microhabitat use by prey. *South American Journal of Herpetology* 6, 1–10.
- Silva, E.T., Reis, E.P.D., Feio, R.N., Filho, O.P.R., 2009. Diet of the invasive frog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: *Ranidae*) in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. *South American Journal of Herpetology* 4, 286–294.
- Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D.A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., et al., 2013. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in ecology & evolution* 28, 58–66.
- Simberloff, D., Von Holle, B., 1999. Positive interactions of nonindigenous species: invasional meltdown? *Biological invasions* 1, 21–32.
- Skelley y Richardson, 2010. Larval sampling. En: *Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques*. Dodd, C.K., 2010. Oxford University Press, p. 246.
- Toledo, L.F., Ribeiro, R.S., Haddad, C.F.B., 2007. Anurans as prey: an exploratory analysis and size relationships between predators and their prey. *Journal of Zoology* 271, 170–177.
- Texeira de Mello, F., Gonzalez-Bergonzoni, I., Loureiro, M., 2011. Peces de agua dulce de Uruguay. PPR-MGAP.
- Werner, E.E., Wellborn, G.A., McPeck, M.A., 1995. Diet composition in postmetamorphic bullfrogs and green frogs: implications for interspecific predation and competition. *Journal of Herpetology* 29, 600.
- Wilson, A.D.M., Krause, J., 2012. Personality and metamorphosis: is behavioral variation consistent across ontogenetic niche shifts? *Behavioral Ecology* 23, 1316–1323.
- Wisenden, B.D., 2000. Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355, 1205–1208.

- Wu, Z., Li, Y., Wang, Y., Adams, M.J., 2005. Diet of introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*): predation on and diet overlap with native frogs on Daishan Island, China. *Journal of Herpetology* 39, 668–674.
- Zank, C., Di-Bernardo, M., Maneyro, R., Colombo, P., Fusinatto, L.A., Fonte, L.F.M. da, 2010. Spatial and temporal distribution of *Pseudis minuta* (Anura, *Hylidae*, *Hylinae*) and environmental variables related to its reproductive activity in Reserva Biológica do Lami, southern Brazil. *Iheringia. Série Zoologia* 100, 145–150.
- Zhang, F., Zhao, J., Zhang, Y., Messenger, K., Wang, Y., 2015. Antipredator behavioral responses of native and exotic tadpoles to novel predator. *Asian Amphibians and Reptiles*, 51–58.

Agradecimientos

A Gabriel y Lucía por orientarme de manera excelente durante todo el proceso de la pasantía, por la buena onda y disposición en todo momento

A Noe por su gran ayuda en todo momento

Al Museo Nacional de Historia Natural, en especial al Área de Biodiversidad y Conservación por abrirme las puertas para realizar mi pasantía

Al Centro Universitario Regional Este, Maldonado, que me brindó las instalaciones para llevar a cabo los experimentos

A Andre, Anita y Maca por sus aportes y colaboraciones en el proceso de análisis de los videos

A mi familia: mamá, papá, sofi, gusti, ali, mile y emi por acompañarme y apoyarme siempre en todas mis decisiones

A mis abuelos, tíos y primos

A mi amiga Vero por su linda compañía a lo largo de estos años y los que vendrán

A todos mis amigos y compañeros con los que compartí las distintas etapas de la carrera

A María José Albo y Marcelo Loureiro por acceder a la corrección del manuscrito

¡Muchas gracias!

Anexo

Videos disponibles on-line:

- Link 1. Movimiento de *Pseudis minuta* en acuarios de experimentación:
<https://www.flickr.com/photos/155806382@N02/36965267423/in/datetaken/>
- Link 2. Procedimiento de agregado de agua con señal química:
<https://www.flickr.com/photos/155806382@N02/23782787328/in/datetaken/>



Figura A 1. Registro de secuencia de puntos de desplazamientos de los individuos de *Pseudis minuta* en un intervalo de tiempo.

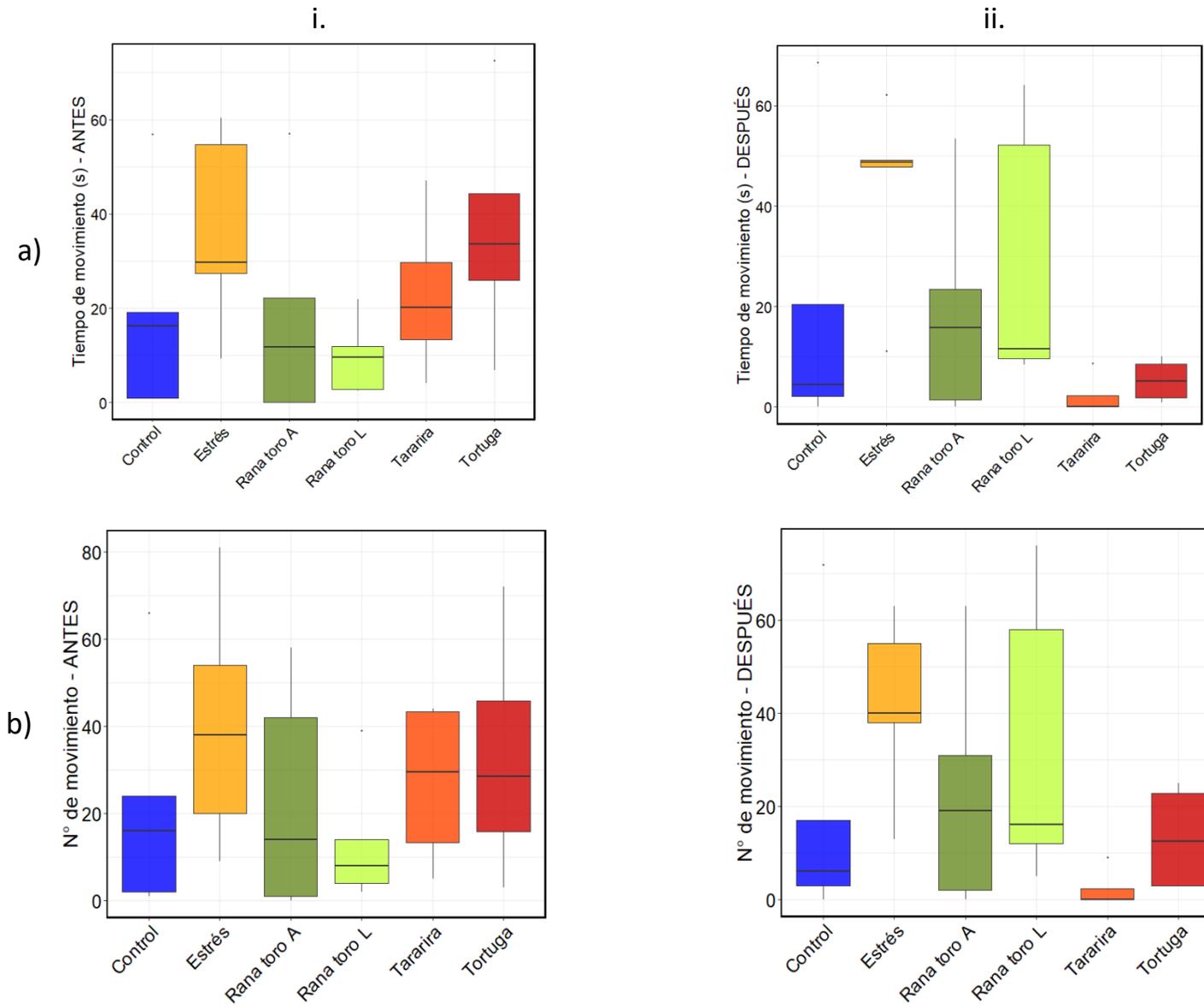


Figura A 2. a) Tiempo total de movimiento y b) Número de eventos de movimiento, de individuos adultos de *Pseudis minuta* i. antes y ii. después de recibir la señal correspondiente al tratamiento: agua de clorada (azul), estrés (amarillo), rana toro adulto (verde oscuro), rana toro larva (verde claro), tararira (anaranjado) y tortuga (rojo). La línea gruesa indica la mediana, las líneas finas de las cajas percentiles 25 y 75%.

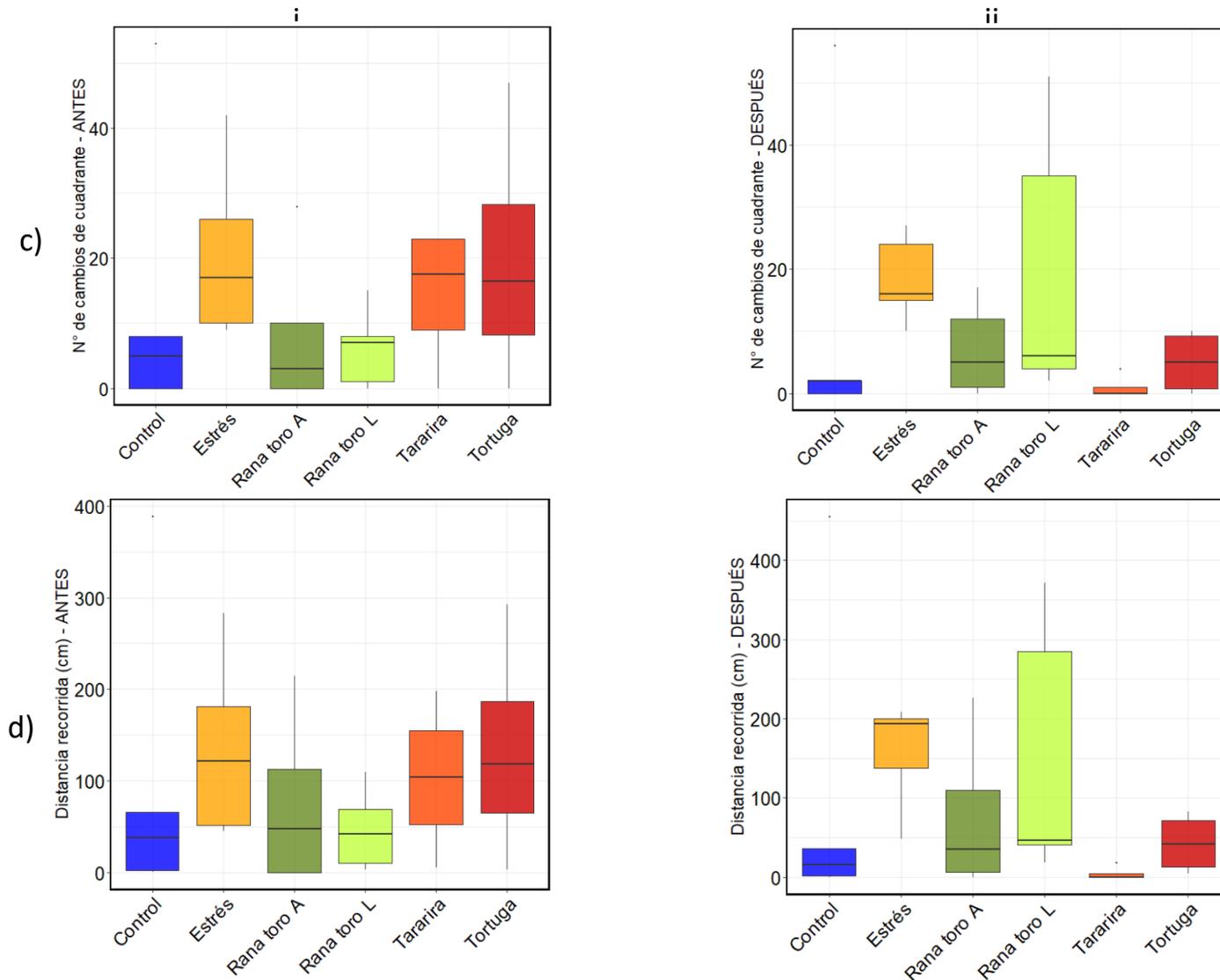


Figura A 3. c) Número de eventos de cambio de cuadrante y d) Distancia total recorrida por individuos adultos de *Pseudis minuta* i. antes y ii. después de recibir la señal correspondiente al tratamiento: agua declorada (azul), estrés (amarillo), rana toro adulto (verde oscuro), rana toro larva (verde claro), tararira (anaranjado) y tortuga (rojo). La línea gruesa indica la mediana, las líneas finas de las cajas percentiles 25 y 75%.