

LOS MURCIÉLAGOS EN LOS PARQUES NACIONALES DE MONFRAGÜE Y CABAÑEROS: DIVERSIDAD, ESPECIES CRÍPTICAS DE MURCIÉLAGO HORTELANO Y PRESENCIA VIRAL

JAVIER JUSTE¹, CARLOS IBÁÑEZ¹, OSCAR DE PAZ², GONZALO PÉREZ-SUAREZ², SUSANA MARTÍNEZ-ALÓS², ADRIÁN VÁZQUEZ HERNÁNDEZ², JESÚS NOGUERAS¹, GODFRIED SCHREUR¹, ADRIÁN BAÑOS-VILLALBA¹, CRISTINA RODRIGUEZ-NEVADO³, FRANCISCO POZO³, JUAN EMILIO ECHEVARRÍA³

RESUMEN

El presente estudio presenta tres objetivos fundamentales: 1) contribuir al conocimiento de las comunidades de murciélagos de los Parques Nacionales de Monfragüe y Cabañeros. 2) realizar un estudio comparado morfológico y ecológico de las dos especies crípticas de murciélagos hortelano (*Eptesicus serotinus* y *E. isabellinus*) y 3) estudiar la presencia de virus de rabia y herpes en ambas especies. En este sentido, se ha comprobado que los murciélagos son, con diferencia, el grupo de mamíferos más diverso en ambos parques estudiados (15 especies en cada parque y 18 en total). Aunque ninguna de las especies parece mostrar problemas inmediatos desde un punto de vista de la conservación, se propone tomar medidas específicas para favorecer la presencia de especies forestales raras como el murciélago ratonero forestal (*Myotis bechsteinii*) o el murciélago ratonero de escalera (*M. escalerai*).

A nivel morfológico, se ha comprobado que *E. serotinus* es significativamente mayor que la especie gemela *E. isabellinus*, aunque existe gran solapamiento en todas las medidas; y siendo la serie dental superior (C¹-M³) la variable que mejor discrimina (aunque con solapamiento) las dos especies. Se ha comprobado una clara distinción en color entre los dos *Eptesicus* excepto en la zona de contacto, en la que ambas especies muestran color similar y por lo tanto el color dorsal queda invalidado como carácter diagnóstico. De forma similar, el patrón cuticular de los pelos es también muy parecido en ambas especies. Los cantos de ecolocación son similares entre especies y no parece un carácter útil para diferenciarlas, por lo que el diagnóstico molecular por secuenciación de ADN se mantiene como única forma fiable de reconocimiento específico.

No se ha detectado presencia de rabia en las poblaciones estudiadas de *Eptesicus* de los Parques Nacionales de Monfragüe y Cabañeros, y se confirma la baja frecuencia de individuos excretores de EBLV1

¹ Estación Biológica de Doñana (CSIC).
Avda. Américo Vespucio, s/n. 41092 La Cartuja, (SEVILLA). juste@ebd.csic.es

² Departamento de Ciencias de la Vida.
Edificio de Ciencias. A-2, Km 33,600. Universidad de Alcalá. 28871 Alcalá de Henares (MADRID)

³ Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Víricas Inmunoprevenibles. Unidad de Aislamiento y Detección de Virus.
Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. 28220 Majadahonda (MADRID)

en poblaciones naturales de estos murciélagos. Se han detectado por otro lado, herpesvirus en todas las poblaciones y que sugieren contacto entre ambas especies próximas.

Palabras clave: *Eptesicus*, *serotinus*, *isabellinus*, color, ecolocación, morfología, rabia, Lyssavirus, herpesvirus

BATS FROM THE NATIONAL PARKS OF MONFRAGÜE AND CABAÑEROS: DIVERSITY, CRYPTIC SPECIES OF SEROTINE BATS AND VIRAL PRESENCE

SUMMARY

This study has three main objectives: 1) to contribute to the knowledge of bat communities of Monfragüe and Cabañeros National Parks. 2) Conduct a comparative morphological and ecological study of two cryptic species of serotine bats (*Eptesicus serotinus* and *E. isabellinus*) and 3) study the presence of rabies and herpes viruses in both species. In this regard, it has been found that bats are by far the most diverse group of mammals in both parks (15 species in each park and 18 in total). Although none of the bat species seem to show immediate problems from a conservation point of view, we propose to take specific measures to favor the presence of rare forest species such as Bechstein's bat *Myotis bechsteinii* and Escalera's bat, *M. escaleraei*.

At the morphological level, it was found that *E. serotinus* is significantly larger than *E. isabellinus*, although there is considerable overlap in all measurements; being the dental series (C^1-M^3), the variable that best discriminated (with some overlap) between the two sibling species. Besides, a clear distinction in dorsal color between the two *Eptesicus* was found except in the contact area, in which both species exhibited similar dark-brown color. Therefore, dorsal color is not validated as a diagnostic character between species. Similarly, the cuticle pattern of the hair was very similar in both species. Echolocation calls were also similar in both species and it seems not useful as a tool to differentiate them. So, molecular diagnosis by DNA sequencing remains the only reliable way of a specific recognition for this species complex.

The presence of rabies could not be detected in the studied populations of *Eptesicus* from both Monfragüe and Cabañeros national parks. This result confirms the low frequency of individuals shedding EBLV1 in natural populations. On the contrary, herpesviruses were detected in all the population and their haplotypes' distribution suggests contact between the two closely related species.

Key words: *Eptesicus*, *serotinus*, *isabellinus*, color, echolocation, morphology, rabies, Lyssavirus, herpesvirus.

INTRODUCCION

La distinción de especies en la Naturaleza (y por lo tanto la estimación de la biodiversidad) está condicionada por la capacidad del observador para distinguir caracteres que identifiquen y distingan dichas especies. La aplicación reciente de técnicas moleculares (p.e. citogenética) ha contribuido enormemente a mejorar esta distinción taxonómica y percepción de la biodiversidad, permitiendo la diferenciación y reconocimiento de especies que permanecían desapercibidas dentro de un grupo de organismos por presentar similar aspecto externo (denominándose especies crípticas). Esta diversidad 'escondida' aparece en todo tipo de organismos y, contrariamente a lo esperado, en igual proporción entre insectos, reptiles o mamíferos (PFENNINGER & SCHWENK 2007). Su reconocimiento es vital tanto para la obtención de estimas cada vez más realistas de la biodiversidad, como para la correcta valoración, gestión y conservación del medio natural y en particular en las áreas protegidas por los Parques Nacionales.

Los murciélagos cuentan con unas 30 especies en la Península Ibérica (SECEMU 2010). Es el orden de mamíferos más diverso, representando aproximadamente un tercio de su fauna mastozoológica. Estudios recientes (IBÁÑEZ *et al.* 2006; GARCÍA-MUDARRA *et al.* 2009) han demostrado que los murciélagos ibéricos presentan linajes evolutivos crípticos en más del 20 % de las especies 'tradicionalmente' consideradas. Estos linajes corresponden en ocasiones a especies y subespecies nuevas para la fauna Ibérica, difíciles de distinguir en un grupo caracterizado ya por una taxonomía difícil. Estos nuevos linajes además presentan una distribución confusa y sólo parcialmente conocida hasta el momento. Los quirópteros constituyen también el grupo de mamíferos con más problemas de conservación a escala general y urge pues la búsqueda y el reconocimiento -cuando éste sea posible- de caracteres claros de identificación que permitan un fácil reconocimiento de las especies así como conocer su distribución, particularmente en las áreas protegidas.

Por otro lado, se ha puesto en evidencia en los últimos años el rol destacado de los murciélagos como reservorios originales de virus productores de rabia y otras enfermedades emergentes tales como síndromes respiratorios (ej. SARS, Hendra), hemorrágicos como Ebola y Marburg y neurológicos como Nipah (CALISHER *et al.* 2006; DOBSON 2005; LEROY *et al.* 2005; TOWNER *et al.* 2007; WANG *et al.* 2006). En particular, la rabia en murciélagos se conoce en Europa desde 1954 y es endémica en el sur de la Península Ibérica y gran parte de Europa. Se sabe que está asociada a cinco virus: el lyssavirus europeo de murciélagos tipo 1 (EBLV1) y el tipo 2 (EBLV2), el lyssavirus Bokelo (BBLV), el virus europeo del Cáucaso occidental (WCBV) y el lyssavirus Lleida (LLEV) y que el 95% de los murciélagos infectados en Europa (y todos los detectados en España hasta el momento) han sido murciélagos del género *Eptesicus*, denominados comúnmente murciélagos hortelanos. Aunque se conoce muy poco sobre los procesos de transmisión y dispersión del virus EBLV1, estudios recientes indican que los niveles de prevalencia de anticuerpos frente al EBLV1 en poblaciones naturales de murciélagos hortelanos es muy baja y dispar (VÁZQUEZ-MORÓN *et al.* 2008) y que está lógicamente relacionada con la organización social y ecología de los murciélagos huéspedes.

En este sentido hay que resaltar que el murciélago hortelano, es relativamente abundante en Iberia y constituye él mismo un ejemplo sorprendente de complejo de especies crípticas en murciélagos. De hecho, lo que hasta hace poco se reconocía como una única especie común y con amplia distribución por Europa, ahora sabemos que en realidad está constituido por dos linajes evolutivos muy diferenciados entre sí pero morfológicamente similares: la especie *Eptesicus serotinus* (Schreber, 1774) con distribución europea y localidad típica en Francia y la especie *Eptesicus isabellinus* (Temminck, 1839) distribuida por el noroeste mediterráneo de Africa y sur de Iberia con Trípoli (Libia) como localidad típica (IBÁÑEZ *et al.* 2006; JUSTE *et al.* 2009; JUSTE *et al.* 2013). Las dos especies no muestran diferencias claras morfológicas excepto quizá la coloración del pelaje que es marrón intenso en la forma norteña (*E. se-*

rotinus) y pálida y pajiza en la especie meridional (*E. isabellinus*). Además presentan pequeñas diferencias en los cantos de ecolocación (HORTA *et al.* 2015). Sin embargo la generalidad de estos caracteres no está comprobada y la validez misma de la distinción taxonómica de las dos especies se ha puesto en duda (SIMMONS 2005), siendo hasta el momento sólo posible distinguirlas inequívocamente a nivel molecular.

De hecho, la utilización de marcadores moleculares nos ha permitido aclarar la distribución general de los dos linajes en Iberia. Mientras que el linaje correspondiente al 'verdadero' hortelano *Eptesicus serotinus* se ha encontrado en parte de Extremadura, Castellón, Guadalajara, Madrid, Valladolid, Aragón, La Rioja, País Vasco e islas Baleares, el otro linaje representado por *E. isabellinus* ha aparecido hasta el momento en toda Andalucía, Murcia, Valencia, parte de Extremadura y Castilla-La Mancha (IBÁÑEZ *et al.* 2006, IBÁÑEZ 2007). Estos datos sugieren que las dos especies muestran en Iberia una distribución contigua (parapátrica) con una zona de contacto de anchura desconocida que recorre de este a oeste la zona centro peninsular y atraviesa las áreas protegidas de los Parques Nacionales de Monfragüe y Cabañeros.

En este marco se planteó el presente estudio con finalidad múltiple y enfoque multidisciplinario. En primer lugar, se propuso la identificación de las especies que constituyen la comunidad de murciélagos dentro de los Parques Nacionales de Monfragüe y Cabañeros y comprobar la presencia de ambas especies en los espacios protegidos referidos. En segundo lugar, estudiar el complejo de murciélago hortelano del género *Eptesicus* en estas zonas protegidas desde un punto de vista morfológico, ecológico y sanitario, y proporcionar -en lo posible- herramientas para la identificación inequívoca de las dos especies *E. serotinus* y *E. isabellinus*. Ello por dos razones principales: a) los dos parques referidos se sitúan en la zona de contacto entre ambas especies, siendo de esperar que en ellos convivieran las dos especies de murciélago y b) ambas especies son portadoras del virus de la rabia EBLV1 y otros virus potencialmente patógenos para el hombre (causantes de enfermedades emergentes) como pueden ser los herpes-

virus. Para una contextualización adecuada se buscó comparar los patrones morfológicos y de ecolocación de poblaciones de las dos especies simpátricas, o en contacto, con los de poblaciones de cada especie alopatricas, o no en contacto, determinando la prevalencia de los virus estudiados en todas las poblaciones.

MATERIAL Y METODOS

El carácter multidisciplinar del estudio queda plasmado en la diversidad de metodologías aplicadas:

Toma de datos

Los muestreos se diseñaron dentro de los parques nacionales de Cabañeros y Monfragüe y zonas aledañas tanto para completar el conocimiento de los murciélagos de ambas zonas protegidas como para la localización específica de colonias de murciélago hortelano como objetivo fundamental del proyecto. Se basó en la inspección diurna de refugios potenciales (puentes, casas abandonadas, etc.) y la colocación de redes japonesas durante las horas de actividad nocturna en zonas propicias como abrevaderos, puntos de agua, interior del bosque, etc. Se contó además con el apoyo de detectores de ultrasonidos. El muestreo de estas colonias en la zona de simpatría se completó con el muestreo complementario de distintas colonias en alopatría donde sólo una de las especies estaba presente. Además para los estudios víricos se contó con muestras de ambas especies depositadas en el Instituto de Salud Pública Carlos III (ISCIII) de Majadahonda (Madrid). Los ejemplares de *Eptesicus* capturados se marcaron con anillas proporcionadas por la Oficina de Especies Migratorias del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y posteriormente por la Asociación Española para el Estudio y Conservación de los Murciélagos (SECEMU).

Todos los murciélagos capturados fueron identificados, sexados, comprobado su estado reproductor, evaluada su edad (joven del año o adulto), medidos (antebrazo) y finalmente liberados en el mismo lugar de captura.

Además, se incidió de forma especial en los murciélagos hortelanos del género *Eptesicus* por ser objetivo fundamental del proyecto y con ellos se profundizó la toma de datos:

1) **Morfometría:** se midieron variables alares (longitud de los metacarpianos III y V, longitudes de las falanges 1 y 2 de los dedos III a V), así como la longitud de la serie dentaria superior (C^1 - M^3) y la anchura rostral tomada a nivel de los caninos (C^1 - C^1). Se tomaron biopsias de la membrana alar (para su posterior identificación molecular), exudado bucofaríngeo (en tampón de transporte y lisis) para detectar presencia de virus y pelo para estudiar el patrón cuticular. 2) **Color:** Se cuantificó el color del pelaje dorsal midiendo la reflectancia de luz de xenón en un colorímetro de alta resolución (Spectrophotometer CM-2600d/2500d, Konica, Minolta). Para cada individuo se tomaron 2 medidas siendo cada una a su vez el promedio de tres destellos. La reflectancia se midió en una banda de longitud de onda seleccionada entre 350 y 650 nm 3) **Ecolocación:** Se registraron en un detector/grabador (Pettersson D1000) los ultrasonidos de las colonias estudiadas a la salida del refugio. Asegurándose previamente la dirección y trayectoria de los animales y situándose en esa trayectoria en un punto a más de 50 m del refugio en el que los animales volaban a una altura superior a 10-20 m. Idealmente los murciélagos grabados deberían volar solitarios y verse. Se tomaron entre 30 y 50 secuencias de grabación por colonia y un solo pulso fue seleccionado y medido por secuencia.

Análisis

La asignación de todos los ejemplares capturados a uno de los dos linajes o especies gemelas dentro de *Eptesicus* se ha realizado sin ambigüedades tras la amplificación y secuenciación de un marcador de ADN mitocondrial que ha sido utilizado en otros trabajos (IBÁÑEZ *et al.* 2006).

- Las variables morfométricas y de color, agrupadas por poblaciones (=colonias) se han comparado mediante programas propios ("scripts") utilizando lenguaje R (<https://www.r-project.org/>).

- El estudio de la morfología de pelos se basó en la comparación por microscopía electrónica de barrido (ZEISS DSM-950) de pelos de diversas poblaciones de ambas especies. Las muestras fueron metalizadas previamente con oro en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Alcalá de Henares mediante un metalizador (POLARON E5000) y con el apoyo técnico del Servicio de Microscopía de la UAH. En el estudio se compararon distintas partes (raíz, base y zona intermedia y distal) tanto de pelos de lana como de guarda de ambas especies.
- El análisis de sonidos se realizó en el laboratorio de acústica de la EBD. Las grabaciones se revisaron manualmente con el software BATSOUND, se excluyeron aquellas que por fecha podían incluir cantos juveniles, y para cada secuencia se seleccionó un solo pulso que cumpliera los requisitos de máxima calidad. Posteriormente con el software SCAN-R se midieron automáticamente 14 variables para el conjunto de pulsos seleccionados y agrupados por poblaciones.
- El estudio de virus se realizó en los laboratorios de ISCIII de Majadahonda (Madrid). La extracción del ARN se realizó mediante precipitaciones sucesivas con iso-propanol y etanol de 70 % y re-suspensión final del pellet en agua destilada libre de ribonucleasas. En cada ensayo se incluyeron controles positivos de baja intensidad y negativos. El análisis se centró en el rastreo del virus de la rabia de murciélagos EBLV1 y en Herpesvirus. La presencia de ARN de EBLV1 se detectó por dos RTPCR diferentes, una específica para todos los lyssavirus productores de rabia y otra genérica del grupo Dimarhabdovirus de la familia Rhabdoviridae siguiendo las especificaciones de VÁZQUEZ-MORÓN *et al.* (2008). Para detectar los herpesvirus se utilizaron dos PCR genéricas para amplificar el gen de la ADN polimerasa (PCR-pol) y el exón 2 del gen de la subunidad ATPasa de la terminasa (PCR-ter) según la metodología descrita en POZO *et al.* (en rev.).

RESULTADOS

Datos faunísticos:

En el PN de Monfragüe se han llevado a cabo 110 prospecciones en 94 emplazamientos distintos tanto dentro del Parque Nacional como dentro de su área de influencia socioeconómica (AIS). Se han realizado 52 muestreos sin redes en 48 emplazamientos diferentes, con inspecciones de puentes u otro tipo de refugios potenciales y escuchas con detector y 48 sesiones de captura con redes en 45 puntos distintos. Tras este esfuerzo de muestreo se comprobó la presencia de 15 especies dentro del Parque (Tabla 1). Por otro lado, en las proximidades y dentro del PN Cabañeros se revisaron un total de 42 refugios potenciales y se realizaron capturas con redes en 26 puntos de muestreo. Además, para este parque se contó con el apoyo de 75.000 minutos de registro de ultrasonidos con grabadoras de registro automático (SM2BAT Wildlife Acoustics) programadas para grabar con una frecuencia de muestreo de 192 kHz durante el periodo de grabación y repartidos por el Parque. En total se comprobó la presencia de 15 especies dentro del Parque (Tabla 1).

Localización y muestreo de colonias de murciélago hortelano

La localización de colonias ha requerido la integración de diferentes metodologías (inspección, emisores, apoyo grupos locales, etc.) y siempre en el intento de comparar para cada especie, poblaciones simpátricas y alopátricas. Así se consiguieron muestrear 20 individuos de 4 colonias de cría de *E. isabellinus* y 2 de *E. serotinus* en la zona de Monfragüe y 3 colonias de *E. isabellinus* en la zona de Cabañeros, donde no se consiguió localizar ninguna colonia de *E. serotinus* a pesar de haberse capturado individuos sueltos de esta especie. Para comparar estas colonias simpátricas se realizó un muestreo por el norte de la Península (Valladolid, País Vasco y Galicia) de colonias exclusivas (alopátricas) de *E. serotinus* y otro muestreo de colonias alopátricas de *E. isabellinus* por Andalucía. Como resultado se loca-

lizaron y muestrearon un total de 19 colonias para las dos especies, de las cuales 7 están en simpatria (Tabla 2 y Fig. 1).

Morfología

Los análisis indican que en las 5 variables alares (AB, IIIIC, IVF1, VMC, VF1) y las dos craneales (C^1-C^1 y C^1-M^3) existen diferencias sutiles, pero significativas en sentido de que la especie *E. serotinus* ofrece de media un mayor tamaño. Dicho patrón se aprecia tanto en el tamaño alar como en las medidas craneales (Fig. 2). Es interesante resaltar que en las medidas alares parece que ambas especies

ESPECIE	PN	
	Cabañeros	Monfragüe
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	X	X
<i>Rhinolophus hipposideros</i>	X	X
<i>Rhinolophus euryale</i>	X	
<i>Myotis myotis</i>	X	X
<i>Myotis bechsteini</i>		X
<i>Myotis emarginatus</i>		X
<i>Myotis escaleraei</i>		X
<i>Myotis daubentonii</i>	X	X
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	X	
<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	X	X
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	X	X
<i>Nyctalus leisleri</i>	X	
<i>Hypsugo savii</i>	X	X
<i>Eptesicus serotinus</i>	X	X
<i>Eptesicus isabellinus</i>	X	X
<i>Plecotus austriacus</i>	X	X
<i>Miniopterus schreibersii</i>	X	X
<i>Tadarida teniotis</i>	X	X

Tabla 1. Listas faunística de la comunidad de murciélagos de los PPNN de Monfragüe y Cabañeros y cuya presencia se ha comprobado en este estudio. En amarillo se resaltan las especies incluidas en la directiva de hábitat de la UE y en verde las especies que han resultado más abundantes en ambas áreas de estudio.

Table 1. Species lists of the ensemble of bats in the National Parks of Monfragüe and Cabañeros and which presence has been confirmed in this study. In yellow are highlighted the species included within the habitat directive of the EU and in green those species that have been found more abundant in both study areas.

comparten el mismo patrón con valores menores en las poblaciones en simpatria. Por otro lado, la longitud de la serie dental (C^1-M^3) parece ser la mejor variable capaz de discriminar las especies, aunque con cierto solapamiento en sus valores.

Color

Solo se han tenido en cuenta las medidas de color de la parte dorsal. Se observó que a partir de 400 nm las poblaciones alopatricas de las dos especies se diferencian claramente a lo largo de todo el espectro seleccionado, mientras que las poblaciones simpáticas muestran valores similares para ambas especies.

Estos resultados se visualizan claramente en un análisis multivariante de componentes principales considerando las distintas longitudes de onda como variables y en el que el eje PC1 absorbe el 78% de la varianza, y el PC2 el 18% (Fig. 3). En relación a la morfología de los pelos, el estudio detallado de las distintas partes (raíz, base y zona intermedia y distal) tanto de pelos de lana como de guarda de ambas especies mostró la ausencia de diferencias relevantes en ninguna de las zonas estudiadas (Fig. 4).

Ecolocación

Los análisis de las variables de los pulsos de ecolocación son todavía preliminares pero muestran la existencia de cierta segregación entre las especies, siendo la frecuencia de máxima amplitud de los pulsos de media algo mayor (Fig. 5) en *E. serotinus* (26,59 kHz) frente a *E. isabellinus* (25,09 kHz) Por otro lado, mientras que para *E. isabellinus* parece no haber diferencias en frecuencia entre poblaciones simpáticas (25,36 kHz) y alopatricas (24,67 kHz), en *E. serotinus* parece que las poblaciones simpáticas emiten a frecuencias más bajas (24,98 kHz) que las alopatricas (27,66 kHz) que a su vez muestran una duración claramente menor de los pulsos (Fig. 5).

	Cód.	Localidad	Lat	Long
<i>Eptesicus serotinus</i>	CHA	Chain, Pontevedra	42,351724	-8,518037
	MAM	Tudela de Duero, Valladolid	41,584329	-4,581144
	CAN	O Caneiro, A Coruña	43,600724	-8,054872
	PCR	Talayuela, Cáceres	40,068445	-5,468042
	CTJ	Casatejada, Cáceres	39,981212	-5,703476
UGA	Ugao, Vizcaya	43,178592	-2,902767	
<i>Eptesicus isabellinus</i>	BOQ	Jaraicejo, Cáceres	39,751740	-5,849020
	AZN	Aznalcóllar, Sevilla	37,533982	-6,301720
	ORG	Órgiva, Granada	36,871927	-3,472753
	ALC	Alcalá del Río, Sevilla	37,518513	-5,974804
	GAR	Garrovillas, Cáceres	39,754291	-6,437496
	COR	Romangordo, Cáceres	39,775425	-5,713662
	HOR	Horcajo de los Montes, Ciudad Real	39,290536	-4,551574
	NAV	Boquerón, Ciudad Real	39,496378	-4,541085
	POS	Posadas, Córdoba	37,796783	-5,105184
	USO	La Estrella, Toledo	39,734097	-5,057003
	SER	Serradilla, Cáceres	39,791583	-6,131977
	TOR	Torrejón el Rubio, Cáceres	39,829758	-6,035096
	TRJ	Cabezas de San Juan, Sevilla	37,032627	-5,927165

Tabla 2. Listado y localización de las colonias estudiadas de las dos especies crípticas de murciélago hortelano (*E. serotinus* y *E. isabellinus*) distribuidas por toda la Península Ibérica. En rojo se muestran las colonias consideradas simpáticas o en contacto.

Table 2. List and location of the colonies studied of the two cryptic bat species (*E. serotinus* and *E. isabellinus*) distributed throughout the Iberian Peninsula. Red colonies are those considered sympatric or in contact.



Figura 1. Distribución de las colonias estudiadas de las dos especies crípticas de murciélago hortelano (*E. serotinus* y *E. isabellinus*) en la Península Ibérica. Dentro de la elipse se enmarcan las poblaciones consideradas en simpatria. Los acrónimos siguen la Tabla 1.

Figure 1. Distribution of the studied colonies of two cryptic species of serotine bat (*E. serotinus* and *E. isabellinus*) in the Iberian Peninsula. The ellipse frames the populations that are considered in sympatry. Acronyms follow Table 1.

Virus

En los exudados oro-faríngeos se determinó ARN de EBLV1 por reacción en cadena de la polimerasa utilizando dos técnicas de RT-PCR diferentes. Se analizaron de esta forma un total de 258 muestras a lo largo del proyecto correspondientes a las dos áreas protegidas del PN Monfragüe y del PN de Cabañeros. Los resultados de los análisis fueron negativos para todas las muestras analizadas para la RT-PCR genéricas de lyssavi-

rus. Respecto a herpesvirus, se encontró una incidencia de positivos en el 38% del total de 182 *E. isabellinus* examinados y en el 27 % de 100 *E. serotinus* examinados. Se encontró además una relación clara entre haplotipos específicos y las especies de murciélagos, detectándose un haplotipo (terBHV1) que siendo muy común en *E. isabellinus* aparece también en un individuo en simpatria de *E. serotinus* (Tabla 3).

DISCUSIÓN

El estudio faunístico ha confirmado la gran diversidad e importancia que las comunidades de murciélagos presentan para los mamíferos de ambos parques estudiados, con 18 especies en total, y que suponen casi dos tercios de la fauna Ibérica de este grupo. Por otro lado, el estudio muestra que estas comunidades de murciélagos presentan una composición muy similar en ambas zonas protegidas, como era de esperar ya

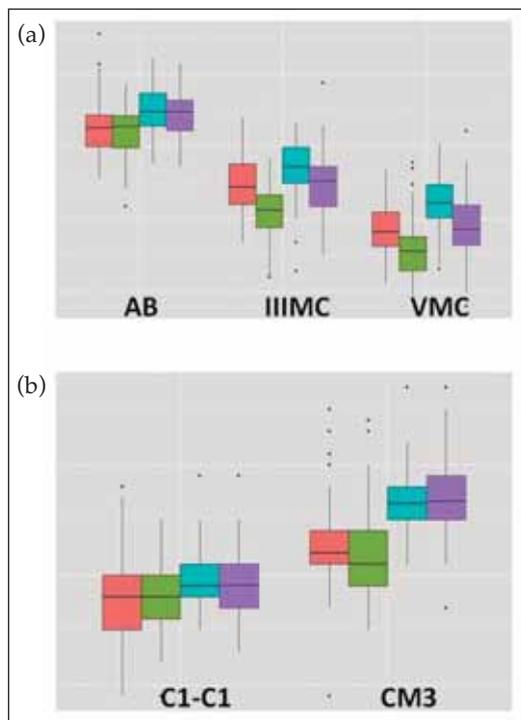


Figura 2. Comparación entre poblaciones de *E. isabellinus* en alopatría (rosa) y simpatria (verde) con poblaciones de *E. serotinus* en alopatría (azul) y simpatria (morado) en a) medidas alares y b) medidas dentales. AB: antebrazo, IIIIMC: metacarpiano del tercer dedo, VMC: metacarpiano del quinto dedo, C¹-C¹: distancia entre caninos, C¹-M³: serie dental. Las cajas indican los valores entre el primer y tercer cuartil (75% de los datos).

Figure 2. Comparison of populations of *E. isabellinus* in allopatry (pink) and in sympatry (green) with populations of *E. serotinus* in allopatry (blue) and sympatry (purple) in a) wing measures b) dental measures. AB: forearm, IIIIMC: metacarpal of the third finger, VMC: metacarpal of the fifth finger, C¹-C¹: distance between canines, C¹-M³: dental series. Boxes indicate values within the first and third quartile (75% of the data).

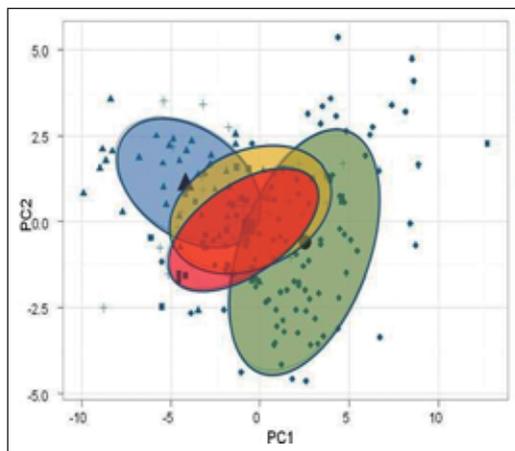


Figura 3. Representación frente a los dos primeros ejes de un análisis de PCA de los valores de color de las poblaciones de *E. isabellinus* en alopatría (verde) y simpatria (rosa) con poblaciones de *E. serotinus* en alopatría (azul) y simpatria (ocre). Se marcan las elipses de confianza al 95% y los centroides para cada uno de ellas.

Figure 3. Representation within the first two axes of a PCA analysis of the color values of the populations of *E. isabellinus* in allopatry (green) and in sympatry (pink) with populations of *E. serotinus* in allopatry (blue) and in sympatry (ochre). Confidence ellipses at 95% and centroids for each of them are marked.

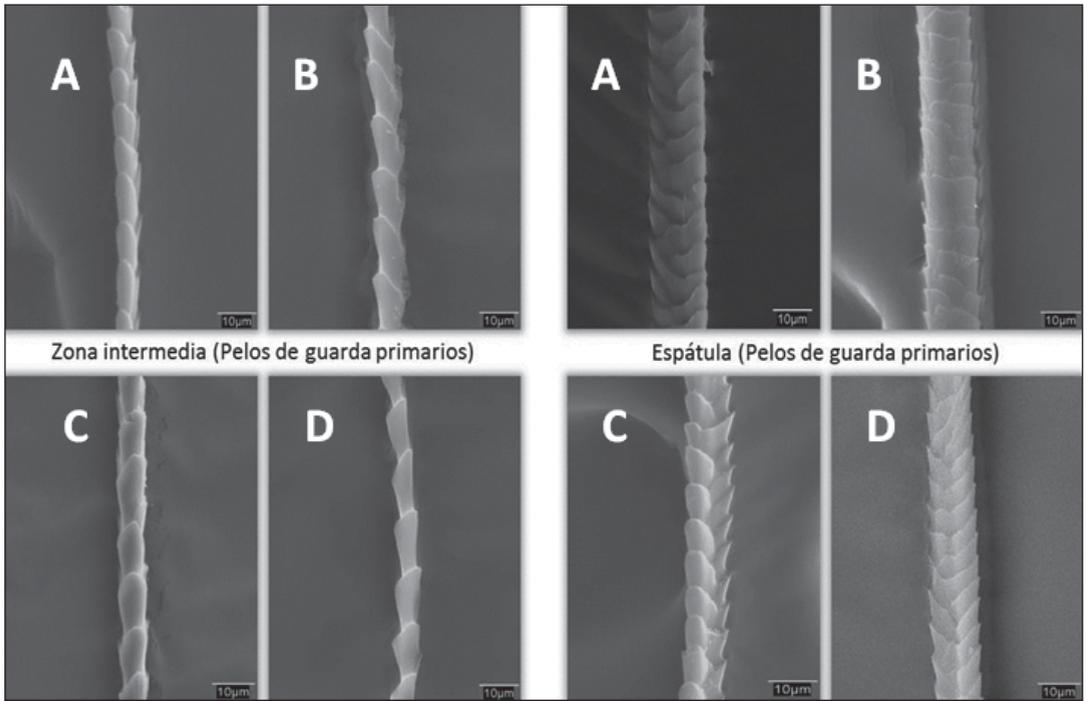


Figura 4. Microfotografías electrónicas de barrido de la zona intermedia y espátula de pelos de guarda dorsales de las especies crípticas de murciélagos hortelanos *Eptesicus isabellinus* (A y C) y *E. serotinus* (B y D).

Figure 4. Electron Microscope shots of the root and basal area of dorsal guard hairs of the cryptic species of serotine bats *Eptesicus isabellinus* (A and C) and *E. serotinus* (B and D).

Tabla 3. Listado y localización de cada uno de los haplotipos para el fragmento del gen de la terminasa estudiado en muestras de las dos especies crípticas de murciélago hortelano (*E. serotinus* y *E. isabellinus*) distribuidas por toda la Península Ibérica. En gris se marca el posible contacto entre especies.

Table 3. List and location of the haplotypes for the gene fragment terminase studied from samples of the two cryptic serotine bats (*E. serotinus* and *E. isabellinus*) distributed throughout the Iberian Peninsula. In gray is marked the possible contact between species.

Especie	Provincia de Captura	Haplotipos (Nº secuencias)		
		terBHV1	terBHV2	terBHV3
<i>E. isabellinus</i> alopatría	Cádiz	1		
	Huelva	5		
				1
	Murcia	1		
	Sevilla	3		
	Ciudad Real	9		
Toledo	2			
<i>E. isabellinus</i> simpatría	Cáceres	13		
<i>E. serotinus</i> simpatría	Cáceres	2		
			6	
				1
<i>E. serotinus</i> alopatría	A Coruña		1	
	Barcelona		1	
	Guipuzkoa		2	
	Vizcaia		4	

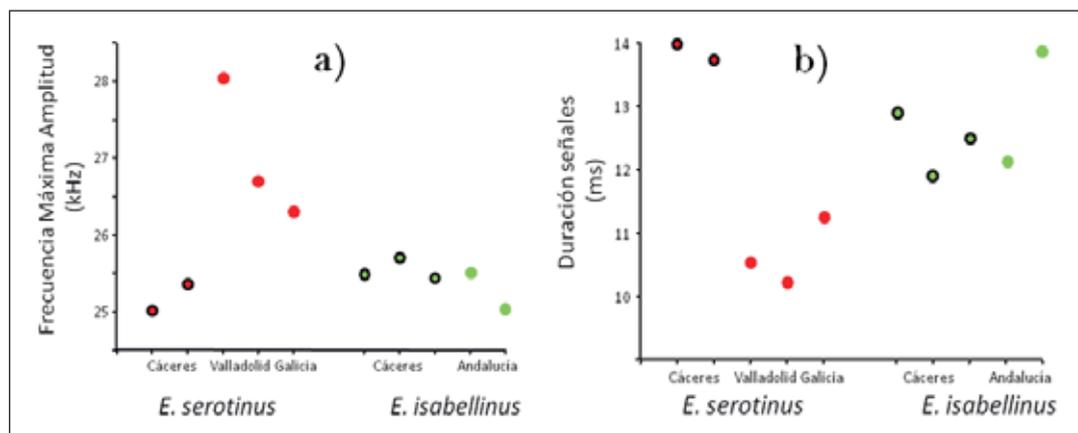


Figura 5. Representación de dos variables (a) Frecuencia de máxima amplitud en kHz y (b) la duración del pulso en ms medidas en los ultrasonidos de ecolocación de las poblaciones de *E. isabellinus* en alopatría (verde) y simpatria (verde con borde negro) y las poblaciones de *E. serotinus* en alopatría (rojo) y simpatria (rojo con borde negro).

Figure 5. Representation of two variables (a) maximum amplitude frequency in kHz and (b) the pulse duration in ms measured in the echolocation calls of populations of *E. isabellinus* in allopatry (green) and in sympatry (green with black edge) and populations of *E. serotinus* in allopatry.

que ambas zonas conservan hábitats similares mediterráneo-continentales dominados por encinares adehesados que representan con distinto nivel de afectación humana el bosque esclerófilo perennifolio mediterráneo que ocupó ambas regiones de forma natural. Solamente dos especies citadas previamente (*Rhinolophus mehelyi* y *R. euryale*) no han sido localizadas durante el muestreo. Ello se debe a que ambas especies son cavernícolas y a que estas especies no se han muestreado en los refugios por los objetivos propios de este estudio. Destacan con diferencia por su abundancia las especies del género *Pipistrellus* (*P. kuhlii* y *P. pygmaeus*), y los propios murciélagos hortelanos cuya presencia se ha detectado prácticamente en la totalidad de los puntos muestreados. De hecho, el estudio confirmó –como habíamos predicho– la presencia de ambas especies crípticas de murciélagos hortelanos: *Eptesicus serotinus* y *E. isabellinus* en simpatria y en los dos parques nacionales. Sin embargo, sólo han aparecido colonias de cría de *E. serotinus* en el valle del Tiétar en la zona de influencia socio-económica del PN de Monfragüe mientras que en el PN de Cabañeros solo se capturaron machos sueltos, posiblemente individuos dispersantes. El resto de las especies resultaron ser relativamente escasas y localizadas. Son llamativas algunas ausencias

en ambas zonas estudiadas, y ello a pesar de la intensidad de los muestreos realizados. Por un lado, la especie forestal *Myotis bechsteinii*, cuya cría ha sido confirmada en el PN de Monfragüe, está aparentemente ausente en el PN de Cabañeros junto a otras especies forestales como *M. emarginatus* o *M. escalerae* y ello a pesar de disponer de microhábitats apropiados como umbrías con abundantes ejemplares caducifolios maduros. Es también llamativa la ausencia del cazador aéreo *Nyctalus leisleri* en el PN Monfragüe siendo una especie normalmente fácil de detectar cuando está presente. De hecho, se grabaron sonidos en dos localidades que podrían corresponder a esta especie. Las especies con mayor interés desde el punto de vista de conservación (fundamentalmente cavernícolas) no tienen poblaciones relevantes en los parques estudiados sin duda porque la geología de ambas zonas (con rocas fundamentalmente plutónicas y metamórficas) no permite la existencia de refugios apropiados. Aunque en este sentido, hay que mencionar que un refugio posiblemente importante tanto para invernada como para cría situado en las presas de los Saltos de Torrejón, dentro del PN de Monfragüe, no pudo ser evaluado. Sin embargo, se deberían tomar acciones para favorecer la presencia de especies forestales raras como el murciélago rato-

nero forestal (*Myotis bechsteinii*) o el murciélago ratonero de Escalera (*M. escalerae*). Por ejemplo, la realización de pequeñas balsas de agua remansada en torrenteras y cursos altos (similares a las realizadas en los bosques públicos de Valsain gestionados por el OAPN), y que además de servir para el control de incendios, favorecerían una mayor presencia de murciélagos forestales.

Todas las capturas fueron asignadas sin ambigüedades mediante el marcador mitocondrial a uno u otro linaje de murciélago hortelano. Este marcador se obtenía a partir de la una muesca inocua de piel del ala (biopsia) tomada en el momento de captura del ejemplar. Como era de esperar se localizaron colonias tanto de *E. serotinus* como de *E. isabellinus* en el PN de Monfragüe, de hecho, en algunos puntos de muestreo se capturaron ejemplares de ambas especies en la misma noche, aunque la segunda especie resultó ser mucho más abundante. La distribución de las capturas sugiere que existe cierta segregación ecológica y mientras *E. serotinus* parece concentrarse en las laderas más húmedas del Macizo de Gredos y valle del Tiétar, *E. isabellinus* está fundamentalmente presente en los roquedos y dehesas más termófilas del valle del Tajo y afluentes (p.e. Arroyo de la Vid). En el PN de Cabañeros, menos húmedo en general, no se consiguió localizar ninguna colonia de *E. serotinus* y solo se capturaron individuos sueltos machos a lo largo del río Estena en la parte norte del parque. Esta distribución parece confirmar el carácter más mediterráneo de *E. isabellinus* como queda presente en la distribución potencial de ambas especies (SANTOS *et al.* 2014)

En relación a los caracteres morfométricos, hemos comprobado que *Eptesicus serotinus* es ligera pero significativamente mayor que *E. isabellinus* en todas las medidas. Sin embargo, existe un solapamiento importante en todas las variables, lo que no permite la utilización de ninguna de ellas como carácter diagnóstico para la distinción específica de forma inequívoca. Las diferencias biométricas no son mayores en la zona de simpatria en relación a las respectivas zonas de alopatría, sugiriendo que no existe una presión selectiva por competencia y que haya podido implicar desplazamiento de caracteres entre estas poblaciones que comparten

ambientes. Este patrón sería de esperar como mecanismo para evitar competencia interespecífica y se ha sugerido que incluso juega un papel fundamental en el mantenimiento de la biodiversidad (PFENNING & PFENNING 2012). Aunque la importancia evolutiva de dicho mecanismo está cuestionada (STUART & LOSOS 2013), no deja de ser interesante que la medida que más claramente distingue las dos especies sea la serie dental -mayor en *E. serotinus*- y que podría estar relacionada con una diferenciación trófica entre las especies.

El estudio fino de los pelos, no ha encontrado diferencias importantes en el patrón cuticular entre ambas especies. Este resultado es compatible con el estudio de pelos de otros complejos crípticos de murciélagos. De hecho, PIERALLINI *et al.* (2004) no encuentran tampoco diferencias entre los pares de especies próximas de nótulos (*Nyctalus lasiopterus* y *N. noctula*) o de murciélagos enanos (*Pipistrellus pipistrellus* y *P. pygmaeus*). Sin embargo, sí distinguen en la morfología de los pelos estas especies del emparentado murciélago de borde claro (*P. kuhlii*) o las tres especies de murciélagos de herradura (género *Rhinolophus*) presentes en Suiza.

La coloración del pelaje dorsal tampoco proporciona caracteres diagnósticos fiables para la distinción entre las dos especies. De hecho, los resultados indican que las poblaciones de *E. serotinus* y *E. isabellinus* manifiestan patrones similares de coloración cuando están en simpatria. Es interesante resaltar que el color del pelaje es el carácter tradicionalmente usado para distinguir los dos *Eptesicus* y de hecho el nombre '*isabellinus*' hace referencia a su coloración dorada frente a la de *E. serotinus* que es típicamente más oscura. Sin embargo, en la zona de contacto ambas especies son igualmente oscuras.

En relación a la ecolocación es curioso que el patrón encontrado, con valores de frecuencia de máxima amplitud ligeramente superiores para *E. serotinus* (la especie mayor) parece contrario al esperado en función al tamaño que predice que son los murciélagos mayores los que emiten a frecuencias menores (JONES 1999). En general, los murciélagos presentan una gran plasticidad en

los pulsos de ecolocación (SCHNITZLER & KALKO 2001) que varía incluso para una misma especie en función en general de las características ambientales y del tipo de información requerida (HOLDERIED *et al.* 2006). Esta variabilidad hace difícil y problemática su utilización con fines de identificación y menos de segregación entre especies próximas. En este caso concreto, las escasas diferencias existentes entre ambas especies con valores medios muy similares y gran solapamiento entre ellas indican que la ecolocación no es útil para distinguir *E. serotinus* y *E. isabellinus*.

El paralelismo encontrado tanto en el patrón de coloración como en la misma ecolocación (con valores próximos entre las dos especies en la zona de simpatria) parece sugerir que son factores de tipo ambiental los que determinan la variación y a los que reaccionan de forma similar ambas especies con su plasticidad fenotípica. Esto es, asumiendo que no existe intercambio génico entre las poblaciones simpátricas de estos linajes. Esta hipótesis queda rechazada según los estudios genéticos actualmente en curso (JUSTE *et al.* in prep.) que indican que no existe hibridación -por lo menos masiva- entre ambas especies crípticas. Lo que parece claro es que hasta el momento no podemos ofrecer una herramienta segura que facilite la identificación morfológica rápida y segura de estas dos especies a parte de la molecular.

Los análisis han confirmado la ausencia de virus de la rabia (EBLV1) en las casi 300 muestras analizadas. Estos resultados son compatibles con los previamente publicados, que muestran prevalencias muy bajas de EBLV1 en colonias de *E. isabellinus* y/o *E. serotinus* y con grandes variaciones entre colonias (VÁZQUEZ-MORÓN *et al.* 2008) que responden al patrón de circulación del virus EBLV1 encontrado en colonias de *E. isabellinus* y consistente con la dinámica de flujo génico descrita para estos murciélagos (JUSTE *et al.*, 2009). Este estudio confirma que las colonias de maternidad de estos murciélagos se comportan como comunida-

des cerradas y formadas por las mismas hembras que retornan cada año al lugar donde nacieron para reproducirse y en las que el virus EBLV1 circula de forma independiente en cada colonia.

Contrariamente a los lyssavirus, la prevalencia de herpesvirus ha sido relativamente alta, y en consonancia con los resultados recientes que han comprobado la presencia de estos virus en la casi totalidad de las especies Ibéricas de murciélagos (POZO *et al.* en rev). Esto es esperable, ya que mientras los lyssavirus producen infección aguda autolimitada, los herpesvirus producen infección latente con episodios de reactivación que se suceden a lo largo de la vida con frecuencia variable. Es interesante resaltar que las diferencias de haplotipos en estos virus apoyan el posible salto ('spill-over') de una especie a otra y ello a pesar de que el mencionado trabajo describe un patrón general de paralelismo evolutivo relacionado a una alta fidelidad hospedador-huesped.

AGRADECIMIENTOS

Al Organismo Autónomo de Parques Nacionales por financiar el trabajo y esta publicación. A los directores y personal de los Parques Nacionales de Monfragüe y Cabañeros por su interés y colaboración, en especial a D. Angel Rodríguez, al biólogo Amalio Toboso, y responsables Casto Iglesias y Ana Isabel Gómez y de forma particular al agente de medio ambiente, Pedro Holgado. Así como a las Consejerías de Medio Ambiente de la Comunidades de Castilla-La Mancha y Extremadura por su colaboración y permisos. Al personal del LEM de la Estación Biológica de Doñana (CSIC) y en particular a Juan Luis García Mudarra por su ayuda en la identificación molecular de las muestras y a Nidia Aréchiga Ceballos del IS-CIII por su apoyo en el estudio vírico. A los estudiantes voluntarios por su colaboración y en particular a Elisa Pizarro de "Las Corchuelas", Esther Murciano, María José Cuesta y María José Moreno, por su interés y desinteresada ayuda.

BIBLIOGRAFIA

- CALISHER, C.H., CHILDS, J.E., FIELD, H.E., HOLMES, K.V. & SCHOUNTZ, T. 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 531–545.
- DOBSON, A.P. 2005. What links bats to emerging infectious diseases? *Science* 310:628-629.
- GARCÍA-MUDARRA, J.L., IBÁÑEZ, C. & JUSTE, J. 2009. The Straits of Gibraltar: barrier or bridge to Ibero- Moroccan bat diversity? *Biological Journal of the Linnean Society* 96: 434-450.
- HOLDERIED, M. W., JONES, G. & VON HELVERSEN, O. 2006 . Flight and echolocation behaviour of whiskered bats commuting along a hedgerow: range-dependent sonar signal design, Doppler tolerance and evidence for ‘acoustic focussing’. *Journal of Experimental Biology* 209: 1816-1826.
- HORTA, P., RAPOSEIRA, H., SANTOS, H., ALVES, P, PALMEIRIM, J., GODINHO, R., JONES, G. & REBELO H. 2015 Bats’ echolocation call characteristics of cryptic Iberian *Eptesicus* species. *European Journal of Wildlife Research*. 61:813–818
- IBÁÑEZ C. 2007. *Eptesicus serotinus* (Schreber, 1774) / *Eptesicus isabellinus* (Temminck, 1839). En: Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España (Palomo, L.J., Gisbert, J. & Blanco, J.C., eds). pp. 237-240. Dirección General para la Biodiversidad-SECEM- SECEMU, Madrid.
- IBÁÑEZ, C., GARCÍA-MUDARRA, J.L., RUEDI, M., STADELMAN, B. & JUSTE J 2006. The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. *Acta Chiropterologica* 8: 277-297.
- JONES, G. 1999. Scaling of echolocation call parameters. *The Journal of Experimental Biology* 202: 3359–3367
- JUSTE, J., BILGIN, R., MUÑOZ, J. & IBÁÑEZ, C. 2009. mtDNA signatures at different spatial scales: from the effects of the Strait of Gibraltar to population structure in the meridional serotine bat (*Eptesicus isabellinus*). *Heredity* 103:178-187.
- JUSTE, J., BENDA, P., GARCÍA-MUDARRA, J.L. & IBÁÑEZ, C. 2013 Systematic and phylogenetic study of the Western Palaearctic serotine bats (genus *Eptesicus*, Vespertilionidae, Chiroptera). *Zoologica Scripta* 42: 441-457.
- JUSTE, J., CENTENO, A., REDONDO, A., de PAZ O., PÉREZ-SUÁREZ, G., MARTINEZ-ALÓS, S., ECHEVARRIA, J.E. & IBÁÑEZ, C. (in prep). Genetic structure of two sibling serotine bat species in Iberia: Present and past stories.
- LEROY, E.M., KUMULUNGUI, B., POURRUT, X., ROUQUET, P., HASSANIN, A., YABA, P., DÉLICAT, A., PAWESKA, J.T., GONZALEZ, J.P. & SWANEPOEL, R. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438: 575-576.
- PFENNIG, D.W. & PFENNIG, K.S. 2012 *Evolution’s Wedge: Competition and the Origins of Diversity*, University of California Press.
- PFENNINGER, M. & SCHWENK, K. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7:121
- POZO, P., JUSTE, J., VÁZQUEZ-MORÓN, S., AZNAR-LÓPEZ, C., IBÁÑEZ, C., GARIN, I., AIHARTZA, J., CASAS, I., TENORIO, A. & ECHEVARRÍA, J.E. (2d rev) Novel Betaherpesviruses Described from Iberian Bats Reveal Parallel Evolution. *Journal of Virology*.
- SANTOS, H., JUSTE, J., IBÁÑEZ, I., PALMEIRIM, J., GODINHO, R., AMORIM, F., ALVES, P., COSTA, H., DE PAZ, O., PÉREZ-SUAREZ, G., MARTÍNEZ-ALOS, S., JONES, G. & REBELO, H. 2014. Influences of ecology and biogeography on shaping the distributions of cryptic species: three bat tales in Iberia, *Biological Journal of the Linnean Society* 112: 150-162.
- SCHNITZLER, H.U.M. & KALKO, E. 2001. Echolocation by Insect-Eating Bats. *BioSciences* 51: 557-569.
- SECEMU, 2010. Nombres de los murciélagos en España. *Barbastella* 4:15.
- SIMMONS, N. B. 2005 . Order Chiroptera. En: D. E. Wilson & M. Reeder (eds) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. pp. 312–529. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

- STUART, Y.E. & LOSOS, J.B. 2013 . Ecological character displacement: glass half full or half empty? *Trends in Ecology & Evolution* 28, 402-408
- VÁZQUEZ-MORÓN, S., JUSTE, J., IBÁÑEZ, C., RUIZ-VILLAMOR, E., AVELLÓN, A., VERA M., & ECHEVARRÍA, J. E. 2008. Endemic circulation of European Bat Lyssavirus Type 1 on serotine bats in Spain. *Emerging Infectious Diseases* 14:1263-1266
- WANG, L.F., SHI, Z., ZHANG, S., FIELD, H., DASZAK, P. & EATON, B.T. 2006. Review of bats and SARS. *Emerging Infectious Diseases* 12:1834–1840.