

Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Integradas



**Distribución, ecología, genética y conservación de la
musaraña de campo, *Crocidura suaveolens*, en el Golfo
de Cádiz**

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Luis Eduardo Biedma Aguilera

Fecha de lectura: 2 de julio de 2019

Bajo la dirección de los doctores:

José Antonio Godoy López

Javier Calzada Samperio

Jacinto Román Sánchez

Huelva, 2019



Distribución, ecología, genética y conservación de la musaraña de campo, *Crocidura suaveolens*, en el golfo de Cádiz



**Universidad
de Huelva**

LUIS EDUARDO BIEDMA AGUILERA
Universidad de Huelva
Tesis doctoral
2019



**Universidad
de Huelva**

**Distribución, ecología, genética y
conservación de la musaraña de campo,
Crocidura suaveolens, en el golfo de Cádiz**

Memoria presentada por:

LUIS EDUARDO BIEDMA AGUILERA

para optar al título de DOCTOR

Memoria realizada dentro del marco del Programa de
Doctorado en Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental
del Departamento de Ciencias Integradas de la Universidad
de Huelva

Bajo la dirección de:

Dr. José Antonio
Godoy López

Dr. Javier
Calzada Samperio

Dr. Jacinto
Román Sancho



AUTORIZACIÓN PARA LA DEFENSA DE LA TESIS DOCTORAL EMITIDA POR EL DIRECTOR Y EL TUTOR Y POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO

DATOS DEL DOCTORANDO:

Apellidos y nombre: BIEDMA AGUILERA, LUIS EDUARDO	NIF/NIE/Pasaporte: 75561510R	Nacionalidad: ESPAÑOLA
Dirección a efectos de notificaciones: AVDA DEL VIGIA 20, MAZAGÓN (HUELVA), 21130		
Teléfono: 959377138 / 617490041	EMAIL: setebiedma@hotmail.com	

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL:

Título: DISTRIBUCIÓN, ECOLOGÍA, GENÉTICA Y CONSERVACIÓN DE LA MUSARAÑA DE CAMPO, <i>CROCIDURA SUAVEOLENS</i> , EN EL GOLFO DE CÁDIZ
Programa Oficial de Doctorado al que se adscribe y órgano responsable: CIENCIA Y TECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL
Línea de investigación a la que se adscribe y órgano responsable: BIOLOGÍA AMBIENTAL
Rama de Conocimiento (marcar casilla): <input type="checkbox"/> Arte y Humanidades <input type="checkbox"/> Ciencias <input type="checkbox"/> Ciencias de la Salud <input type="checkbox"/> Ciencias Sociales y Jurídicas <input type="checkbox"/> Ingeniería y Arquitectura

A CUMPLIMENTAR POR EL DIRECTOR Y POR EL TUTOR DE LA TESIS DOCTORAL:

Director/es:	Tutor/es:
Dr. JOSE ANTONIO GODOY LÓPEZ Dr. JAVIER CALZADA SAMPERIO Dr. JACINTO ROMÁN SANCHO	Dr. JAVIER CALZADA SAMPERIO
como Director/Tutor de la Tesis Doctoral antes indicada AUTORIZA LA DEFENSA DE LA MISMA.	

En Huelva a, 14 de MAYO de 2019

Firma del/los Director/es de la Tesis Doctoral

Fdo.: JOSE ANTONIO GODOY LÓPEZ

Fdo.: JAVIER CALZADA SAMPERIO

Fdo.: JACINTO ROMÁN SANCHO

Firma del/los Tutor/es de la Tesis Doctoral

Fdo.: JAVIER CALZADA SAMPERIO

A CUMPLIMENTAR POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO:

Cumplidos los criterios de calidad aprobados para este Programa de Doctorado por el Comité de Dirección de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Huelva y una vez valorada la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando y haber incorporado éste las modificaciones y/o cambios que esta Comisión Académica le pudiera haber indicado, **se AUTORIZA** en reunión de fecha _____ **LA DEFENSA** de la misma.

En Huelva a, _____ de _____ de _____
Firma y sello del Presidente de la Comisión Académica

Fdo. _____



A mis padres, Pilar y Luis, para que se sientan orgullosos de mi esfuerzo, porque “*estar pensando en las musarañas*” (estar embelesado y con la boca abierta; distraído o absorto) nunca fue tan trabajoso y a la vez tan gratificante.

FINANCIACIÓN

Para la realización de los trabajos aquí presentados se contó con una ayuda de la Sociedad Española para la Conservación y el Estudio de los Mamíferos (SECEM) que permitió financiar parte de los objetivos propuestos.

Además, la financiación de los objetivos genéticos 1 y 3 se realizó gracias al proyecto “Historia evolutiva de la musaraña de campo, *Crocidura suaveolens*, en la península ibérica y el estado genético de las poblaciones en el golfo de Cádiz”, de la propuesta interna de la Estación Biológica de Doñana llamada “Microproyectos”, financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad, a través del Programa Severo Ochoa para Centros de Excelencia en I + D + I (SEV-2012-0262).

El doctorando Luis E. Biedma Aguilera disfrutó de una beca de posgrado del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU), concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por resolución del 28 de febrero de 2013 (BOE de 18 de marzo de 2013).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias a las dos instituciones donde he realizado esta tesis doctoral, la Universidad de Huelva y la Estación Biológica de Doñana, por el apoyo logístico, y por facilitarme el acceso y uso de sus instalaciones.

En la Universidad de Huelva han sido muchas las personas que en determinados momentos han atendido mis necesidades y me han ayudado a resolver dudas. Así, me gustaría agradecer el buen trato y la eficaz gestión recibida por Sandra y Carlos de la Escuela de Doctorado. También quiero agradecer a Lorenzo Lidueña, de la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI), los numerosos trámites y dudas administrativas resueltas satisfactoriamente. Muchas gracias también a Concepción Valencia, presidenta de la comisión académica del programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental (CYTIA), y a Pilar Márquez, secretaria de dicho programa, por atenderme e informarme amablemente cuando lo he necesitado. También querría dar las gracias a todos los profesores compañeros de departamento que en algún momento me han facilitado mis labores docentes e investigadoras, o que simplemente me han dado ánimos y deseado suerte: Josefa Borrego, Francisco Córdoba, Pablo Hidalgo, Juan Carlos Pérez-Quintero, Francisco Navarro, José Prenda, Eloy Castellanos y, en especial, a Javier Jiménez Nieva y Adolfo Muñoz, por enseñarme tanto como saben de las marismas. Agradecer también a mi compañero de laboratorio Adrian Ramos su paciencia cuando mis sucias y olorosas trampas llegaban al laboratorio. No querría olvidarme de Alberto Vélez, a quien agradezco sus consejos y su amistad.

En la Estación Biológica de Doñana también son muchas las personas que merecen mi agradecimiento. Me gustaría dar las gracias a los técnicos del Laboratorio de Ecología Molecular (LEM): Mónica Gutiérrez, María González, José María Gasent y

Antonio C. López, por atender todas mis necesidades durante el desarrollo de mis trabajos en este laboratorio. Destacar también la ayuda de Ana Piriz, la “jefa” del LEM, que siempre estuvo dispuesta a resolver mis dudas y a facilitarme el trabajo. También dar las gracias a Sofía Conradi, por su magnífico trabajo administrativo y por atenderme siempre tan amablemente. A Carlines, Paquito Blanco, Eloy Revilla, Miguelito Clavero, Paco Palomares, Miguel Delibes, Néstor Fernández, Alejandro Rodríguez. A todos vosotros, muchas gracias por vuestra ayuda, interés y amistad. A mis compis de despacho y laboratorio de la EBD, María Lucena, Dani Kleinman, Alex Centeno, Maritxu Méndez, Begoña Adrados y Begoña Martínez, muchas gracias por hacerme sentir como en casa desde el primer día, y por tanta ayuda y consejos recibidos. Muchas gracias en especial a Laura Soriano, a la que considero mi mentora en el mundillo de la genética molecular, y a Elena Marmesat, posiblemente la doctoranda más capacitada y trabajadora que he conocido. Muchas gracias a ambas por la ayuda recibida y por no dudar ni un segundo en atender y solucionar mis dudas.

Agradecer también el esfuerzo y colaboración a todas aquellas personas que alguna vez me ayudaron en las intensas jornadas de campo: alumnos del Grado en Ciencias Ambientales y del Máster en Conservación de la Biodiversidad de la UHU, Paco Villaespesa y Toñे Rivas del centro de cría del lince, Julia, Rocío, Josema... en fin, fueron muchas como para enumerarlas a todas, pero nunca olvidaré la ayuda que me brindaron y el interés mostrado por mi trabajo. Quisiera agradecer en especial la ayuda de campo a Juan José Quirós (Perico), porque siempre estuvo ahí para echarme una mano cuando lo necesité. También muchas gracias a Pedro Borrego, por su ayuda de campo y por su enorme colaboración con el análisis e identificación de artrópodos.

A los agentes de medio ambiente y directores de los numerosos espacios naturales muestreados también les agradezco muchísimo su colaboración y ayuda. En especial, muchas gracias a Enrique Martínez Montes, Director conservador del Paraje Natural

Marismas del Odiel, y a los agentes de medio ambiente de este espacio natural: Enrique Sánchez Gullón, Enrique Urbina, Miguel A. Toscano, J.M. Sayago...a todos vosotros muchas gracias.

A mis directores José Antonio Godoy López, Javier Calzada Samperio y Jacinto Román Sancho, agradecerles enormemente su ayuda e implicación en los trabajos, por sacar tiempo de donde fuera para venir al campo a trabajar codo con codo, por la ilusión y la motivación para hacer frente a todos los retos y dificultades, por hacer que me sintiera capaz de alcanzar todos y cada uno de los objetivos, por transmitirme vuestra pasión por la naturaleza y la biología de la conservación, por vuestra sabiduría y por enseñarme tanto, por vuestra paciencia y vuestro compromiso, por todo esto y por mucho más, de verdad, muchas gracias.

A mi familia muchas gracias por el apoyo y los ánimos recibidos. A mi hermana Pilar y a mi cuñado Abel por su interés en cómo me iban las cosas, y a mi sobrino Abel por contagiarde su alegría y vitalidad cuando tenía un mal día. A mis padres darle las gracias por estar siempre ahí, por darme tanto a cambio de nada, por hacer que mis estudios fueran siempre lo primero y por anteponer mis necesidades a las suyas. Gracias papis también por dejar que el cuartillo del garaje haya sido mi criadero de gusanos todos estos años, sé que más que un cuartillo parecía una panadería con tanta harina. Mil gracias también a mi abuela Pilar, por tratarme como a un auténtico rey, por elegirme y guisarme siempre el mejor pescado (nunca fui tan querido por unos pescaderos), por desear mi llegada y, sobre todo, por transmitirme su fuerza y su coraje para superar las dificultades de la vida. Muchas gracias abuela por tu cariño. Muchas gracias también a mi familia palerma. A mis suegros Margarita y Ramón, por su apoyo y su cariño, por su enorme paciencia cuando venía del campo embarrado, con olor a musaraña y necesitaba usar su ducha, o su frigorífico para conservar mis muestras, o congelar algún que otro cadáver junto a sus croquetas y verduras, o dejar

mis botes llenos de gusanos en su cocina...en fin... MUCHÍSIMA PACIENCIA...Muchas gracias por aguantar todo eso sin una sola queja y por todo lo que hacéis por mí. A mi cuñailla Raquel, por aguantar también lo anterior sin rechistar (o al menos no mucho), por tu paciencia, muchas gracias. Muchas gracias también a mi abuelo palermo, Antonio "el cuturo", por su interés en las musarañas, por sus historietas sobre las marismas, las playas, los muelles...por dejarme ver en sus palabras como era Huelva antes de que yo naciera, por preguntar por mí cuando yo no estaba (*¿dónde está el Luis? ¿qué está con los ratones?*), por todo esto, tu cariño y mucho más, muchas gracias. Reservo para el final a mi persona favorita, mi pareja Sara. Muchas gracias por ser mi apoyo constante, por creer en mí y mis posibilidades, incluso más que yo mismo, por aguantar mis días de mal humor, por entender lo importante que está tesis era para mí, por ayudarme siempre con lo que necesitara, aunque fuera tan poco apetecible como analizar egagrópilas o limpiar trampas apestosas, por sacarme una sonrisa cada día y, en especial, en momentos difíciles. Muchas gracias por tu dosis justa de "locura" y, sobre todo, por quererme tanto.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 OBJETIVOS.....	25
1.2 ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	26
1.3 REFERENCIAS.....	27
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.1 RESUMEN DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS PARA LOGRAR CADA OBJETIVO.....	45
2.2 PRINCIPALES TÉCNICAS DE MUESTREO.....	49
2.1.1 ANÁLISIS DE EGAGRÓPILAS DE LECHUZA COMÚN.....	49
2.2.2 TRAMPEO EN VIVO DE MUSARAÑAS.....	56
2.2.3 MUESTREO DE ARTRÓPODOS.....	63
2.3 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS GENÉTICAS.....	64
2.4 REFERENCIAS.....	76
CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....	79
3.1 ARTÍCULO 1. PHYLOGEOGRAPHY OF <i>CROCIDURA SUAVEOLENS</i> (MAMMALIA: SORICIDAE) IN IBERIA HAS BEEN SHAPED BY COMPETITIVE EXCLUSION BY <i>C. RUSSULA</i>.....	81
3.2 ARTÍCULO 2. USING OWL PELLETS TO INFER HABITAT ASSOCIATIONS AND CLARIFY THE REGIONAL DISTRIBUTION OF A CRYPTIC SHREW.....	123
3.3 ARTÍCULO 3. RARE AND REAR: POPULATION GENETICS OF MARSH-SPECIALIST <i>CROCIDURA SUAVEOLENS</i> POPULATIONS IN THE GULF OF CÁDIZ.....	135

3.4 ARTÍCULO 4. HABITAT SPECIALIZATION AS AN EVOLUTIONARY RESPONSE TO INTERSPECIFIC COMPETITION BETWEEN TWO SYMPATRIC SHREWS.....	155
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....	199
4.1 REFERENCIAS.....	211
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES.....	215

RESUMEN

La musaraña de campo, *Crocidura suaveolens*, tiene una distribución continua por gran parte de Eurasia y es una especie común y abundante. Sin embargo, en el oeste de Europa su distribución está fragmentada y es una especie rara y poco conocida en general. En la península ibérica, poco o nada se conoce sobre su historia, sobre su diversidad genética o sobre su ecología. Esta carencia de conocimiento impide una adecuada evaluación de la prioridad y el estado de su conservación. Las poblaciones del golfo de Cádiz, en particular, al estar situadas en el extremo suroeste de la distribución global de la especie y dado el pasado rol del sur ibérico como refugio glacial, podrían albergar una diversidad genética única que puede resultar clave para la persistencia de la especie ante el actual escenario de cambio global.

La presente tesis doctoral tiene como finalidad inferir la historia evolutiva y demográfica de la musaraña de campo en la península ibérica y evaluar su distribución, estado génico y ecología en el golfo de Cádiz, con el objetivo final de contribuir a la evaluación del estado de conservación y, en su caso, al diseño de un plan de gestión de la especie en esta región. Para este propósito, se usaron egagrópilas de lechuza común, *Tyto alba*, y trampas Trip Trap de captura en vivo como principales métodos de muestreo de la especie, así como diferentes técnicas de genética molecular para la caracterización genética de las muestras obtenidas.

Todas las poblaciones de musaraña de campo de la península ibérica pertenecen al clado IV del grupo *C. suaveolens*. Dentro de este clado, se han identificado tres linajes evolutivos mitocondriales, dos de ellos exclusivamente ibéricos. Las poblaciones del golfo de Cádiz presentan dos sublinajes exclusivos de uno de estos linajes ibéricos. La historia evolutiva de la musaraña de campo en la península ibérica puede ser explicada por la existencia de múltiples refugios glaciares para la especie en la

península ibérica y la competencia con la musaraña gris, *Crocidura russula*, tras su llegada desde África hace aproximadamente 126.000 años.

En el golfo de Cádiz la musaraña de campo está solo presente en seis marismas mareales distribuidas en cuatro áreas marismeñas aisladas entre sí: las marismas de los ríos Guadiana (orilla española), Piedras, Odiel, Tinto, Estero Domingo Rubio y Guadalquivir. La especie presenta una fuerte estructura genética como resultado de un alto nivel de aislamiento poblacional, con seis grupos genéticos diferenciados correspondientes a cada una de las seis marismas ocupadas por la especie. Guadalquivir y Estero Domingo Rubio son las poblaciones más diferenciadas genéticamente, mientras que las poblaciones del Guadiana, Piedras, Odiel y Tinto son genéticamente más parecidas entre sí. El flujo génico entre poblaciones está limitado porque la especie no dispersa a través de hábitats no marismeños. Los cauces fluviales más anchos también limitan el flujo génico, pero no parecen constituir barreras absolutas para la dispersión. Se han observado niveles moderados de diversidad local y altos niveles de diversidad genética regional, lo que convierte al golfo de Cádiz en una región con un gran potencial evolutivo para afrontar futuras amenazas. La musaraña de campo es especialista de hábitat de marisma mareal en el golfo de Cádiz, siendo el único caso conocido de especialización en la especie. Su especialización de hábitat parece ser un efecto evolutivo de la competencia pasada con la musaraña gris, que ha favorecido la coexistencia de las dos especies en la región mediante la segregación espacial y temporal de sus nichos ecológicos. La musaraña de campo excluye competitivamente a la musaraña gris de las marismas mareales, invirtiendo el patrón de dominancia habitual en simpatría. La historia evolutiva de las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz, su distribución, su composición genética y su ecología pueden ser explicadas por la acción combinada de la competencia con la musaraña gris, la especialización de la

musaraña de campo en marisma mareal y la evolución geomorfológica de las marismas mareas de esta región.

ABSTRACT

The lesser white-toothed shrew, *Crocidura suaveolens*, is continuously distributed, common and abundant throughout most Eurasia. However, in Western Europe its distribution is fragmented and it is a rare and poorly known species. In the Iberian Peninsula, the lack of knowledge about its history, its genetic diversity or its ecology hampers a proper assessment of its conservation priority and status. The populations of the Gulf of Cádiz, in particular, being located in the southwestern limit of the global distribution of the species and given the prominent role of the Iberian Peninsula as glacial refugia, could harbour a unique genetic diversity which may be key for the species persistence in the current scenario of global change.

This doctoral thesis aims to describe the evolutionary and demographic history of *C. suaveolens* in the Iberian Peninsula and to assess its distribution, genetic status and ecology in the Gulf of Cádiz, with the final intention of contributing to the assessment of its conservation status and, where appropriate, to the design of a management plan for the species in this region. For this purpose, I used barn owl, *Tyto alba*, pellets and Trip Trap live traps to sample individuals, and applied different molecular genetic techniques for the genetic characterization of these samples.

All the *C. suaveolens* populations in the Iberian Peninsula cluster within the previously described clade IV of the *C. suaveolens* group. Within this clade, three evolutionary mitochondrial lineages have been identified, two of which are exclusively Iberian. Two sublineages within one of these Iberian lineages are exclusive of the populations in the gulf of Cádiz. The evolutionary history of *C. suaveolens* in the Iberian Peninsula can be explained by the existence of multiple refugia within the Iberian Peninsula and the

competition with the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, that started with its arrival from Africa ca. 126 Kya.

In the Gulf of Cádiz *C. suaveolens* is present only in six tidal marshes located in four isolated marsh areas: the marshes of the rivers Guadiana (Spanish shore), Piedras, Odiel, Tinto, Estero Domingo Rubio and Guadalquivir. The species has a marked genetic structure as a result of a high level of population isolation, with six differentiated genetic groups corresponding to the six marshes occupied by the species. Guadalquivir and Estero Domingo Rubio are the most genetically differentiated populations, while the populations of Guadiana, Piedras, Odiel and Tinto are genetically more similar to each other. Gene flow between populations is restricted because the species does not disperse through non-marsh habitats. Wider river channels also limit gene flow, but they do not appear to be absolute barriers to dispersal. Moderate levels of local and high levels of regional genetic diversity have been observed, making the Gulf of Cádiz a region with a great evolutionary potential to face future threats. *C. suaveolens* is a tidal marsh habitat specialist in the Gulf of Cádiz, being the only known case of habitat specialization described for the species. Its habitat specialization in the region seems to be an evolutionary effect of past competition with *C. russula*, which is allowing the coexistence of the two species through the spatial and temporal segregation of their ecological niches. *C. suaveolens* is currently outcompeting *C. russula* in tidal marshes, reversing the dominance pattern observed elsewhere. The evolutionary history of the *C. suaveolens* populations of the Gulf of Cádiz, its distribution, genetic composition and ecology, can be explained by the competition with *C. russula*, the specialization of *C. suaveolens* in tidal marsh and the geomorphological evolution of tidal marshes of this region.

Capítulo 1. Introducción

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Estamos inmersos en una gran crisis global de pérdida de biodiversidad. La tasa de extinción de especies es tan elevada que muchos científicos hablan ya de una sexta gran extinción (Barnosky et al., 2011; Ceballos et al., 2017), equiparando la situación actual a las cinco extinciones masivas que nuestro planeta ha sufrido en el pasado. Además, el número de especies amenazadas sigue aumentando rápidamente y las previsiones de extinción futura debidas al cambio climático antropogénico son alarmantes (Wake & Vredenburg, 2008; Maclean & Wilson, 2011). Ante esta situación, es urgente llevar a cabo una mejora del conocimiento de las especies, que permita evaluar sus estados de conservación y adoptar medidas que garanticen su supervivencia. Por lo tanto, obtener un conocimiento preciso de las especies constituye una importante estrategia de lucha contra la pérdida de biodiversidad, pero a su vez supone uno de los mayores retos a los que la biología de la conservación se enfrenta hoy en día.

Debido a que los recursos disponibles en conservación son limitados, los esfuerzos para reducir la tasa de extinción actual a menudo se han centrado en las especies más raras o con mayor nivel de amenaza, mientras que las especies más comunes han recibido menos atención (Inger et al., 2015). Así, aunque muchas especies comunes están disminuyendo mundialmente (Conrad et al., 2006; Van Dyck et al., 2009), existe poca información sobre el estado de conservación de sus poblaciones (Elliott et al., 2010). Esto ocurre porque las especies son las unidades de conservación prioritaria y a menudo se descuida la planificación e investigación de conservación por debajo de este nivel (Thakur et al., 2018). No obstante, es bien sabido que la biodiversidad está contenida en múltiples niveles de organización biológica (de genes a ecosistemas, Gaston, 2000). Por ello, los esfuerzos para conservarla no deben ir dirigidos únicamente a garantizar el buen estado de conservación de las especies, sino también al de aquellas poblaciones o grupos de poblaciones que actúan como reservorios

diferenciados de diversidad dentro de la especie. De hecho, la conservación y gestión a nivel sub-específico es cada vez más importante, ya que estas poblaciones representan unidades evolutivas que pueden liderar la respuesta adaptativa ante futuras amenazas climáticas (Gutiérrez-Tapia & Palma, 2016).

La musaraña de campo, *Crocidura suaveolens* (Pallas 1811), es un pequeño mamífero insectívoro (Orden *Eulipotyphla*; Familia *Soricidae*; Subfamilia *Crocidurinae*; Tabla 1) con una amplia distribución euroasiática, la cual abarca desde las costas atlánticas de la península ibérica hasta Siberia (Palomo et al., 2016; Fig. 1). Esta musaraña está presente, además, en numerosas islas atlánticas y mediterráneas (Hutterer, 2005).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la musaraña de campo según Palomo et al. (2016).

Clasificación Taxonómica	
Reino	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Chordata</i>
Clase	<i>Mammalia</i>
Orden	<i>Eulipotyphla</i>
Familia	<i>Soricidae</i>
Subfamilia	<i>Soricinae</i>
Género	<i>Crocidura</i>
Especie	<i>Crocidura suaveolens</i>

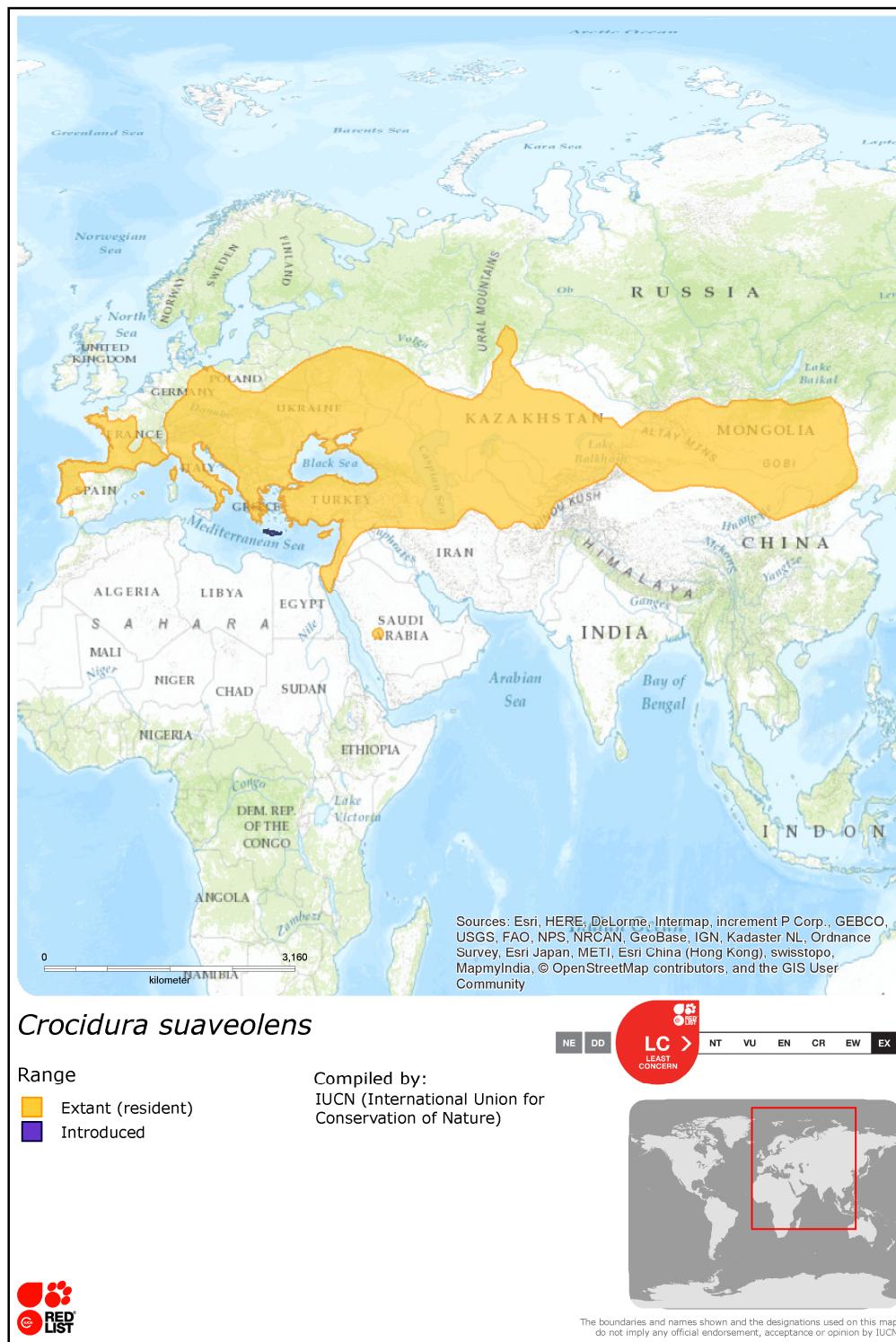


Figura 1. Rango de distribución global de la musaraña de campo (*Crocidura suaveolens*).

Fuente: Palomo et al. (2016).

Respecto a sus requerimientos ecológicos, la musaraña de campo es capaz de habitar en una gran variedad de ambientes, siendo habitualmente descrita como una especie

generalista de hábitat (Libois et al., 1999; Rey, 2007; Palomo et al., 2016). Entre los hábitats descritos para la especie se incluyen diferentes tipos de cultivos, tales como viñedos y olivares (Madureira & Ramalhinho, 1981), arrozales y cultivos húmedos (Tez, 2000; Jeong et al., 2010), cultivos intensivos de regadío (Vogel et al., 1986), así como huertas con setos y taludes no cultivados (Iza et al., 1985). Ha sido capturada también en márgenes de cultivos (Krystufek & Tvrkovic, 1988; Mienis, 1996; Vogel & Sofianidou, 1996) y en ambientes de ecotono entre prados y setos (Escala et al., 1997). Alcanza densidades altas en pastizales húmedos con vegetación densa (Rey & Rey, 1974) pero puede vivir incluso en laderas rocosas y acantilados (Pascal et al., 2005). Es frecuente también en una gran variedad de hábitats forestales incluyendo bosques mediterráneos (Haim et al., 1997; Cagnin et al., 1998; Mortelliti & Boitani, 2009), bosques mixtos atlánticos (Rey, 2007), bosques esteparios (Libois et al., 1999), bosques de ribera (Álvarez et al., 1985; Sofianidou & Vohralík, 1991), así como hábitats de matorral atlántico espeso (Rood, 1965b; Zabala, 1985) y de matorral mediterráneo seco (Mienis, 1996; Haim et al., 1997). Esta musaraña está presente, además, en numerosos hábitats costeros como dunas de arena litorales con vegetación, playas pedregosas y marismas (Spencer-Booth, 1956; Spencer-Booth, 1963; Pernetta, 1973; Rey & Landín, 1973; Godfrey, 1978; Poitevin et al., 1987; Román & Ruiz, 2003; Pascal et al., 2009). Otros ambientes descritos para la especie incluyen valles resguardados y depresiones fluviales localizadas a escasa altitud (Dory, 1976; Castién & Gosálbez, 1992). La musaraña de campo ha sido citada desde el nivel del mar hasta los 1600 m de altura. En zonas de elevada altitud y/o latitud (como en el norte de Europa), suele asociarse a hábitats antrópicos, tales como muros de piedra, vegetación ruderal, parques, jardines, almacenes de pacas de paja e incluso casas (Vohralík, 1988; Savarin, 2006; Pascal et al., 2009). Esta musaraña solo parece evitar bosques muy densos (Vlasák & Niethammer, 1990; Libois et al., 1999) y zonas desérticas (donde sí se la halla en manantiales u oasis; Qumsiyeh, 1996). Por

lo general, la especie suele ocupar ambientes con cierta cobertura vegetal y humedad, aunque su presencia en hábitats muy opuestos, con escasa vegetación y gran aridez, denotan su alta plasticidad ecológica. Posiblemente, la cobertura vegetal así como grietas y cavidades en hábitats rocosos le proporcionan cobijo y protección frente a depredadores (Poitevin et al., 1987; Pascal et al., 2009). Además, los restos vegetales y la humedad favorecen la abundancia de invertebrados, que son sus presas habituales (Rood, 1965b; Mortelliti & Boitani, 2009). La musaraña de campo es una especie depredadora que basa su dieta principalmente en invertebrados, tales como insectos, arácnidos, isópodos y miriápodos (Burda & Bauerová, 1985; Poitevin et al., 1987; Bauerova, 1988). Ocasionalmente consume también moluscos, anfípodos, anélidos y pequeños vertebrados (Spencer-Booth, 1956; Pernetta, 1973; Pernetta, 1977; Mienis, 1996; Haim et al., 1997; Rychlik, 1998; Rey, 2007).

En cuanto a las estrategias energéticas y de comportamiento, las musarañas del género *Crocidura* presentan tasas metabólicas más bajas que otros géneros de su misma familia (como *Neomys* y *Sorex*; Taylor, 1998). Además, las *Crocidura* pueden entrar en letargo minimizando su gasto energético (Aulagnier et al., 2009). La musaraña de campo puede tener varios picos de actividad durante el día y la noche, pero lo más frecuente es que presente actividad nocturna o crepuscular (Spencer-Booth, 1956; Spencer-Booth, 1963; Madureira & Ramalhinho, 1981; Haim et al., 1997). En términos demográficos, las *Crocidura* pueden tener 3 o 4 camadas al año, pero sus camadas son pequeñas en comparación con las de otras *Soricidae*, superando rara vez las 5 crías (número medio de crías por camada en *Crocidurinae* = 2,7 y *Soricinae* = 5,1; Fons et al., 1997; Rychlik, 1998; Taylor, 1998). A veces, forman caravanas donde los jóvenes siguen a su madre conservando el contacto con el individuo que les precede (Aulagnier et al., 2009). En zonas de clima mediterráneo, el periodo reproductor de las *Crocidura* comienza a principios de primavera y se prolonga hasta el otoño, bajando en intensidad durante el verano (Fons, 1975; López-Fuster, 1983).

Es decir, en zonas mediterráneas la reproducción se centra en primavera y otoño, las estaciones más húmedas (Rychlik, 1998). Durante la reproducción, los machos desprenden un fuerte olor a almizcle, procedente de glándulas laterales situadas en sus costados, y las hembras presentan mamas desarrolladas (Rood, 1965a; Rychlik, 1998). Los ejemplares adultos son territoriales (Rood, 1965b; Haim et al., 1997). Los territorios son marcados por olor y son usados solo por una pareja reproductora (Rychlik, 1998). El área de campeo media descrita para la musaraña de campo es de 50 m y sus mayores desplazamientos suelen estar por debajo de los 100 m (Rood, 1965b; Poitevin et al., 1987). Sin embargo, se han llegado a registrar desplazamientos de centenares de metros en individuos dispersantes o colonizadores (Haim et al., 1997; Rychlik, 1998).

Por otro lado, es habitual que las *Crocidura*, como otras *Soricidae*, presenten variaciones de abundancia entre estaciones (Mortelliti & Boitani, 2009). En concreto, las poblaciones mediterráneas de musaraña de campo presentan picos de abundancias máximas en otoño-invierno, porque es cuando termina el periodo reproductor y coexisten individuos de diferentes generaciones (Poitevin et al., 1987; Mortelliti & Boitani, 2009). Una mayor abundancia en otoño-invierno ha sido también observada en varias poblaciones europeas de musaraña gris, *Crocidura russula* (Hermann 1780) (Genoud & Vogel, 1990; Torre et al., 2018), y de musaraña bicolor, *Crocidura leucodon* (Hermann, 1780) (Simeonovska-Nikolova, 2004; Mortelliti & Boitani, 2009). Por tanto, parece ser bastante común entre las *Crocidura* europeas alcanzar máximos poblacionales en otoño-invierno. Sin embargo, en algunas islas como Córcega (Poitevin et al., 1987) y las islas Sorlingas (Rood, 1965a) la musaraña de campo es más abundante durante el verano, debido a que el final del periodo reproductor y la mayor disponibilidad de presas se producen en esta estación.

La taxonomía de *C. suaveolens* es bastante confusa y ha sido un tema discutido y controvertido (Dubey et al., 2006). De hecho, está actualmente sometido a revisión y cambio. La dificultad radica en que la estructura interna de *C. suaveolens* es extraordinariamente compleja. Prueba de ello es que dentro de *C. suaveolens* (sensu lato) se han descrito numerosas especies y subespecies en base a características morfológicas (Corbet, 1978; Hutterer, 2005), que luego no han sido soportadas a nivel molecular (Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2007; Dubey et al., 2008). Así pues, dentro de *C. suaveolens* se incluyen numerosos morfotipos distintos cuyos estatus taxonómicos permanecen sin aclarar. Las primeras revisiones taxonómicas de *C. suaveolens* estuvieron basadas exclusivamente en criterios morfológicos. Por ejemplo, Zaitsev (1991) demostró que los morfotipos *C. suaveolens* (Pallas 1811) del este de Europa, *C. sibirica* (Dukelsky 1930) de Asia Central, *C. gueldenzaedtii* (Pallas 1811) de Europa Central y *C. caspica* (Thomas 1907) del sur del Mar Caspio, eran morfológicamente distintos, y que debían ser tratados como especies separadas. Más tarde, Hoffmann (1996) propuso que el morfotipo *C. gmelini* (Pallas 1811) de Asia Central también debía considerarse una especie separada de *C. suaveolens*, mientras que Jiang & Hoffmann (2001) lo propusieron para el morfotipo *C. shantungensis* (Miller 1901) del este asiático. Sin embargo, otros autores coincidían en que todas las poblaciones euroasiáticas de musarañas de campo debían ser agrupadas como una única especie (grupo *C. suaveolens*), en base a que todas ellas mostraban un cariotipo similar ($2N = 40$, $NF = 50$; Catzfis et al., 1985; Vogel et al., 1986; Hutterer, 1993). Posteriormente, la idoneidad de esta agrupación cariológica fue confirmada con datos de ADN mitocondrial (Vogel et al., 2003). Sin embargo, en un intento posterior por aclarar la filogenia y sistemática del grupo, Bannikova et al. (2006) describieron dos clados principales: un clado oriental formado por el morfotipo *C. suaveolens* / *C. sibirica* (este de Europa y Asia), junto con *C. caspica* (sur del Mar Caspio), y un clado occidental formado por *C. mimula* (oeste de Europa) y *C. gueldenzaedtii* (Europa

central). Estos autores detectaron hibridación entre *C. suaveolens* y *C. gueldenstaedtii* en sus zonas de contacto, afirmando que era difícil establecer verdaderas especies. Por ello, propusieron que todas las musarañas de tipo *suaveolens* podían ser consideradas como una superespecie o un complejo de especies, mientras que todos los morfotipos alopátricos que lo conformaban (*shantungensis*, *caspica*, *gueldenstaedtii*, *mimula* y *suaveolens* s.str.) podían tratarse como semiespecies (o supersubespecies). Poco después, Dubey et al. (2006) y Dubey et al. (2007) identificaron un total de diez clados filogeográficos con distribuciones parapátricas a lo largo del área de distribución de la especie. Estos clados habrían surgido como resultado del aislamiento prolongado en distintos refugios del sur de Eurasia durante las glaciaciones del Cuaternario y posterior expansión en períodos interglaciares (Fig. 2). En ambos trabajos, estos autores realizaron una clasificación taxonómica ciertamente conservadora. Nombraron los distintos clados de *C. suaveolens* como subespecies, advirtiendo que existían numerosas zonas de contacto donde el grado de aislamiento genético entre clados era desconocido. De hecho, en un trabajo posterior (Dubey et al., 2008), confirmaron que el aislamiento genético entre los clados de Europa Oriental y Turquía era débil (clados V, VI y VII en Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2007), detectando zonas de contacto secundario e hibridación que proporcionaban evidencias de conespecificidad entre dichos clados. Esto les llevó a afirmar que sus clasificaciones previas en clados con distribuciones parapátricas (Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2007), podían ser bastante simplistas. Concluyeron que eran necesarios más estudios, combinando marcadores mitocondriales y nucleares, en las zonas de contacto para clarificar los patrones filogeográficos y el grado de aislamiento reproductivo entre los clados del grupo *C. suaveolens*. Por tanto, en la actualidad y desde un punto de vista genético, solo las poblaciones de Asia oriental (SE Siberia, E China, Korea, Taiwan y Japón) que conforman el clado I de Dubey et al. (2006) y Dubey et al. (2007) han sido consideradas como una especie separada de *C.*

suaveolens, denominada *Crocidura shantungensis* (Jiang & Hoffmann, 2001; Ohdachi et al., 2004; Bannikova et al., 2009).

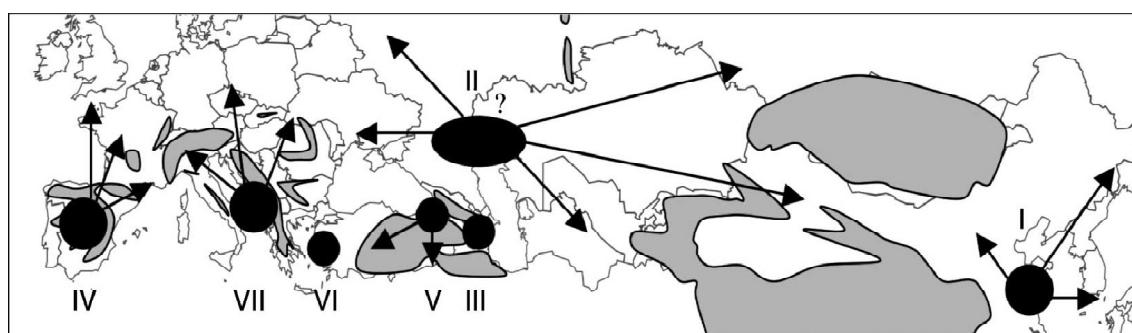


Figura 2. Refugios potenciales (negro), barreras geográficas (gris) y rango de expansión (flechas) de los diferentes clados filogeográficos de *C. suaveolens*. Fuente: Dubey et al. (2006).

No obstante, en el reciente manual de los mamíferos del mundo (Wilson & Mittermeier, 2018) se ha propuesto un nuevo marco taxonómico para el grupo *C. suaveolens*. En este manual, en base a los datos morfológicos y moleculares disponibles actualmente (entre otros, Bannikova et al., 2006; Dubey et al., 2007; Zaitsev et al., 2014), se propone reservar el nombre *C. suaveolens* únicamente para el clado más oriental, distribuido por Europa del este y Asia Central (clado II en Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2007). En cambio, para los clados localizados en Europa occidental y central, así como en Asia occidental (clados IV, V, VI, VII, VIII y X en Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2007) se propone atribuirles el nombre *C. gueldenstaedtii*. Además, se indica que bajo esta nueva asignación taxonómica, *C. suaveolens* y *C. gueldenstaedtii* estarían genéticamente distanciadas y serían distinguibles morfológicamente. Por tanto, deberían ser reconocidas como especies separadas. Sorprendentemente, *C. caspica*, *C. aleksandrisi* y *C. sibirica* también se consideran como especies separadas, a pesar que dicha consideración no era soportada o recomendada por evaluaciones genéticas previas (clados III, IX y parte del II, respectivamente, en Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2007). Esto no hace más que evidenciar lo anteriormente comentado, la permanente revisión y cambio a la que se encuentra sometida la taxonomía del grupo

C. suaveolens. En esta tesis se ha seguido un criterio conservador y se ha usado como referencia el marco taxonómico propuesto por Dubey et al. (2006) y Dubey et al. (2007), es decir, los distintos clados del grupo *C. suaveolens* se han considerado como subespecies, a excepción del clado I de Asia oriental que se ha considerado como una especie separada, *C. shantungensis*.

Las poblaciones ibéricas de musaraña de campo pertenecen al denominado clado IV, el clado más basal de Europa (*C. s. iculisma*; Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2007). Este clado IV agrupa poblaciones de toda Europa occidental (península ibérica, Francia, Inglaterra y noroeste de Italia). La historia filogeográfica de la musaraña de campo en la península ibérica es un tema poco documentado, pero lo poco que se conoce es muy interesante. Es sabido que las fluctuaciones climáticas del Cuaternario han tenido una enorme influencia en el modelado de la diversidad actual de los seres vivos en el Holártico (Hewitt, 2000). En Europa, muchas de las especies de clima templado derivan de poblaciones que se refugiaron en el sur de Europa y que luego se expandieron de nuevo por el continente (Hewitt, 2011). Uno de los refugios más importantes del Pleistoceno glacial europeo fue la península ibérica (Hewitt, 2004). Sin embargo, parece que la península ibérica no actuó como un único refugio, sino más bien como una serie de subrefugios geográficamente separados entre sí. Estos subrefugios fueron ocupados por los taxones durante los períodos fríos y, en ocasiones, permanecieron aislados en ellos durante largos períodos de tiempo (hipótesis "refugios dentro de los refugios"; Gómez & Lunt, 2007). La diferenciación producida durante este aislamiento ha dado lugar a una enorme diversidad genética interna en las especies (Centeno-Cuadros et al., 2009; Igea et al., 2013; Barbosa et al., 2017). Lo mismo ocurrió en el caso de la musaraña de campo. Los antecesores de las musarañas de campo debieron refugiarse y aislarse en la península ibérica durante las glaciaciones del Pleistoceno Inferior, hace unos 1,72 millones de años (Taberlet et al., 1998; Dubey et al., 2006; Fig. 2). Por ello, sería esperable que la musaraña de

campo presentase una fuerte estructura poblacional y elevada diversidad genética en la península ibérica, pero no hay ningún estudio sobre ello. De hecho, solo dos muestras ibéricas han sido incluidas en los estudios filogeográficos realizados hasta el momento sobre la especie (Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2007).

La musaraña de campo es habitualmente descrita como una especie común y abundante a lo largo de su amplia distribución euroasiática (Palomo et al., 2016), incluso se la considera ubiquista en algunas zonas (Harrison & Bates, 1991). Debido a ello, *C. suaveolens* se encuentra catalogada como *Preocupación Menor* en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, Palomo et al., 2016). No obstante, en Europa occidental, la especie es menos común y presenta una distribución más reducida y fragmentada (Libois et al., 1999; Fig. 1). En esta parte de su distribución, *C. suaveolens* es una especie rara y muy desconocida. En Francia está catalogada como *Casi Amenazada* en la lista roja de especies amenazadas (IUCN-France et al., 2017) y aparece listada hasta en tres listas rojas regionales: como *Datos Insuficientes* en la lista roja de los mamíferos salvajes de Auvergne (Girard et al., 2015), como *En Peligro* en la lista roja regional y responsabilidad biológica regional de los mamíferos de Bretaña [GIP Bretagne Environnement (Coord.) et al. 2015], y como *Vulnerable* en la lista roja de los mamíferos de la región Central (Thevenin, 2013). En la península ibérica existe un enorme desconocimiento sobre el estado de conservación de *C. suaveolens*. En Portugal, aunque existen numerosas citas de la especie de norte a sur, su presencia solo ha sido confirmada en una pequeña zona del centro del país (Fig. 3A, Paupério et al., 2017). Por ello, *C. suaveolens* está catalogada como *No Evaluada* en el libro rojo de los vertebrados de Portugal (Cabral et al., 2005). En España, lo poco que se conoce es que ocupa diversos ambientes en zonas de clima atlántico, presentando cierta continuidad en su distribución (Fig. 3B), mientras que en zonas mediterráneas ocupa ambientes húmedos y su distribución es muy reducida y parcheada (Rey, 2007).

En todo el territorio español, no existen estudios ecológicos o genéticos que permitan la evaluación del estado de conservación de sus poblaciones, por lo que *C. suaveolens* está catalogada como *Datos Deficientes* en el atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España (Palomo et al., 2007).

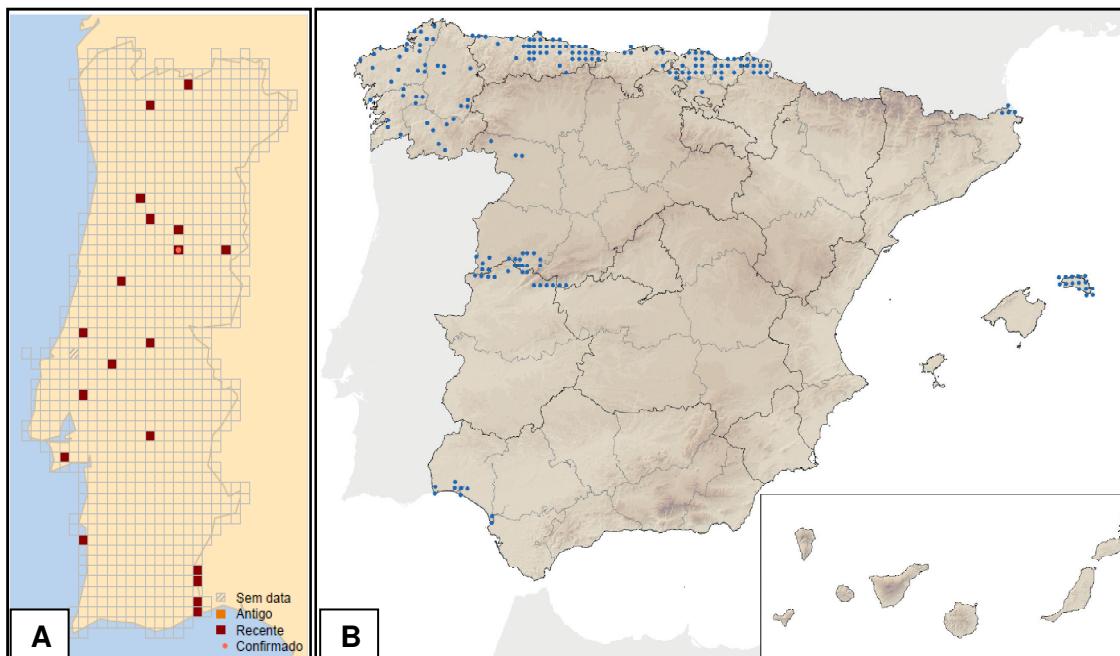


Figura 3. Distribución de la musaraña de campo, *Crocidura suaveolens*, en: A) Portugal. Las citas son mostradas con cuadrados rojos oscuros y la única cita confirmada de la especie se muestra con un punto rojo claro. Fuente: Atlas de Mamíferos de Portugal (Paupério et al., 2017). B) España. Las citas conocidas son representadas con puntos azules. Fuente: Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España (Rey, 2007).

Una de las principales causas de la distribución fragmentada y rareza de la musaraña de campo en Europa occidental parece ser la competencia con la musaraña gris (Libois et al., 1999). De hecho, numerosos estudios muestran como la musaraña gris excluye competitivamente a la musaraña de campo, reemplazándola en algunas islas de la costa atlántica francesa (Cosson et al., 1996), en la mayor parte del oeste de Francia (Cosson, 1998; Pascal et al., 2006) y en el norte de Alemania (Niethammer, 1979; Kraft, 2000). Además, la musaraña de campo ha sido desplazada por la musaraña gris hacia ambientes húmedos en el sur de Francia (Poitevin et al., 1987) y

en el suroeste de España (Román & Ruiz, 2003). Por otro lado, es evidente que la distribución de la musaraña de campo únicamente se fragmenta en el oeste de Europa, justo donde ambas especies viven en simpatría (Fig.1). La musaraña gris también ha excluido competitivamente a otras especies de *Crocidura*, como a la musaraña bicolor, haciéndola desaparecer del valle del río Ródano en Suiza (Vogel et al., 2002). La musaraña gris es una especie de origen africano que llegó a la península ibérica a través del estrecho de Gibraltar durante el Pleistoceno superior (Brändli et al., 2005; Cosson et al., 2005). Concordantemente, el registro fósil indica que la musaraña de campo presentaba en la península ibérica durante el Pleistoceno, antes de la llegada de la musaraña gris, una distribución mucho más amplia que la actual (Ruiz-Bustos et al., 1984). De hecho, la musaraña de campo ha sido detectada en numerosos yacimientos paleontológicos localizados en lugares donde actualmente no está presente (Fig. 3B), tales como Sierra de Alfaguara en Granada (Ruiz-Bustos et al., 1984), Villacastín en Segovia (Arribas, 1994), Sierra de Quibas en Murcia (Montoya et al., 2001), Boquete de Zafarraya entre las provincias de Málaga y Granada (Barroso Ruiz & Desclaux, 2006) y otros enclaves del levante español (Guillem-Calatayud, 1995a; Guillem-Calatayud, 1995b; Guillem-Calatayud, 2001; López-García, 2008; Valenzuela et al., 2009). Por tanto, los indicios disponibles sugieren que la musaraña de campo ha podido sufrir una importante regresión en Europa occidental y, en particular, en la península ibérica durante el Pleistoceno. Además, es posible que la especie esté actualmente en declive poblacional debido a la competencia con la musaraña gris y otras causas asociadas a su rareza y fragmentación poblacional. Se sabe que las poblaciones pequeñas y aisladas son propensas a sufrir pérdida de diversidad genética por endogamia, deriva genética y reducción del flujo génico (Diekmann & Serrão, 2012; Ford et al., 2018; Roques et al., 2018). Sin embargo, como ya se ha comentado, el gran desconocimiento existente sobre la musaraña de campo impide realizar una adecuada evaluación del estado de conservación y manejo de sus

poblaciones. Por tanto, la necesidad de investigación y estudio sobre la especie es más que evidente.

Una de las regiones donde mayor desconocimiento existe sobre la musaraña de campo es el golfo de Cádiz, donde la especie alcanza el límite más suroccidental de su distribución global (Fig. 4A). Las poblaciones de musarañas de campo del golfo de Cádiz son las únicas poblaciones andaluzas conocidas. También son, aparentemente, las poblaciones continentales europeas más aisladas, estando separadas unos 300 km de la población más cercana confirmada, localizada en el centro de Portugal (Fig. 3). En el golfo de Cádiz la musaraña de campo ha sido detectada solo como presa de la lechuza común, *Tyto alba* (Scopoli 1769), en posaderos localizados en torno a tres áreas de marismas mareas de las desembocaduras de los ríos Guadiana, Odiel-Tinto y Guadalquivir (Fig. 4B; Rey & Landín, 1973; Román & Ruiz, 2003). Estas citas costeras, junto con el gran distanciamiento que presentan respecto a la población del centro de Portugal, plantean dudas sobre el origen de las poblaciones del golfo de Cádiz. Una posibilidad es que el origen de estas poblaciones se deba a una introducción humana accidental a través de rutas históricas de navegación, como es el caso de la población de la isla de Menorca [*C. s. balearica* (Miller, 1907); agrupada en el clado V en Dubey et al., 2007]. No obstante, también es probable que las poblaciones del golfo de Cádiz tengan una historia evolutiva común con el resto de poblaciones ibéricas, y que el gran aislamiento de estas poblaciones meridionales sea resultado de la importante regresión y fragmentación poblacional que la especie parece haber sufrido en la península ibérica, tal y como se comentó anteriormente.

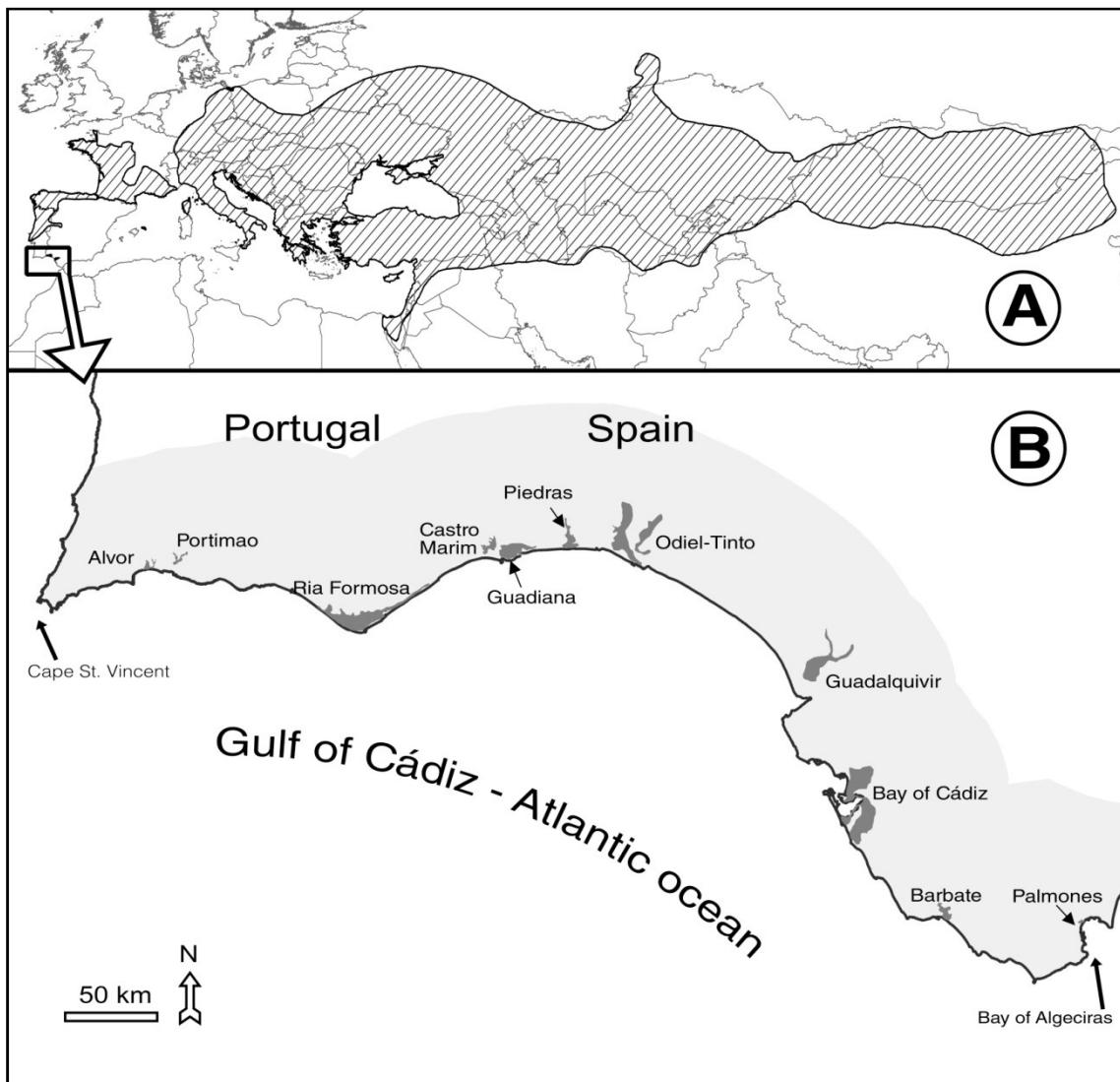


Figura 4. Mapas mostrando: (A) El rango de distribución global de la musaraña de campo, *Crocidura suaveolens* (área rallada, Palomo et al., 2016) y la localización del golfo de Cádiz en el suroeste de la península ibérica; (B) Las áreas de marisma mareal del golfo de Cádiz (en gris oscuro). Hasta el momento, la presencia de la musaraña de campo solo ha sido detectada en torno a las marismas del Guadiana, Odiel-Tinto y Guadalquivir (Rey & Landín, 1973; Román & Ruiz, 2003). La zona sombreada en gris claro representa una franja costera de presencia potencial de la especie. Esta franja tiene 45 km de anchura respecto a la línea de costa.

La detección de la musaraña de campo en el golfo de Cádiz en torno a áreas de marismas mareas, ha motivado también la sospecha de que la especie pudiera presentar poblaciones aisladas en dichas áreas, teniendo por tanto una distribución altamente restringida y fragmentada en la región (Román & Ruiz, 2003). En tal caso,

es muy posible que nuevas poblaciones de musaraña de campo estén aún por detectar, dada la existencia de hasta ocho áreas marismeñas más a lo largo del golfo de Cádiz (Fig. 4B). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado muestreos lo suficientemente intensos a escala regional que permitan descartar la presencia de la especie en otros hábitats distintos a las marismas. Esto también podría ser bastante probable dado el habitual carácter generalista de la musaraña de campo en el resto de su distribución (Palomo et al., 2016). Por otro lado, la presencia de la especie en el sector más occidental del golfo de Cádiz, en el sur de Portugal, ha sido sugerida en varias ocasiones, pero nunca confirmada. Las primeras citas de musaraña de campo del sur de Portugal son de los años 80 del s. XX (Madureira & Magalhães, 1980; Madureira & Ramalhinho, 1981), pero luego fueron retiradas del atlas de los mamíferos europeos (Libois et al., 1999) debido a que se habían confundido en la identificación. Eran, según reconocieron los autores, musarañas grises. Esto ocurre a menudo, la musaraña de campo es fácilmente confundida con la musaraña gris porque son muy parecidas morfológicamente (Hutterer, 2005). Recientemente, en el atlas de mamíferos de Portugal, se ha vuelto a sugerir la presencia de la musaraña de campo en el sur de Portugal pero de nuevo con varias citas pendientes de confirmación (Fig. 3A, Paupério et al., 2017). De confirmarse estas observaciones, la musaraña de campo podría presentar en el golfo de Cádiz una distribución continua a lo largo de la costa en múltiples hábitats, similar a la que presenta en otras regiones del norte y noroeste peninsular (Fig. 4). De hecho, esto ha sido sugerido en algunas ocasiones (Rey & Landín, 1973; Rey & Rey, 1974).

Si las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz permanecen aisladas y presentan una historia evolutiva común con el resto de poblaciones ibéricas, podrían tener una importancia biológica muy grande, al estar situadas en el extremo suroeste de la distribución global de la especie. En este sentido, es esperable que las poblaciones localizadas en los límites de latitud baja (poblaciones de borde inferior) de

las especies presenten una diversidad genética alta y exclusiva, como resultado de su aislamiento prolongado en distintos refugios durante las glaciaciones cuaternarias (Diekmann & Serrão, 2012; Assis et al., 2013). La persistencia de estas poblaciones a lo largo de episodios climáticos fríos y templados denotaría el alto potencial adaptativo que ellas albergan. De hecho, en la actualidad los estudios de poblaciones de borde inferior son considerados de alta prioridad para la conservación a largo plazo de la diversidad genética y del potencial evolutivo de las especies, además de proporcionar información sobre su historia filogenética (Lesica & Allendorf, 1995; Martin & McKay, 2004; Hampe & Petit, 2005; Kawecki, 2008). Por lo tanto, la caracterización genética de las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz debe ser considerada una tarea urgente para el diseño de una estrategia de conservación para la especie.

Otro aspecto de gran relevancia y muy desconocido para la musaraña de campo en el golfo de Cádiz, así como en otras muchas regiones del oeste de Europa, es comprender como coexiste con la musaraña gris. La teoría ecológica predice que especies ecológicamente similares, como son estas dos musarañas, no pueden coexistir al menos que sus nichos se segreguen (Principio de Exclusión Competitiva; Gause, 1934; Hardin, 1960). Según este principio, cuando la competencia es altamente asimétrica, el competidor superior excluye al competidor inferior hasta provocar su extinción. Esto es lo que parece haber ocurrido en la mayor parte del oeste de Europa, donde la musaraña de campo ha sido desplazada competitivamente de amplias zonas por la musaraña gris (Niethammer, 1979; Poitevin et al., 1987; Cosson et al., 1996; Cosson, 1998; Libois et al., 1999; Kraft, 2000; Román & Ruiz, 2003; Pascal et al., 2006). Sin embargo, en el golfo de Cádiz y en otras regiones del oeste de Europa, ambas especies conviven en simpatría y parecen coexistir. ¿Por qué? ¿Existen tal vez en estas regiones factores ambientales o ecológicos que favorecen su coexistencia? ¿Es la segregación de nicho en estas regiones de simpatría un mecanismo clave para la coexistencia de estas dos especies de

musarañas? Se sabe que la coexistencia favorecida por segregación de nicho a menudo implica que el competidor inferior sea relegado a un nicho reducido (nicho realizado), donde la competencia con el competidor superior se reduce o se evita (Begon et al., 2006). En ausencia del competidor superior, es esperable que el competidor inferior expanda su nicho hasta recuperar su nicho potencial (nicho fundamental), como resultado de su liberación de la presión competitiva. Esta variación del nicho regulada por competencia interespecífica actual es lo que se conoce como un efecto ecológico de la competencia. Sin embargo, también es posible que, en ausencia del competidor superior, el competidor inferior mantenga su nicho invariable, es decir, que no expanda su nicho. En tal caso, la relación de competencia actual no explicaría la restricción de nicho del competidor inferior, ya que la desaparición de la competencia no tiene efecto alguno en él. Dicha restricción e invariación de nicho podría deberse a que el competidor inferior ha sufrido un cambio evolutivo, el cual podría estar causado por una relación de competencia en el pasado (Connell, 1980). Por tanto, para dar respuesta a las preguntas anteriormente planteadas, parece necesario no solo conocer si, como predice la teoría ecológica, la segregación de nicho es un mecanismo clave que permite la coexistencia de estas dos musarañas, sino también cómo es la relación de competencia entre ambas especies y qué factores ecológicos influyen en dicha relación. Con esta información se podría determinar si la posible restricción de la musaraña de campo es un efecto ecológico de la competencia interespecífica, o si por el contrario la especie presenta algún tipo de especialización de nicho (efecto evolutivo). En este sentido, el golfo de Cádiz podría constituir un excelente caso de estudio para intentar entender los mecanismos que favorecen la coexistencia de especies que compiten.

Finalmente, cabe destacar que el estado de conservación de la musaraña de campo permanece sin evaluar en la comunidad autónoma de Andalucía debido a la escasa información disponible sobre la especie (categoría de *Datos Insuficientes* en libro rojo

de los vertebrados amenazados de Andalucía, Soriguer et al., 2001). La evaluación del estado de conservación de estas poblaciones andaluzas es particularmente urgente, ya que a menudo las poblaciones borde de especies comunes o generalizadas están aisladas y amenazadas, mientras que la especie se considera como *Preocupación menor* (LC) en la Lista Roja de la UICN (Thakur et al., 2018). Dicha situación podría estar privando a estas poblaciones andaluzas de la atención de conservación necesaria. En este sentido, el conocimiento biogeográfico, ecológico y genético que esta tesis pretende reunir sobre la musaraña de campo en el golfo de Cádiz, podría ayudar a la evaluación del estado de conservación de la especie en Andalucía, permitiendo así una planificación y gestión acorde a la situación real de dichas poblaciones.

1.1. OBJETIVOS

Los objetivos son los siguientes:

1. Inferir la historia evolutiva de la musaraña de campo en la península ibérica.
 - a. Identificar linajes evolutivos mitocondriales y estimar tiempos de divergencia entre ellos.
 - b. Clarificar el origen de las poblaciones del golfo de Cádiz.
 - c. Discutir los procesos filogeográficos y demográficos que han dado lugar a la variación genética y distribución actual de la especie en la península ibérica.
2. Clarificar la distribución de la musaraña de campo en el golfo de Cádiz.
 - a. Inferir la asociación de la especie con sus hábitats potenciales.
 - b. Determinar si la especie presenta un patrón de distribución uniforme, aleatorio o agregado.
 - c. Confirmar la presencia o ausencia de la especie en los hábitats de presencia potencial.
 - d. Investigar los posibles factores causantes de su distribución regional.

3. Evaluar el estado génico de la musaraña de campo en el golfo de Cádiz.
 - a. Caracterizar genéticamente cada una de las poblaciones existentes.
 - b. Evaluar la estructura genética y los niveles de diversidad genética.
 - c. Determinar el grado de diferenciación y conectividad poblacional e identificar posibles barreras al flujo génico.
 - d. Investigar la posibilidad de disminuciones recientes de población.
 - e. Sugerir estrategias de conservación y manejo.
4. Describir la selección de hábitat de la musaraña de campo y las relaciones interespecíficas con la musaraña gris en el golfo de Cádiz.
 - a. Conocer el uso de hábitats y los patrones de abundancia estacional de la musaraña de campo.
 - b. Determinar la importancia de la disponibilidad y abundancia de presas en el uso del hábitat.
 - c. Evaluar si la coexistencia de la musaraña de campo y la musaraña gris está facilitada por la segregación de los nichos y si esta segregación es el resultado de la competencia interespecífica actual (efecto ecológico) o pasada (efecto evolutivo).

1.2. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis doctoral está estructurada en cinco capítulos. Tras presentar un resumen de la tesis doctoral en español y en inglés, se realiza un primer capítulo de introducción a la especie de estudio, la musaraña de campo, y a su estado de conocimiento previo a la realización de esta tesis. En este primer capítulo también se detallan los objetivos propuestos, la estructura de la tesis y, finalmente, se listan las referencias bibliográficas citadas en la introducción.

En el segundo capítulo se describen de forma general y breve los materiales y métodos empleados para la consecución de los distintos objetivos propuestos. Una

descripción de materiales y métodos más detallada se desarrolla posteriormente dentro de los distintos artículos presentados en el tercer capítulo.

El tercer capítulo constituye la parte principal de esta tesis doctoral porque es donde se exponen los principales resultados obtenidos. Este capítulo está dividido en cuatro apartados que se corresponden con los diferentes artículos científicos realizados. Dichos artículos se organizan en las secciones habituales para la publicación científica. Cada uno de estos artículos engloba y desarrolla uno de los objetivos generales (y sus respectivos subobjetivos) propuestos para esta tesis doctoral. Los diferentes artículos están relacionados entre sí y siguen el orden cronológico de realización y/o publicación.

En un cuarto capítulo se realiza una discusión general de los resultados, donde se analiza la coherencia y complementariedad de los distintos trabajos realizados, y se exponen las principales implicaciones que estos trabajos significan para la conservación de la musaraña de campo.

Finalmente, en un quinto capítulo se enumeran las principales conclusiones de esta tesis doctoral.

1.3. REFERENCIAS

Álvarez J, Bea A, Faus JM, Castién E, Mendiola I. 1985. Atlas de los vertebrados continentales de Álava, Vizcaya y Guipúzcoa (excepto Chiroptera). Gobierno Vasco. Bilbao.

Arribas A. 1994. El yacimiento mesopleistoceno de Villacastín (Segovia, España): Geología y paleontología de micromamíferos. *Boletín Geológico y Minero* 105: 146-166.

Assis J, Castilho Coelho N, Alberto F, Valero M, Raimondi P, Reed D, Alvares Serrão E. 2013. High and distinct range-edge genetic diversity despite local bottlenecks. *PLOS ONE* 8: e68646.

Aulagnier S, Haffner P, Mitchell-Jones A, Moutou F, Zima J. 2009. *Guía de los mamíferos de Europa, del norte de África y de Oriente Medio*. Lynx Edicions: Barcelona.

Bannikova A, Sheftel B, Lebedev V, Aleksandrov DY, Muehlenberg M. 2009. *Crocidura shantungensis*, a new species for Mongolia and Buryatia. *Doklady Biological Sciences* 424: 68-71.

Bannikova AA, Lebedev VS, Kramerov DA, Zaitsev MV. 2006. Phylogeny and systematics of the *Crocidura suaveolens* species group: corroboration and controversy between nuclear and mitochondrial DNA markers. *Mammalia* 70: 106-119.

Barbosa S, Paupério J, Herman JS, Ferreira CM, Pita R, Vale-Gonçalves HM, Cabral JA, Garrido-García JA, Soriguer RC, Beja P, Mira A, Alves PC, Searle JB. 2017. Endemic species may have complex histories: within-refugium phylogeography of an endangered Iberian vole. *Molecular Ecology* 26: 951–967.

Barnosky AD, Matzke N, Tomaia S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mersey B, Ferrer EA. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471: 51-57.

Barroso Ruiz C, Desclaux E. 2006. Les insectivores (Mammalia, Insectivora) du pléistocène supérieur de la grotte du Boquete de Zafarraya. In: Barroso Ruiz C and De Lumley H, eds. *La grotte du Boquete de Zafarraya, Málaga, Andalousie Tome II*. Sevilla: Junta de Andalucía, Consejería de Cultura. 979-997.

Bauerova Z. 1988. The food of *Crocidura suaveolens*. *Folia zoologica* 37: 301-308.

Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing: Oxford, UK.

Brändli L, Handley L-JL, Vogel P, Perrin N. 2005. Evolutionary history of the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) inferred from analysis of mtDNA, Y, and X chromosome markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 832-844.

Burda H, Bauerová Z. 1985. Hearing adaptations and feeding ecology in *Sorex araneus* and *Crocidura suaveolens* (Soricidae). *Acta Zoologica Fennica* 173: 253-254.

Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira M, Palmeirim J, Queirós A, Rogado L, Santos-Reis M. 2005. Livro vermelho dos vertebrados de Portugal: Instituto da Conservação da Natureza.

Cagnin M, Moreno S, Aloise G, Garofalo G, Villafuerte R, Gaona P, Cristaldi M. 1998. Comparative study of Spanish and Italian terrestrial small mammal coenoses from different biotopes in Mediterranean peninsular tip regions. *Journal of Biogeography* 25: 1105-1113.

Castián E, Gosálbez J. 1992. Distribución de micromamíferos (Insectívora y Rodentia) en Navarra. *Misc. Zool.* 16: 183- 195.

Catzeffis F, Maddalena T, Hellwing S, Vogel P. 1985. Unexpected findings on the taxonomic status of East Mediterranean *Crocidura russula* auct. (Mammalia, Insectívora). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 50: 185-201.

Ceballos G, Ehrlich PR, Dirzo R. 2017. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E6089-E6096.

Centeno-Cuadros A, Delibes M, Godoy JA. 2009. Phylogeography of Southern Water Vole (*Arvicola sapidus*): evidence for refugia within the Iberian glacial refugium? *Molecular Ecology* 18: 3652-3667.

Connell JH. 1980. Diversity and the coevolution of competitors, or the ghost of competition past. *Oikos* 35: 131-138.

Conrad KF, Warren MS, Fox R, Parsons MS, Woiwod IP. 2006. Rapid declines of common, widespread British moths provide evidence of an insect biodiversity crisis. *Biological Conservation* 132: 279-291.

Corbet GB. 1978. *The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review*. Cornwell University Press: British Museum (Natural History), London.

Cosson J-F, Hutterer R, Libois R, Sarà M, Taberlet P, Vogel P. 2005. Phylogeographical footprints of the Strait of Gibraltar and Quaternary climatic fluctuations in the western Mediterranean: a case study with the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula* (Mammalia: Soricidae). *Molecular Ecology* 14: 1151-1162.

Cosson JF. 1998. Historical biogeography of two competing shrews of the genus *Crocidura* inferred from mt DNA variation. *Euro-American Mammal Congress*.

Cosson JF, Pascal M, Bioret F. 1996. Origine et répartition des musaraignes du genre *Crocidura* dans les îles bretonnes. *Vie et Milieu-Life and Environment* 46: 233-244.

Diekmann OE, Serrão EA. 2012. Range-edge genetic diversity: locally poor extant southern patches maintain a regionally diverse hotspot in the seagrass *Zostera marina*. *Molecular Ecology* 21: 1647-1657.

Dory MÁG. 1976. Sistemática y distribución en Asturias de los pequeños mamíferos. *Boletín del Instituto de Estudios Asturianos. Suplemento de Ciencias* 22: 1-12.

- Dubey S, Cosson J-F, Magnanou E, Vohralík V, Benda P, Frynta D, Hutterer R, Vogel V, Vogel P. 2007. Mediterranean populations of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura suaveolens* group): an unexpected puzzle of Pleistocene survivors and prehistoric introductions. *Molecular Ecology* 16: 3438-3452.
- Dubey S, Diker E, Kurtonur C, Vogel P. 2008. Secondary contact zones and hybridizations: the case of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura suaveolens* group, Soricidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 557-565.
- Dubey S, Zaitsev M, Cosson J-F, Abdukadier A, Vogel P. 2006. Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 635-647.
- Elliott GP, Wilson PR, Taylor RH, Beggs JR. 2010. Declines in common, widespread native birds in a mature temperate forest. *Biological Conservation* 143: 2119-2126.
- Escala M, Irurzun J, Rueda A, Ariño AH. 1997. Atlas de los Insectívoros y Roedores de Navarra. Análisis biogeográfico. *Publicaciones de Biología de la Universidad de Navarra, Serie Zoológica* 25: 1-79.
- Fons R. 1975. Premières données sur l'écologie de la Pachyure étrusque *Suncus etruscus* (Savi, 1822) et comparaison avec deux autres Crocidurinae: *Crocidura russula* (Hermann, 1780) et *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811) (Insectivora, Soricidae). *Vie et milieu* 25: 315-360.
- Fons R, Poitevin F, Catalan J, Croset H. 1997. Decrease in litter size in the shrew *Crocidura suaveolens* (Mammalia, Insectivora) from Corsica (France): Evolutionary response to insularity? *Canadian Journal of Zoology* 75: 954-958.

Ford MJ, Parsons KM, Ward EJ, Hempelmann JA, Emmons CK, Bradley Hanson M, Balcomb KC, Park LK. 2018. Inbreeding in an endangered killer whale population. *Animal Conservation* 0.

Gaston KJ. 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* 405: 220.

Gause G. 1934. *The struggle for existence*, 163 pp. Williams and Wilkins: Baltimore.

Genoud M, Vogel P. 1990. Energy requirements during reproduction and reproductive effort in shrews (Soricidae). *Journal of Zoology* 220: 41-60.

GIP Bretagne Environnement (Coord.), Dubos, T. & Simonnet, F. pour le GMB (2015).

Liste rouge régionale & Responsabilité biologique régionale pour les Mammifères de Bretagne. Observatoire de la Biodiversité et du Patrimoine Naturel de Bretagne, Rennes, 2 p.

Girard I, Lemarchand C, Pages D. 2015. *Liste rouge des mammifères sauvages d'Auvergne*. Groupe Mammalogique d'Auvergne & Chauve-Souris Auvergne / Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) Auvergne.

Godfrey GK. 1978. The activity pattern in white-toothed shrews studied with radar. *Acta theriologica* 23: 381-390.

Gómez A, Lunt DH. 2007. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss S and Ferrand N, eds. *Phylogeography of southern European refugia*. Dordrecht: Springer. 155-188.

Guillem-Calatayud PM. 1995a. Bioestratigrafía de los micromamíferos (Rodentia, Mammalia) del Pleistoceno Medio, Superior y Holoceno del País Valenciano. *Saguntum* 38: 11-18.

Guillem-Calatayud PM. 1995b. Paleontología continental: microfauna. *El Cuaternario del País Valenciano* 227: 233.

Guillem-Calatayud PM. 2001. Los micromamíferos y la secuencia climática del Pleistoceno Medio, Pleistoceno Superior y Holoceno, en la fachada central mediterránea. In: Villaverde V, ed. *De Neandertales a Cromañones: el inicio del poblamiento humano en las tierras valencianas*. Valencia: Universidad de Valencia. 57-72.

Gutiérrez-Tapia P, Palma RE. 2016. Integrating phylogeography and species distribution models: cryptic distributional responses to past climate change in an endemic rodent from the central Chile hotspot. *Diversity and Distributions* 22: 638-650.

Haim A, Rozenfeld A, Izhaki I. 1997. Post-fire response of shrews (*Crocidura suaveolens*) on Mount Carmel, Israel. *Mammalia* 61: 527-536.

Hampe A, Petit RJ. 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* 8: 461-467.

Hardin G. 1960. The competitive exclusion principle. *Science* 131: 1292-1297.

Harrison D, Bates P. 1991. *The mammals of Arabia*. Harrison Zoological Museum Publication: Sevenoaks, Kent, UK.

Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.

Hewitt GM. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 359: 183-195.

Hewitt GM. 2011. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica* 139: 617-638.

Hoffmann RS. 1996. Noteworthy shrews and voles from the Xizang-Qinghai plateau. In: Genoways HH and Baker RJ, eds. *Contributions in mammalogy: a memorial volume honoring Dr. J. Knox Jones Jr.* Lubbock, TX: Museum of Texas Tech University. 155-168.

Hutterer R. 1993. Order Insectivora. In: Wilson DE and Reeder DA, eds. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. 69–130.

Hutterer R. 2005. Order Soricomorpha. In: Wilson DE and Reeder DM, eds. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3rd edn ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 220-311.

Igea J, Aymerich P, Fernández-González A, González-Esteban J, Gómez A, Alonso R, Gosálbez J, Castresana J. 2013. Phylogeography and postglacial expansion of the endangered semi-aquatic mammal *Galemys pyrenaicus*. *BMC evolutionary biology* 13: 115.

Inger R, Gregory R, Duffy JP, Stott I, Voříšek P, Gaston KJ. 2015. Common European birds are declining rapidly while less abundant species' numbers are rising. *Ecology Letters* 18: 28-36.

Iza J, Castián E, Mendiola I, Peman E. 1985. Algunos aspectos de la ecología de los micromamíferos del País Vasco. *Munibe* 37: 101-110.

Jeong S-J, Yoon M-H, Kim S-H, Ham J-H, Lim D-S, Choi B-D, Park J-J, Jeong M-J. 2010. Age determination by tooth wear and histological analysis of seasonal variation of breeding in the lesser white-toothed shrew, *Crocidura suaveolens*. *Applied Microscopy* 40: 125-132.

Jiang X-I, Hoffmann RS. 2001. A revision of the white-toothed shrews (*Crocidura*) of southern China. *Journal of Mammalogy* 82: 1059-1079.

Kawecki TJ. 2008. Adaptation to Marginal Habitats. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39: 321-342.

Kraft R. 2000. Ehemalige und aktuelle Verbreitung von Hausspitzmaus, *Crocidura russula* (Hermann, 1780), und Gartenspitzmaus, *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811), in Bayern. *Bonner Zoologische Beiträge* 49: 115-130.

Krstufek B, Tvrkovic N. 1988. Insectivores and rodents of the central Dinaric Karst of Yugoslavia. *Scopolia* 15: 1-59.

Lesica P, Allendorf FW. 1995. When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* 9: 753-760.

Libois R, Ramalhinho MG, Fons R. 1999. *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811), the lesser-white toothed shrew. In: Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W, Kryštufek B, Reijnders PJH, Spitzenberger F, Stubbe M, Thissen JBM, Vohralík V and Zima J, eds. *The Atlas of European mammals*. London: Poyser Natural History. 72-73.

López-Fuster MJ. 1983. Sobre los géneros *Sorex* Linnaeus, 1758, *Suncus* Ehrenberg, 1833 y *Crocidura* Wagler, 1832 (Insectivora, Soricidae) en el nordeste de la península ibérica. Unpublished Ph D Thesis, University of Barcelona.

López-García JM. 2008. Evolución de la diversidad taxonómica de los micromamíferos en la península ibérica y cambios Paleoambientales durante el Pleistoceno Superior. Universitat Rovira i Virgili.

Maclean IM, Wilson RJ. 2011. Recent ecological responses to climate change support predictions of high extinction risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 12337-12342.

Madureira M, Magalhães C. 1980. Small mammals of Portugal. *Arquivos do Museu do Bocage, Publicação do Museu e Laboratório Zoológico e Antropológico, Faculdade de Ciências de Lisboa* 7: 179-214.

Madureira M, Ramalhinho M. 1981. Notas sobre a distribuição, diagnose e ecologia dos Insectivora e Rodentia portugueses. *Arquivos do Museu Bocage, Série A* 1: 165-263.

Martin PR, McKay JK. 2004. Latitudinal variation in genetic divergence of populations and the potential for future speciation. *Evolution* 58: 938-945.

Mienis H. 1996. Selective predation on *Monacha haifaensis* (Mollusca: Gastropoda) by *Crocidura suaveolens* (Mammalia: Insectivora). *Nachrichtenblatt der Ersten Vorarlberger Malakologische Gesellschaft* 4: 43-46.

Montoya P, Alberdi MT, Barbadillo LJ, van der Made J, Morales J, Murelaga X, Peñalver E, Robles F, Ruiz-Bustos A, Sánchez A, Sanchiz B, Soria D, Szyndlar Z. 2001. Une faune très diversifiée du Pléistocène inférieur de la Sierra de Quibas (province de Murcia, Espagne). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIA. Earth and Planetary Sciences* 332: 387-393.

Mortelliti A, Boitani L. 2009. Distribution and coexistence of shrews in patchy landscapes: A field test of multiple hypotheses. *Acta Oecologica* 35: 797-804.

Niethammer J. 1979. Arealveränderungen bei Arten der Spitzmausgattung *Crocidura* in der Bundesrepublik Deutschland. *Säugetierkundliche Mitteilungen* 27: 132-144.

Ohdachi SD, Iwasa MA, Nesterenko VA, Abe H, Masuda R, Haberl W. 2004. Molecular phylogenetics of *Crocidura* shrews (Insectivora) in east and central Asia. *Journal of Mammalogy* 85: 396-403.

Palomo L, Kryštufek B, Amori G, Hutterer R. 2016. *Crocidura suaveolens*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T29656A22296429. Available at: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T29656A22296429.en>. (Downloaded on 29 April 2019).

Palomo LJ, Gisbert J, Blanco JC. 2007. *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España*. Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU: Madrid.

Pascal M, Lorvelec O, Bioret F, Yésou P, Simberloff D. 2009. Habitat use and potential interactions between the house mouse and lesser white-toothed shrew on an island undergoing habitat restoration. *Mammal Research* 54: 39-49.

Pascal M, Lorvelec O, Vigne J-D. 2006. *Invasions Biologiques et Extinctions: 11000 ans d'histoire des Vertébrés en France*. Coédition Belin–Quae: Paris.

Pascal M, Siorat F, Lorvelec O, Yésou P, Simberloff D. 2005. A pleasing consequence of Norway rat eradication: two shrew species recover. *Diversity and Distributions* 11: 193-198.

Paupério J, Vale-Gonçalves HM, Cabral JA, Mira A, Bencatel J. 2017. Insetívoros. In: Bencatel J, Álvares F, Moura AE and Barbosa AM, eds. *Atlas de Mamíferos de Portugal*. 1^a ed. Universidade de Évora, Portugal. 256 pp.

Pernetta JC. 1973. The ecology *Crocidura suaveolens cassiteridum* (Hinton) in a coastal habitat. *Mammalia* 37: 241-256.

Pernetta JC. 1977. Activity and behaviour of captive *Crocidura suaveolens cassiteridum* (Hinton, 1924). *Acta theriologica* 22: 387-388.

Poitevin F, Catalan J, Fons R, Croset H. 1987. Biologie évolutive des populations ouest-européennes de crocidures (Mammalia, insectivora). II - Ecologie comparée de *Crocidura russula* Hermann, 1780 et de *Crocidura suaveolens* Pallas, 1811 dans le midi de la France et en Corse : rôle probable de la compétition dans le partage des milieux. *Revue d'Ecologie-la Terre et la Vie* 42: 32-58.

Qumsiyeh MB. 1996. *Mammals of the Holy Land*. Texas Tech University Press: Lubbock.

Rey J, Rey J. 1974. Nota preliminar sobre las musarañas del género *Crocidura* (Wagler, 1832) en las Islas Baleares. *Boletín de la Estación Central de Ecología* 3: 79-85.

Rey JM. 2007. *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811). In: Palomo LJ, Gisbert J and Blanco JC, eds. *Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España*. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad -SECEM-SECEMU. 125-127.

Rey JM, Landín A. 1973. Sobre la presencia de *Crocidura suaveolens* en el sur de Andalucía. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)* 71: 9-16.

Román J, Ruiz G. 2003. Nuevos datos sobre la distribución de la musaraña de campo *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811) en el sur de la península ibérica. *Galemys: Boletín informativo de la Sociedad Española para la conservación y estudio de los mamíferos* 15: 13-18.

Rood JP. 1965a. Observations on population structure, reproduction and molt of the Scilly shrew. *Journal of Mammalogy* 46: 426-433.

Rood JP. 1965b. Observations on the home range and activity of the Scilly shrew. *Mammalia* 29: 507-516.

Roques S, Berrebi P, Rochard E, Acolas ML. 2018. Genetic monitoring for the successful re-stocking of a critically endangered diadromous fish with low diversity. *Biological Conservation* 221: 91-102.

Ruiz-Bustos A, Vargas JM, Camprodón J, Sans-Coma V. 1984. Die Gartenspitzmaus, *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811) im Jungpleistozän (Wurm I) von Südspanien. *Säugetierkundliche Mitteilungen* 31: 251-256.

Rychlik L. 1998. Evolution of social systems in shrews. In: Wójcik JM and Wolsan M, eds. *Evolution of shrews*. Białowieża, Poland: Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences. 347-406.

Savarin A. 2006. About the record of *Crocidura suaveolens* Pallas, 1811 in Gomel city. *Fauna in anthropogenic landscape/ Pied ed. I. Zagorodnyuka.-Lugansk:* 133-135 (In belarusian).

Simeonovska-Nikolova DM. 2004. Seasonal changes in social behaviour and spatial structure of *Crocidura leucodon* in north-western Bulgaria. *Acta theriologica* 49: 167-179.

Sofianidou T, Vohralík V. 1991. Notes on the distribution of small mammals (Insectivora, Rodentia) in Epeirus, Greece. *Bonner Zoologische Beiträge* 42: 125-135.

Soriguer RC, Palomo LJ, López-Fuster MJ. 2001. *Crocidura suaveolens* (Pallas 1811). In: Franco Ruiz A and Rodríguez de los Santos M, eds. *Libro rojo de los vertebrados amenazados de Andalucía*. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. 217-218.

Spencer-Booth Y. 1956. Shrews (*Crocidura cassiteridum*) on the Scilly isles.

Proceedings of the Zoological Society of London 126: 167-170.

Spencer-Booth Y. 1963. A coastal population of shrews (*Crocidura suaveolens cassiteridum*). *Proceedings of the Zoological Society of London*. 140: 322-326.

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.

Taylor J. 1998. Evolution of energetic strategies in shrews. In: Wójcik J and Wolsan M, eds. *Evolution of shrews*. Białowieża, Poland: Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences. 425–448.

Tez C. 2000. Taxonomy and distribution of the white toothed shrews (*Crocidura*) (Soricidae: Insectivora: Mammalia) of Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 24: 365-374.

Thakur M, Schättin EW, McShea WJ. 2018. Globally common, locally rare: revisiting disregarded genetic diversity for conservation planning of widespread species. *Biodiversity and Conservation* 27: 3031-3035.

Thevenin JP. 2013. *Liste rouge des mammifères de la région Centre*. Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) Centre-Val de Loire.

Torre I, Raspall A, Arrizabalaga A, Díaz M. 2018. SEMICE: An unbiased and powerful monitoring protocol for small mammals in the Mediterranean Region. *Mammalian Biology* 88: 161-167.

IUCN-France, MNHN, SFEPM, ONCFS. 2017. *La Liste rouge des espèces menacées en France – Chapitre Mammifères de France métropolitaine*: Paris, France.

Valenzuela S, Poitevin F, Cornette R, Bournery A, Nadal J, Vigne J-D. 2009. Evolving ecosystems: ecological data from an Iron Age small mammal accumulation at Alorda Park (Catalonia, Spain). *Journal of Archaeological Science* 36: 1248-1255.

Van Dyck H, Van Strien AJ, Maes D, Van Swaay CAM. 2009. Declines in Common, Widespread Butterflies in a Landscape under Intense Human Use. *Conservation Biology* 23: 957-965.

Vlasák P, Niethammer P. 1990. *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811) - Gartenspitzmaus. In: Niethammer J and Krapp F, eds. *Handbuch der Säugetiere Europas*. Wiesbaden: Band 3/I, Insectivora, Primates, Aula Verlag.

Vogel P, Cosson J-F, López Jurado LF. 2003. Taxonomic status and origin of the shrews (Soricidae) from the Canary islands inferred from a mtDNA comparison with the European *Crocidura* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 271-282.

Vogel P, Jutzeler S, Rulence B, Reutter BA. 2002. Range expansion of the greater white-toothed shrew *Crocidura russula* in Switzerland results in local extinction of the bicoloured white-toothed shrew *C. leucodon*. *Acta theriologica* 47: 15-24.

Vogel P, Maddalena T, Catzeflis F. 1986. A contribution to taxonomy and ecology of shrews (*Crocidura zimmermanni* and *C. suaveolens*) from Crete and Turkey. *Acta theriologica* 31: 537-545.

Vogel P, Sofianidou T. 1996. The shrews of the genus *Crocidura* on Lesbos, an eastern Mediterranean island. *Bonner Zoologische Beiträge* 46: 339-347.

Vohralík V. 1988. Age determination and the population structure in *Crocidura suaveolens* (Mammalia, Insectivora) in Prague, Czechoslovakia. *Věstník Československé Společnosti Zoologické* 52: 63-74.

Wake DB, Vredenburg VT. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11466-11473.

Wilson DE, Mittermeier RA. 2018. *Handbook of the Mammals of the World - Volume 8: Insectivores, Sloths and Colugos*. Lynx Edicions: Barcelona.

Zabala J. 1985. Distribución y biometría del género *Crocidura* (Wagler, 1832) en el País Vasco. *Sociedad de Estudios Vascos, Cuaderno de Ciencias Naturales* 2: 71-94.

Zaitsev MV. 1991. Species composition and questions of systematics of white-toothed shrews (Mammalia, Insectivora) of the fauna of USSR. In: Zaitsev MV, ed. *Questions of Systematics, Faunistics and Paleontology of Small Mammals*. USSR: Proceedings of the Zoological Institute, USSR Academy of Sciences. 3-46.

Zaitsev MV, Voyta LL, Sheftel BI. 2014. *The mammals of Russia and adjacent territories. Lipotyphlans*. Nauka: Saint Petersburg.

Capítulo 2. Materiales y métodos

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este segundo capítulo se realiza una descripción de los materiales y métodos empleados para la consecución de los distintos objetivos propuestos. Dado que posteriormente, en los cuatro artículos que se presentan en el tercer capítulo de esta tesis, se lleva a cabo una descripción más detallada y técnica de la metodología usada, en este segundo capítulo se realiza una descripción más general y gráfica de la misma, con la intención de sintetizar las principales técnicas de campo y laboratorio usadas, permitiendo así una mejor comprensión y un conocimiento más completo de las mismas.

2.1 RESUMEN DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS PARA LOGRAR CADA OBJETIVO

1. Inferir la historia evolutiva de la musaraña de campo en la península ibérica

Para este objetivo fue necesario obtener muestras de ADN de todas las poblaciones conocidas de musaraña de campo en la península ibérica. La obtención de dichas muestras genéticas se llevó a cabo principalmente mediante dos técnicas de muestreo. Por un lado, se realizó una búsqueda de posaderos de lechuza común, en lugares de presencia conocida de la musaraña de campo, para recolectar egagrópilas y obtener ADN de los restos óseos (cráneos y mandíbulas) de esta musaraña. En el laboratorio, se analizaron las egagrópilas y se identificaron los restos óseos de los micromamíferos hallados en ellas. Para distinguir correctamente los restos óseos de musaraña de campo, se usó un conjunto de criterios morfológicos basados en caracteres craneales y dentales. Por otro lado, se llevaron a cabo numerosos trampenos en vivo, usando trampas modelo Trip Trap, para obtener muestras de tejido (de la oreja) de las musarañas de campo capturadas. Para la correcta identificación y distinción de la musaraña de campo, se usó un conjunto de criterios basados en las medidas y características morfológicas de la especie. En el caso de duda sobre la

identificación del ejemplar se tomaron muestras para la confirmación genética de la especie.

Además de estas dos técnicas de muestreo, se llevo a cabo una petición de muestras genéticas de la especie a nivel peninsular. En respuesta a dicha petición, se visitaron y revisaron distintas colecciones de micromamíferos en universidades, sociedades de investigación, espacios naturales y museos. Se obtuvieron muestras de las colecciones de la Universidad de Oviedo y de la Sociedad de Ciencias de Aranzadi (Guipúzcoa). También se obtuvieron algunas muestras a través de donaciones particulares, realizadas por gestores de espacios naturales e investigadores.

Las muestras genéticas obtenidas fueron conservadas y procesadas de distinto modo según su naturaleza (óseas o de tejido). El procesado de las muestras se realizó en varias etapas: digestión de las muestras, extracción del ADN, cuantificación del ADN y la amplificación y secuenciación, en este caso, del gen mitocondrial citocromo b. La confirmación genética de las muestras de ejemplares dudosos se realizó mediante un diagnóstico basado en marcadores moleculares como paso previo a la obtención de secuencias de ADN mitocondrial. Esta prueba diagnóstica consistió en la amplificación de un par de marcadores microsatélites (ADN nuclear), los cuales presentaban distinto tamaño (número de pares de bases, pb) en las dos especies de *Crocidura*; la constatación de la consistencia de este patrón en estudios previos permitió confirmar el carácter diagnóstico de especie de este ensayo. Finalmente, se llevo a cabo la secuenciación de fragmentos del gen mitocondrial citocromo b de las muestras de musaraña de campo obtenidas. Mediante diversos programas informáticos específicos, con las secuencias obtenidas se realizaron análisis filogenéticos y datación de divergencias, así como análisis de estructura, diversidad genética y demografía poblacional.

2. Clarificar la distribución de la musaraña de campo en el golfo de Cádiz

Para este objetivo se buscaron musarañas de campo entre los restos óseos de las egagrópilas de lechuza común. Al igual que para el objetivo anterior, fue necesaria la identificación inequívoca de los restos óseos de musaraña de campo. En este estudio se planificaron dos fases de muestreo. En un primer muestreo de egagrópilas de carácter intensivo, se buscaron posaderos de lechuza en un área de 3600 Km², localizada entre dos poblaciones conocidas de musaraña de campo del golfo de Cádiz: las marismas del Odiel-Tinto y las del Guadalquivir. Este primer muestreo fue realizado para saber si la musaraña de campo estaba asociada o no a determinados hábitats. La asociación potencial de la musaraña de campo a determinados hábitats fue inferida a través de tres métodos diferentes: (1) el análisis de los tipos de hábitats existentes en torno a los posaderos con presencia de musaraña de campo; (2) la aplicación del test de Thompson para conocer el patrón de distribución (uniforme, aleatorio o agregado) de estos posaderos con musaraña de campo, y (3) la construcción de un modelo para evaluar la probabilidad de presencia de musaraña de campo en una egagrópila en función de su distancia al hábitat de presencia potencial. En un segundo muestreo de egagrópilas, de carácter más dirigido, se buscaron posaderos de lechuza por el resto del golfo de Cádiz, ya focalizados en torno a los hábitats que se encontraron asociados a la musaraña de campo en el muestreo anterior. Finalmente, se usó el modelo de probabilidad construido para confirmar la presencia o ausencia de la especie en estos hábitats y clarificar su distribución regional.

3. Evaluar el estado génico de la musaraña de campo en el golfo de Cádiz

Para este objetivo fue necesario obtener muestras de ADN bien conservado (tejido de la oreja) de unas 20-30 musarañas de campo en cada una de las poblaciones halladas en el golfo de Cádiz. Para ello, se realizaron trampeos en vivo en todas estas

poblaciones, usando trampas Trip Trap. Para que el muestreo de cada población fuera representativo, las muestras se obtuvieron en distintas zonas dentro de cada población. De nuevo, hubo que identificar correctamente los ejemplares de musaraña capturados y recurrir a confirmación genética en caso de duda.

El procesado de las muestras constó de varias etapas: digestión de las muestras, extracción del ADN, cuantificación del ADN y la amplificación y genotipado, en este caso, de 10 marcadores microsatélites nucleares. La confirmación genética de las muestras de ejemplares dudosos se realizó empleando dos de estos marcadores microsatélites, los mismos que fueron usados para el objetivo 1. Finalmente, se llevó a cabo el tratamiento informático de los genotipos de musarañas de campo obtenidos. Se usaron programas específicos para realizar los análisis y conocer la estructura, grado de diferenciación, diversidad genética y estado demográfico de las distintas poblaciones.

4. Describir la selección de hábitat de la musaraña de campo y las relaciones interespecíficas con la musaraña gris en el golfo de Cádiz.

Para este objetivo se realizó un ciclo anual de trampeos en vivo (con trampas Trip Trap) de ambas especies de musarañas en los dos hábitats principales del Paraje Natural Marismas del Odiel, la marisma mareal y el bosque mediterráneo. Tanto en zonas de sintopía (donde ocurren las dos especies) como de alotopía (donde solo ocurre una de las especies). En cada zona y en cada estación del año se realizó una sesión de trámpeo de 3-4 noches consecutivas. Los ejemplares fueron asignados a una u otra especie por sus caracteres morfológicos recurriendo a confirmación genética en caso de duda. Para medir la disponibilidad y abundancia de presas (artrópodos), se dispusieron trampas de caída (vasos con agua y jabón) junto a los puntos de trámpeo de las musarañas. Los artrópodos fueron posteriormente identificados y su abundancia cuantificada en el laboratorio. Se estimaron valores de

biomasa seca de artrópodos usando ecuaciones alométricas. Finalmente, modelamos la presencia/ausencia de cada especie de musaraña en ambos hábitats y zonas, mediante modelos mixtos lineales generalizados.

2.2 PRINCIPALES TÉCNICAS DE MUESTREO

2.2.1 ANÁLISIS DE EGAGRÓPILAS DE LECHUZA COMÚN

La musaraña de campo es una especie elusiva y poco frecuente en la península ibérica. Hay además un gran desconocimiento sobre su ecología y distribución. Todo ello hace que capturarla con métodos de trámpeo convencionales sea complicado. El análisis de egagrópilas de lechuza común es una técnica efectiva y económica para el estudio de pequeños mamíferos a escalas de paisaje o superiores (Avenant, 2005; Heisler et al., 2016). Además, la lechuza común es una especie abundante en la península ibérica, y en particular en el golfo de Cádiz, y las musarañas suelen ser una de sus presas más frecuentes (Roulin, 2002). Por otro lado, las egagrópilas presentan la ventaja de ser un método de muestreo no invasivo útil para conocer la presencia de la especie y para la obtención de ADN (Taberlet & Fumagalli, 1996; Buš et al., 2014; Guimaraes et al., 2016).

-Recolección, almacenamiento y registro de los lotes de egagrópilas

Las egagrópilas se recolectaron manualmente (Fig. 1) y se almacenaron en bolsas hasta su posterior análisis (Fig. 2). En estas bolsas, se introdujeron pastillas antipolillas y se registró la fecha de recolección junto al nombre, localización y coordenadas geográficas del posadero muestreado.



Figura 1. Recolección de egagrópilas de lechuza común (*Tyto alba*) en el posadero Molino del Aceite, Barbate (Cádiz). Fecha: 30/05/2012.



Figura 2. Lote de egagrópilas almacenado en bolsa, etiquetado y conservado con antipolillas.

-Análisis de egagrópilas

El análisis de las egagrópilas se realizó en el Laboratorio de Aguas Epicontinentales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva. Los útiles necesarios para el análisis de las egagrópilas se muestran y detallan en la figura 3. Existen dos métodos de análisis de egagrópilas, el método húmedo y el método seco, que se diferencian principalmente en el uso o no de agua para su análisis. En este estudio usamos el método seco que consiste en desmenuzar las egagrópilas con las manos, separando por un lado los restos óseos de interés, y por otro los pelos (Fig. 4). Tras la extracción y separación de los restos óseos (Fig. 5), se procedió a la identificación de las especies con la ayuda de una lupa binocular y claves de identificación (Gosàlbez, 1987; Calzada & Román, 2017). Una vez identificados, los restos óseos fueron introducidos en sobres de papel. Estos sobres fueron almacenados en bolsas de plástico herméticas con cierre zip que contenían gel de sílice, para absorber la humedad y evitar el crecimiento de hongos sobre los restos óseos que pudieran deteriorarlos.

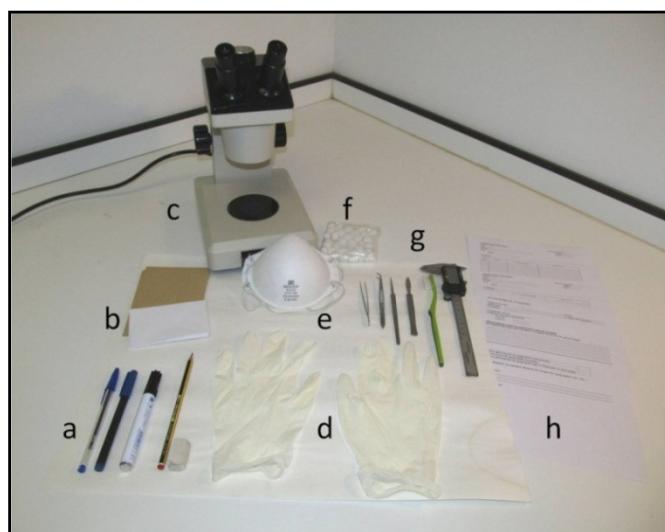


Figura 3. Útiles para el análisis de las egagrópilas: a) material de escritura: bolígrafo, rotuladores indelebles, lápiz y goma; b) sobres de papel; c) lupa binocular; d) guantes; e) mascarilla; f) antipolillas; g) material de laboratorio: pinzas de punta fina, aguja enmangada, escalpelo, cepillo y calibre; h) fichas donde anotar los datos.



Figura 4. Análisis de una egagrópila. En la imagen se observa un cráneo completo (con mandíbulas inferiores) de un ejemplar de musaraña de campo, *Crocidura suaveolens*.



Figura 5. Restos óseos hallados en el interior de una egagrópila. Es este ejemplo se muestra de izquierda a derecha los restos óseos de tres ejemplares de *Crocidura russula*, un *Microtus duodecimcostatus* y dos ejemplares de *Discoglossus galganoi*.

-Criterios de identificación para los restos óseos de *Crocidura suaveolens* y *Crocidura russula*

La musaraña de campo es una especie extremadamente similar a la musaraña gris, siendo ambas especies muy difíciles de diferenciar. Por ello, para la identificación de sus restos óseos (cráneos y mandíbulas), es necesario el uso de varios criterios diagnósticos que deben ser considerados en conjunto, ya que el uso de un solo criterio no suele ser suficiente para distinguir ambas especies con certeza. Además, algunos de estos criterios son relativos, por lo que se necesita adquirir cierta experiencia para realizar una correcta distinción entre estas especies. En la figura 6 se muestran las series dentales superiores e inferiores de las musarañas del género *Crocidura*, y a continuación, se exponen los principales criterios usados para la identificación de *C. suaveolens* y *C. russula* (Calzada & Román, 2017):

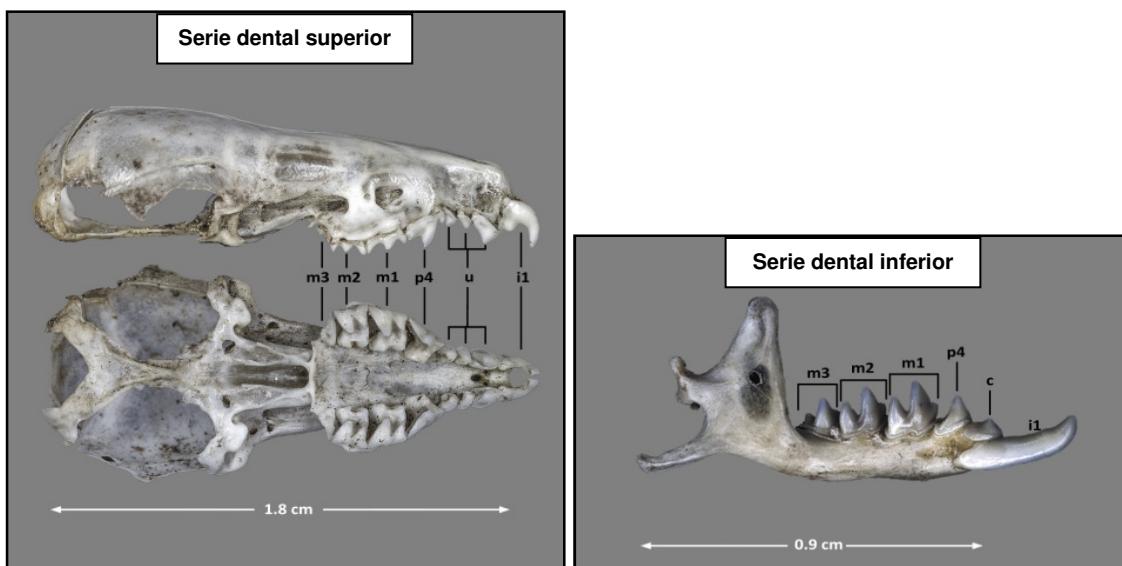


Figura 6. Series dentales superiores e inferiores de las musarañas del género *Crocidura*
(m: molares; p: premolar; u: unicúspides; c: canino; i: incisivo)

-Criterio 1: Morfología del borde superior del premolar p⁴.

- Contorno de la parte superior del borde labial, a la altura del parastilo del p⁴, circular (**a**) con un gran desarrollo. La parte posterior termina normalmente

por detrás (**b**) de la gran cúspide del metacono (**c**). Cíngulo más desarrollado.

► ***Crocidura suaveolens*** (Fig. 7A).

- Contorno de la parte superior del borde labial, a la altura de parastilo del p^4 , anguloso (**d**), menos desarrollado, y que termina (**e**) normalmente por delante de la gran cúspide del metacono (**c**). Cíngulo menos desarrollado.

► ***Crocidura russula*** (Fig. 7B).

El cíngulo es un abultamiento que se produce en la base de la corona dental, donde ésta contacta con las raíces.

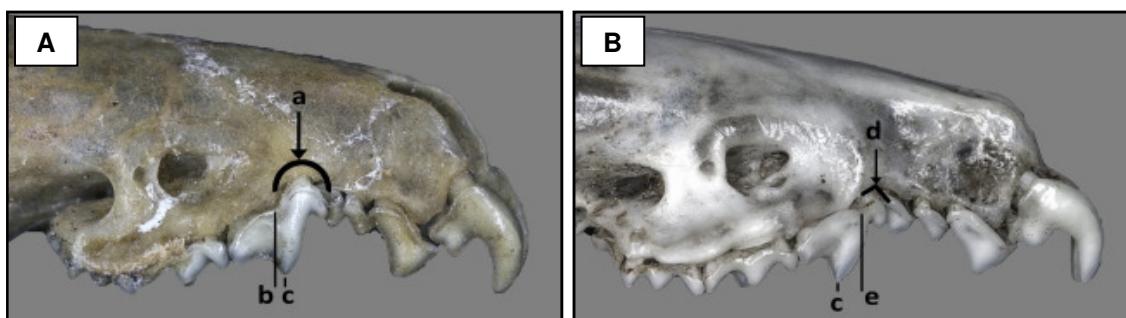


Figura 7. A) Morfología del borde superior del premolar p^4 de *C. suaveolens* y B) de *C. russula*.

-Criterio 2: Forma del cíngulo del molar m_2 .

- El cíngulo del m_2 no presenta en la parte labial una constricción central, presentando un perfil ligeramente cóncavo. ► ***Crocidura suaveolens*** (Fig. 8A).
- El cíngulo del m_2 presenta en la parte labial una constricción central, que le confiere un aspecto sinuoso. ► ***Crocidura russula*** (Fig. 8B).

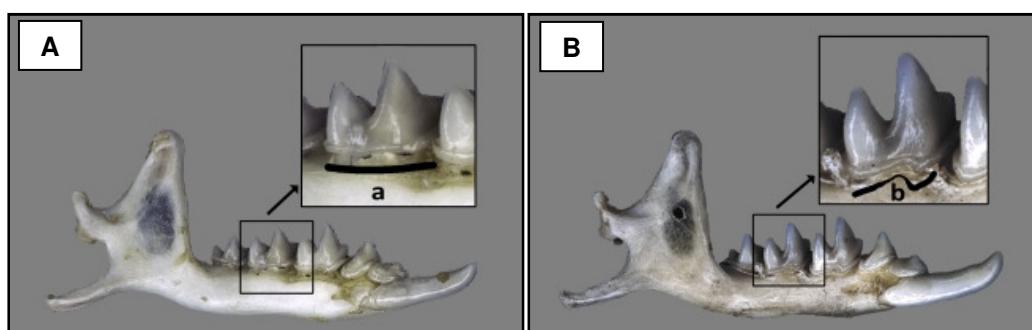


Figura 8. A) Forma del cíngulo del molar m_2 de *C. suaveolens* y B) de *C. russula*.

-Criterio 3: Protocono del premolar p⁴.

- En vista oclusal el protocono del p⁴ (**a**) se encuentra desplazado hacia el borde labial, mostrando en ocasiones una arista anterointerna (**b**). ► ***Crocidura suaveolens*** (Fig. 9A).
- En vista oclusal el protocono del p⁴ (**c**) se encuentra al mismo nivel que el borde lingual de dicho diente (**d**). ► ***Crocidura russula*** (Fig. 9B).

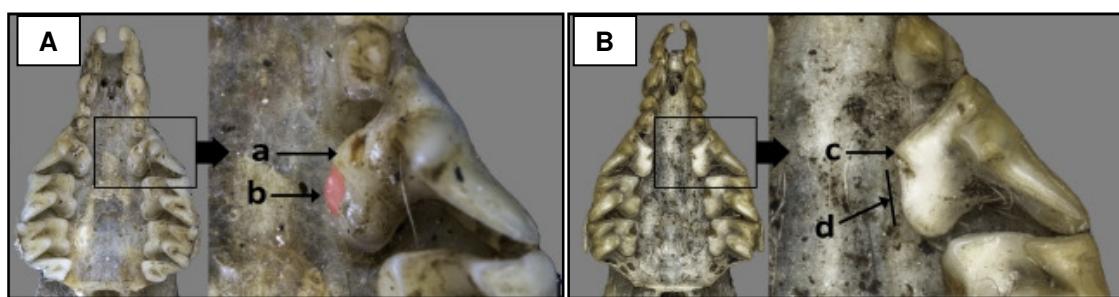


Figura 9. A) Protocono del premolar p⁴ de *C. suaveolens* y B) de *C. russula*.

-Criterio 4: Relieve de la barra ósea del espacio mesopteroideo.

- Relieve de la barra ósea del espacio mesopteroideo en forma de X con los brazos posteriores (**a**) más desarrollados que los anteriores (**b**). ► ***Crocidura suaveolens*** (Fig. 10A).
- Relieve de la barra ósea del espacio mesopteroideo en forma de X con los brazos semejantes en tamaño (**c, d**). ► ***Crocidura russula*** (Fig. 10B).

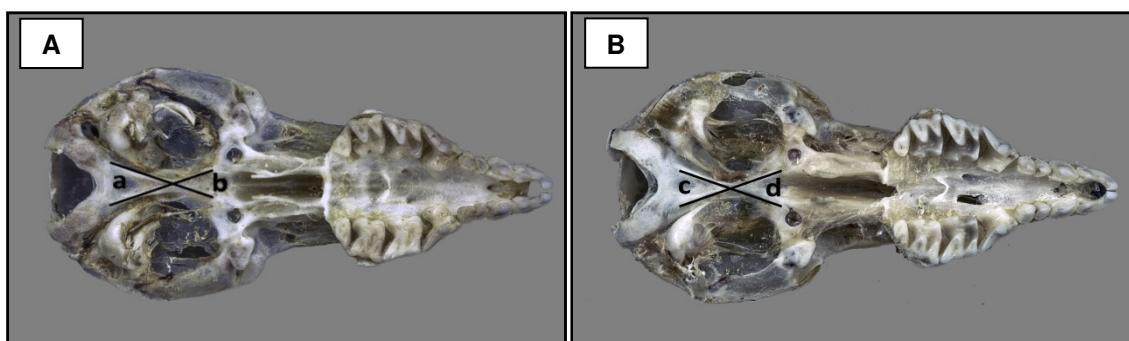


Figura 10. A) Relieve de la barra ósea del espacio mesopteroideo de *C. suaveolens* y B) de *C. russula*.

2.2.2 TRAMPEO EN VIVO DE MUSARAÑAS

-Trampas y diseño de muestreo

La captura de musarañas se realizó con trampas de captura en vivo modelo Trip Trap (Fig. 11), cebadas con gusanos de la harina vivos (larvas de *Tenebrio molitor*). Las trampas se pusieron dentro de botellas de plástico (cortando su boca) para evitar que las trampas se mojaran (Fig. 12). El agua puede evitar que la puerta se cierre manteniéndola pegada a la pared superior.

El trampeo en vivo fue utilizado para los estudios de filogeografía (objetivo 1), genética poblacional (objetivo 3) y selección de hábitat (objetivo 4). En los tres estudios, el diseño de muestreo realizado fue bastante similar. Las trampas fueron instaladas en líneas de trámpero compuestas por entre 7 y 15 puntos de trámpero. En cada punto de trámpero se instalaron 3 trampas para evitar la saturación de las trampas por otros micromamíferos y aumentar así la probabilidad de captura de musarañas. La localización geográfica de los puntos junto a otros datos de interés (fecha, lugar, zona, condiciones meteorológicas, tráperos, hora solar de activación y cierre, hora solar de revisión, número de revisión y número identificativo del punto) fueron registrados. En cada sesión de trámpero, las trampas permanecieron activas durante 3-4 noches consecutivas. Las trampas permanecieron activas tanto de día como de noche y fueron revisadas dos veces al día, al amanecer y al atardecer. En cada revisión, las trampas con ejemplares capturados fueron reemplazadas por trampas limpias.



Figura 11. Trampa de captura en vivo para micromamíferos modelo Trip Trap.



Figura 12. Trampa Trip Trap activada y ubicada dentro de una botella de plástico.

El diseño de muestreo se modificó en ocasiones según las necesidades específicas del objetivo y subobjetivos de cada estudio. Así, para el estudio de selección de hábitat se realizó un ciclo anual de trampeos, llevando a cabo sesiones de trámpeo en las mismas zonas del Paraje Natural Marismas del Odiel en cada estación del año. En cambio, para los estudios genéticos de filogeografía y genética poblacional, se llevaron a cabo sesiones de trámpeo puntuales en distintas poblaciones de la especie hasta obtener un determinado número de muestras requeridas. Por otro lado, en el golfo de Cádiz, el estudio de distribución permitió conocer los hábitats de presencia de la especie (objetivo 2), por lo que los trampeos posteriores para los estudios de genética poblacional y selección de hábitat pudieron ser dirigidos a esos hábitats. Sin embargo, para el estudio filogeográfico realizado a lo largo de la península ibérica, no se contaba con información sobre los hábitats de presencia de la especie. Así pues, en primer lugar, se recopilaron las localidades en las que se hubiera citado a la musaraña de campo. Luego, se seleccionó una serie de localidades donde ir a tramppear teniendo en cuenta que toda la distribución ibérica de la especie quedara cubierta. Se realizó una

revisión bibliográfica de los hábitats citados para la musaraña de campo en cada zona, en zonas próximas, o incluso en zonas alejadas pero con una climatología u orografía similar. Con toda esta información se trampó en aquellos hábitats donde era más probable que la especie estuviera presente. Cuando las citas provenían de posaderos de lechuza, los puntos de trámpero se instalaron a menos de 3 km de dichos posaderos, ya que las lechuzas a menudo cazan por debajo de esa distancia (Torre et al., 2015).

-Manejo de individuos, toma de datos biométricos y recolección de muestras de ADN (tejido)

Para conseguir sujetar e inmovilizar a las musarañas capturadas se usaron bolsas de plástico grandes con cierre zip en cuyo interior se introducía la trampa y una sola mano, con la que se procedía a la apertura de la trampa y sujeción del ejemplar capturado. Una vez sujetos e inmovilizados, los ejemplares eran sexados, pesados y medidos (Fig. 13). El sexado se realizó ejerciendo una ligera presión en la parte genital anterior que permitió hacer visible el pene en los machos. También se comprobó la presencia de mamas en hembras. Para el pesaje de los individuos se utilizó una balanza digital (precisión de décimas de gramo) y pequeños recipientes de plástico en cuyo interior se introducía el ejemplar capturado. Para la medición de los individuos se usó una regla graduada (precisión de milímetros) y un calibre digital (precisión de centésimas de milímetros). Se registraron los siguientes datos biométricos: longitud total, longitud de la cola, oreja y pie posterior. Las medidas y la coloración de la especie fueron utilizadas para la identificación de la especie (desarrollado en el siguiente apartado). Otras observaciones como los signos de estado reproductor (mamas desarrolladas o preñez en hembras, glándulas de olor en machos), amputaciones, parásitos y excreciones fueron también registradas. Toda esta información se anotó en fichas de captura como la mostrada en la figura 14. Finalmente, se tomó una pequeña muestra de tejido de la oreja (Fig. 15), usando para

ello unas tijeras y unas pinzas previamente desinfectadas con alcohol. Las tijeras y las pinzas también fueron lavadas con lejía y agua entre cada toma de muestra para evitar la contaminación de ADN. Las muestras de tejido fueron guardadas en tubos Eppendorf de 2 ml con etanol al 96%. Estos tubos fueron identificados con el código del ejemplar capturado y conservados a 4°C hasta su posterior análisis en el laboratorio. El corte de tejido de la oreja permitió también la identificación de ejemplares recapturados. Tras la toma de muestra los ejemplares eran inmediatamente liberados en el lugar de captura.



Figura 13. Sexado, pesaje y medición de individuos capturados.

FICHA DE CAPTURA DE MICROMAMÍFEROS PROYECTO CROCIDURA SUAVEOLENS			
			Código:
Fecha:	Zona:	Revisión N°:	
Lugar:	Hora solar:		
Coor X:	Clima:	Hora ultima revisión:	
Coor Y:	Tramperos:	Trampa N°:	
Tipo de trampa: (TTrugusano:), (Vaso agua y jabon:), otro:			
Especie (por aspecto): Códigos previos: Especie por genética: Sexo: Longitud total: Fecha confirmación genética: Edad: Cola: Parasitos: Loc: Peso: Ano-meato: Testículos visibles: Oreja: Pie posterior: Gland. lat: GD: Olor: Mamas: GD:		Recaptura:	Marca en:
COLOR: 1 Dorso: 2 Vientre: 3 Flanco o transición: 4 Dorso del pie posterior: 5 Orejas: 6 Mandíbula inferior: 7 Garganta: 8 Lateral hocico: 9 Superior hocico: 10 General de la cola: 11 Pelos base de la cola:			
Tipo de Muestras Código Observaciones Fotos: Echa lípidos: Tejido: O: Prenada: Excrementos: Munones, etc. Parasitos: Desplazamiento desde a Cadáver: Muerto en trampa: Medidas en muerto: *Peso en muerto:			

Figura 14. Ficha de captura de musarañas donde se registraba la información del muestreo realizado y los datos biométricos y morfológicos de los individuos capturados.

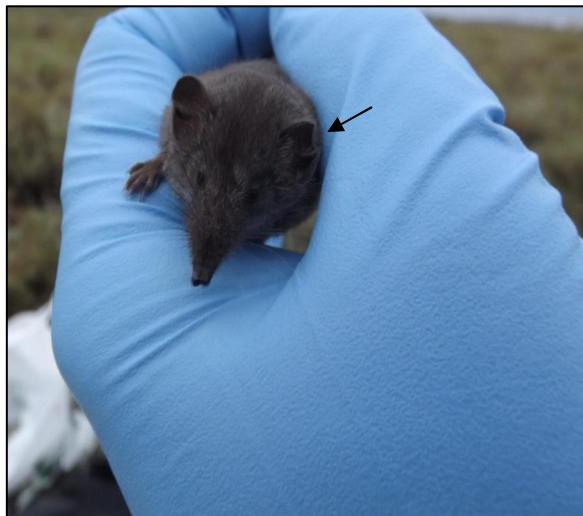


Figura 15. Ejemplar de musaraña de campo tras la obtención de una muestra de tejido en su oreja izquierda (flecha negra).

-Principales criterios morfológicos para la identificación de *Crocidura suaveolens* y *Crocidura russula*

Existen criterios morfológicos basados en datos biométricos y de coloración para identificar ambas especies (Aulagnier et al., 2009). Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, ambas especies son muy similares morfológicamente y difíciles de diferenciar. Además, estas especies presentan una morfología muy variable (Hutterer, 2005; López-Fuster, 2007), por lo que dependiendo de la zona de estudio los criterios generales descritos necesitan ciertas correcciones o matizaciones. Debido a estas dificultades, en muchas de las poblaciones ibéricas estudiadas fue necesario recurrir a confirmación genética. Sin embargo, en las poblaciones del golfo de Cádiz, la experiencia acumulada permitió la selección de una serie de criterios morfológicos que permiten la identificación inequívoca de ambas especies.

En las poblaciones del golfo de Cádiz ambas especies presentan coloraciones ligeramente diferentes que pueden ser muy útiles para su identificación (Fig. 16). *C. suaveolens* tiene un pelaje gris oscuro (jarra) y pardo (borra), salvo en el vientre donde este es algo más claro con tonos blancuzcos y amarillentos. La delimitación dorso-

vientre no está muy marcada. Además, las zonas laterales del hocico, mandíbula inferior, patas, orejas y cola son grises oscuras de un tono similar al pelaje del dorso. En cambio, *C. russula* presenta una coloración general más clara, con un pelaje gris claro (jarra) y pardo (borra) en el dorso, siendo su vientre bastante más blanquecino. La delimitación dorso-vientre es mucho más patente que en *C. suaveolens*. Además, en *C. russula* los laterales del hocico, mandíbula inferior, patas, orejas y cola presentan tonos rosados que son fácilmente apreciables.

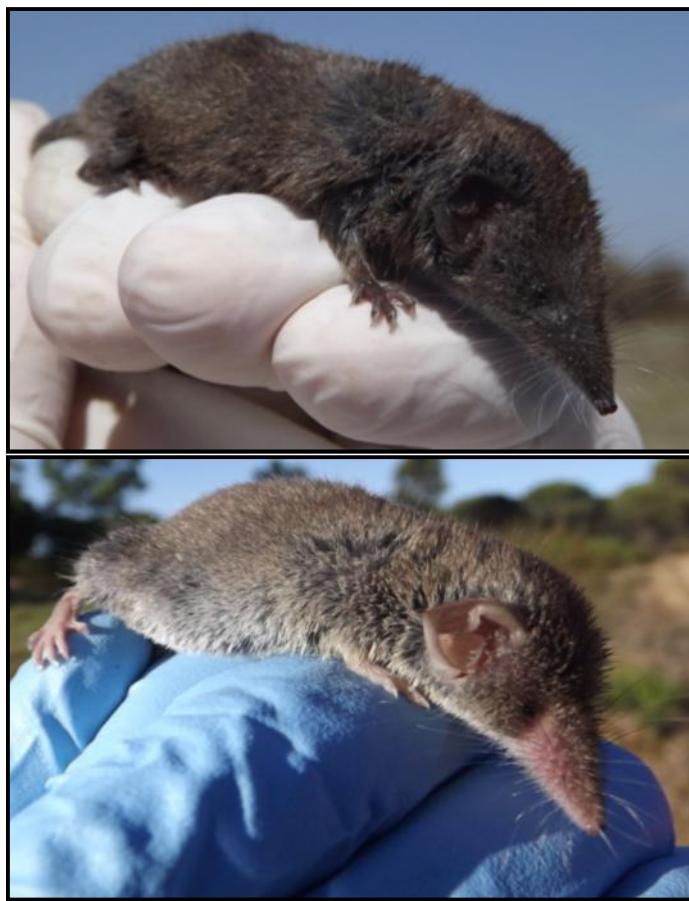


Figura 16. Ejemplar capturado de musaraña de campo (*C. suaveolens*, arriba) y de musaraña gris (*C. russula*, abajo). Nótese las distintas coloraciones del pelaje, laterales del hocico, orejas y patas en ambas especies.

El tamaño no es un criterio útil es las poblaciones occidentales del golfo de Cádiz (Guadiana, Piedras, Odiel, Tinto y Estero Domingo Rubio). Aquí las *C. suaveolens* son grandes y sus medidas se solapan con las de *C. russula*. Las *C. suaveolens* de la

población del Guadalquivir son menores y, aunque las medidas siguen solapando con las de *C. russula*, el tamaño relativo puede ayudar a diferenciar entre ambas especies.

Por último, un par de criterios también bastante útiles y aplicables a todas las poblaciones del golfo de Cádiz son la longitud de la cola y la proporción de esta longitud respecto a la longitud cabeza-cuerpo (desde el hocico hasta el inicio de la cola). Los individuos de *C. suaveolens* presentan una longitud de cola mayor y proporcionalmente más larga respecto a la longitud cabeza-cuerpo que los de *C. russula*. En *C. suaveolens* la longitud de la cola suele ser mayor de 40 mm y su proporción respecto a la longitud cabeza-cuerpo mayor del 55%. En *C. russula* la longitud de la cola rara vez supera los 40 mm de longitud y en todo caso su proporción respecto a la longitud cabeza-cuerpo suele estar en torno al 50%.

2.2.3 MUESTREO DE ARTRÓPODOS

-Trampas y diseño de muestreo

Para medir la disponibilidad y abundancia relativa de presas (artrópodos) en los distintos hábitats estudiados en el golfo de Cádiz (para el objetivo 4b) se usaron trampas de caída (pitfall), consistentes en vasos de plástico de 7.5 cm de diámetro y 11.7 cm de altura que fueron enterrados hasta dejar la parte superior del vaso al mismo nivel que el suelo (Siewers et al., 2014). Los vasos fueron llenados con agua hasta un tercio de su capacidad y se añadieron unas gotas de jabón líquido para romper la tensión superficial del agua y permitir que los artrópodos quedaran atrapados inmersos en el agua.

El trampeo de artrópodos se realizó de manera simultánea al trampeo de musarañas. Se instalaron 3 trampas de caída a lo largo de cada línea de trámpeo para musarañas. Al igual que las trampas para musarañas, las trampas de caída para artrópodos permanecieron activas 3-4 noches en cada sesión de trámpeo y fueron revisadas dos veces al día, al amanecer y al atardecer. La recolección de los artrópodos se hizo

mediante el filtrado del líquido del vaso. A continuación, los artrópodos fueron almacenados en pequeños botes de plástico (capacidad de 20ml) con etanol 96%. Los botes fueron etiquetados con la fecha y hora solar de recolección, así como con el código que identificaba la trampa de artrópodos.

-Identificación y cuantificación de artrópodos

La identificación y cuantificación de los artrópodos capturados se realizó en el Laboratorio de Aguas Epicontinentales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva con la ayuda de una lupa binocular y distintas claves de identificación (Dick, 1985; Barrientos, 1988; Zahradník, 1989). Los artrópodos fueron identificados hasta el menor nivel taxonómico que fue posible. Todos los ejemplares fueron cuantificados y medidos (longitud total) con un precisión de 0,5 mm. Finalmente, para cada hábitat y estación del año, se estimó el número de ejemplares promedio de cada Clase de artrópodos capturados por trampa y la biomasa (masa seca) promedio por trampa (Datos suplementarios SD1 del artículo 4). La biomasa de artrópodos fue estimada usando distintas ecuaciones alométricas.

2.3 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS GENÉTICAS

El análisis y procesamiento de las muestras genéticas se llevo a cabo en el Laboratorio de Ecología Molecular (LEM) de la Estación Biológica de Doñana (EBD), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Sevilla. Tanto para las muestras óseas como de tejido se realizó un protocolo de actuación que constó de cinco grandes etapas: conservación de las muestras, extracción del ADN de las muestras, cuantificación del ADN, amplificación de regiones de interés y secuenciación. Sin embargo, los procesos realizados dentro de estas etapas fueron diferentes en función de la naturaleza de las muestras (hueso o tejido) y del objetivo perseguido en cada estudio (objetivos 1 y 3, estudio de filogeografía y genética poblacional, respectivamente).

-Conservación de las muestras

Las muestras óseas (mandíbulas y cráneos) de musaraña de campo obtenidas de las egagrópilas de lechuza común fueron conservadas a temperatura ambiente en sobres de papel. Estos sobres a su vez fueron almacenados dentro de bolsas de plástico herméticas con cierre zip que contenían gel de sílice para absorber la humedad y evitar el crecimiento de hongos que pudieran deteriorar las muestras.

Por otro lado, las muestras de tejido fueron conservadas en tubos Eppendorf de 2ml con etanol al 96% y almacenadas a 4 °C (en nevera), cuando la extracción posterior del ADN iba a realizarse a corto-medio plazo (pocas semanas o meses), y a -80 °C (criocongelador), cuando no estaba previsto su extracción a corto-medio plazo.

-Extracción del ADN

Este proceso requiere de dos etapas. En una primera etapa se realiza la digestión de las muestras, donde se produce la disagregación de las células y la lisis de las membranas, de forma que se obtiene un homogeneizado de componentes celulares. En otra etapa posterior, se realiza la extracción del ADN propiamente dicha. Para la digestión y extracción del ADN de las muestras se utilizaron procedimientos distintos según la naturaleza de las muestras.

Las muestras óseas fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas usando un molino de bolas (RETSCH Mod.MM301) o un mortero (Fig. 17). El polvo obtenido fue incubado con tampón de digestión y proteinasa K, enzima usada para la digestión de proteínas. Posteriormente, la extracción del ADN se realizó usando un protocolo de sílice-guanidinio (método C en Rohland & Hofreiter, 2007). En este método, la extracción se lleva a cabo utilizando partículas de sílica, un polímero al que se adhiere el ADN en presencia de altas concentraciones de sales. Tras sucesivos lavados para purificar la muestra, se recupera el ADN retenido por la sílica incubando en una

solución de baja concentración iónica. El volumen de elución final de los extractos fue de 50 µL y los extractos fueron almacenados a 4 °C hasta su uso. Debido a la baja calidad de ADN de estas muestras óseas, la extracción se realizó en un laboratorio usado exclusivamente para muestras de baja calidad de ADN, se utilizó material desechable nuevo para la extracción de cada muestra y la superficie de trabajo se limpió con lejía entre muestras para evitar la contaminación. Además, se incluyeron blancos de extracción en cada ronda de extracción.



Figura 17. Molino de bolas RETSCH Mod.MM301 (izquierda) y mortero (derecha) para la pulverización de muestras óseas.

Para la digestión de las muestras de tejido, las muestras fueron troceadas en pequeños trozos (1 mm aproximadamente) e incubadas con tampón de digestión Longmire y proteinasa K. La extracción del ADN de las muestras de tejido se llevó a cabo usando el kit de tejido NucleoSpin 96 (Macherey-Nagel & Co.KG, Düren, Germany) o un protocolo “salting-out” (Müllenbach et al., 1989), modificado por Centeno-Cuadros et al. (2009). En este método, se realizan dos precipitaciones sucesivas de proteínas mediante la adición de altas concentraciones de LiCl, seguidas de dos extracciones consecutivas con cloroformo-isoamílico. Luego, se precipita el ADN con acetato sódico y etanol y se recupera mediante centrifugación. Posteriormente el pellet de ADN se seca y resuspende en TLE (10 mM Tris-HCl, 0,1

mM EDTA-Na). El volumen de elución final de los extractos fue de 50 µL y los extractos fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

-Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN tanto de muestras óseas como de tejido se realizó en la mayoría de los casos mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 18). La concentración de agarosa usada fue 0.8%. En esta técnica, los extractos de las distintas muestras son tratadas con un colorante específico (SYBR-green) para hacerlos visibles bajo luz ultravioleta (UV). Luego, los extractos son depositados dentro de unas ranuras realizadas en un gel de agarosa sumergido en una disolución buffer, la cual está contenida en una cubeta de plástico. Junto a los extractos se deposita una escala de concentraciones conocidas de ADN como referencia. Mediante la aplicación de una corriente eléctrica, los fragmentos de ADN migran a través del gel. La dirección de migración es desde el electrodo negativo (cátodo) al positivo (ánodo). Cuando finaliza la electroforesis, se realiza una fotografía del gel bajo luz UV que permite observar la posición de las bandas y obtener, gracias a la comparación con la escala de referencia, la concentración de ADN de las distintas muestras.

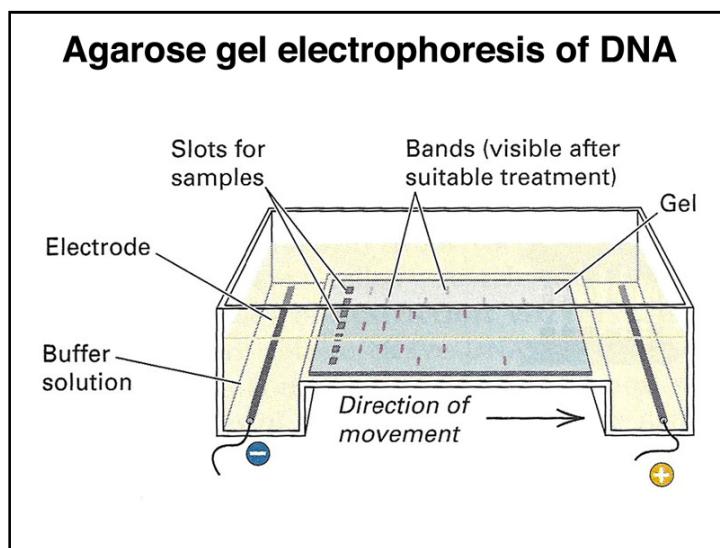


Figura 18. Cuantificación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (Fuente: <http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/images/gelbox.jpg>).

Otras veces, la cuantificación del ADN de muestras de tejido se realizó mediante espectrofotometría usando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) (Fig. 19). Esta técnica emplea la ecuación de Beer-Lambert para correlacionar absorbancia y concentración. Ecuación de Beer-Lambert resuelta para concentración: $c = A / (\varepsilon * b)$, donde c es concentración de analitos en moles/litro o molaridad (M), A es absorbancia UV en unidades de absorbancia (AU), ε es coeficiente de absorvedad molar dependiente de longitud de onda (o coeficiente de extinción) expresado en litro/mol-cm y b es el camino óptico en cm.

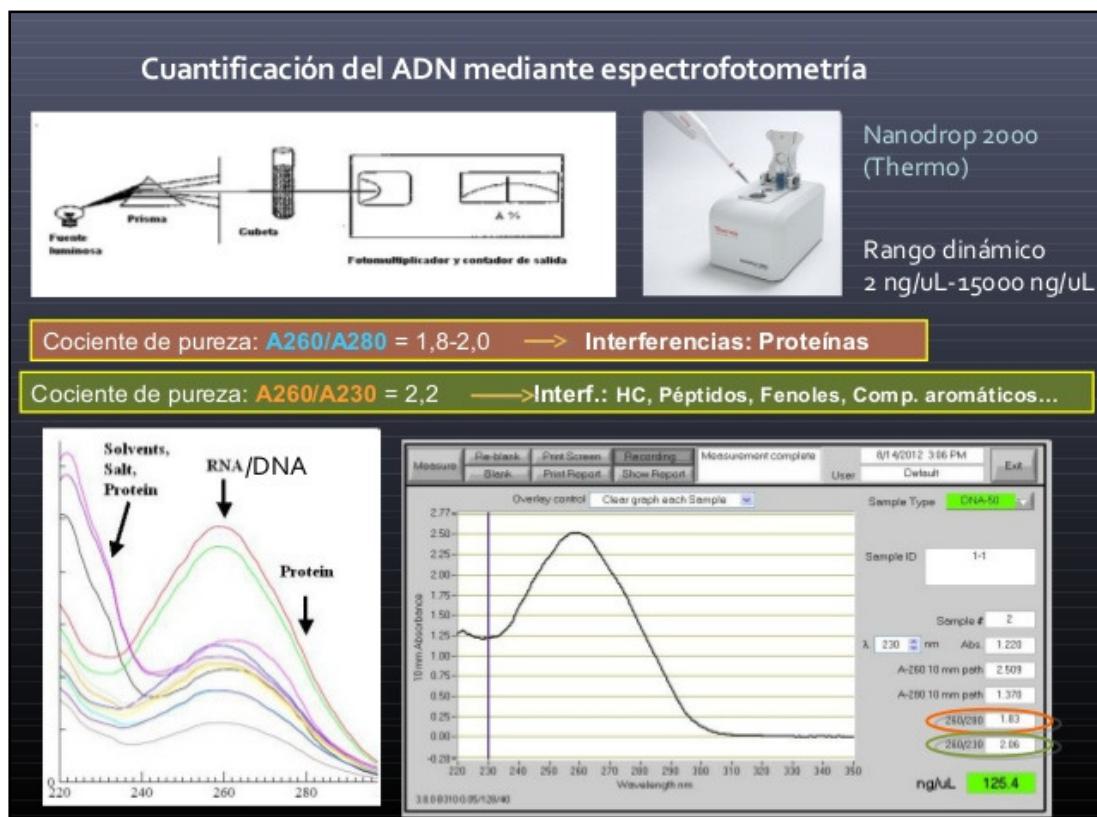


Figura 19. Cuantificación del ADN mediante espectrofotometría usando Nano Drop 2000 (Fuente: <https://es.slideshare.net/josecdeltoro1/5-fu-dpyd-extraccion-ctdna>).

-Amplificación y Secuenciación

Para el estudio de filogeografía (objetivo 1) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se secuenció un fragmento de 1251 pb que incluyó

el gen mitocondrial citocromo b. Para las muestras de tejido se pudo amplificar y secuenciar este fragmento usando una sola pareja de cebadores (L14734/H15985; Ohdachi et al., 2001). Sin embargo, para las muestras óseas, dado la mayor fragmentación del ADN, se diseñaron cinco pares de cebadores internos parcialmente superpuestos (Tabla S2 del artículo 1). El método de secuenciación empleado fue el método de secuenciación por didesoxinucleótidos, más conocido como el método de Sanger. Este método se basa en el proceso biológico de la replicación del ADN, pero incorporando de forma aleatoria didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia. Estos didesoxinucleótidos, a diferencia de los deoxinucleótidos normales o bases nitrogenadas que componen el ADN, carecen del grupo hidroxilo (OH) del carbono 3', de manera que cuando uno de estos didesoxinucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, esta cadena no puede continuar elongándose. Esto sucede porque la enzima ADN polimerasa necesita un grupo terminal 3' OH para formar un enlace fosfodiéster y añadir el siguiente nucleótido, pero el dideoxinucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo. Este método requiere una primera ronda de amplificación, por PCR, de los fragmentos de ADN de interés, donde se usaron los cebadores arriba descritos. Se usaron controles positivos y negativos de PCR. El control positivo sirve para comprobar si la reacción ha funcionado correctamente y el control negativo sirve para detectar contaminación en la mix de reacción. El resultado de la amplificación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa, usando de referencia una escala de fragmentos de ADN de tamaño conocido, en lugar de una escala de concentraciones como en el caso de la cuantificación, y comprobando la existencia de una banda del tamaño del fragmento de interés en los productos de PCR (Fig. 20). A continuación, los productos de PCR se tratan con una mix enzimática llamada Antarctic, cuya función es degradar los fragmentos pequeños de ADN que carecen de interés para que no adquieran fluorescencia en la siguiente ronda de PCR, ya que estos meterían ruido en la lectura final del secuenciador. La incubación se

realiza durante 45 minutos a 37°C, que es la temperatura a la que esta enzima trabaja, y luego se realiza un choque térmico (15 minutos a 80 °C) para desactivar la enzima. Posteriormente, se realiza una segunda ronda de PCR donde se incorpora la fluorescencia. En esta ocasión, los fragmentos de ADN de interés se desnaturalizan y actúan como hebra molde. Además del ADN molde, se precisa de los cebadores (directo, forward; e inverso, reverse) por separado, lo que implica dos réplicas por muestra, así como la enzima *Taq* Polimerasa y su cofactor MgCl₂, una solución tampón, los cuatro deoxinucleótidos y los cuatro dideoxinucleótidos marcados. Se empleó el kit de secuenciación Big Dye Terminator (Applied Biosystems), que proporciona una solución con la mezcla adecuada de estos componentes. El siguiente paso es realizar una purificación de los productos de PCR obtenidos haciéndolos pasar por columnas de Sephadex, una marca registrada de gel dextrano. Estas columnas de Sephadex lo que hacen es retener moléculas pequeñas (bases nitrogenadas marcadas, cebadores, etc) que podrían afectar a la secuenciación y dejan pasar sólo las moléculas grandes, es decir, nuestros fragmentos de interés. Finalmente, se realiza la secuenciación de los productos en un secuenciador. Cada fragmento acabado en dideoxinucleótido está marcado fluorescentemente, de manera que cada dideoxinucleótido (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) implica un color de fluoróforo diferente, por lo que se produce una "escalera" de fragmentos de ADN que difieren en una base de longitud. En el secuenciador, cada fragmento marcado se separa por tamaño por electroforesis capilar con detección automatizada de los fragmentos de ADN marcados fluorescentemente, proporcionando la secuencia ordenada de los fragmentos en chromatogramas (Fig. 21).

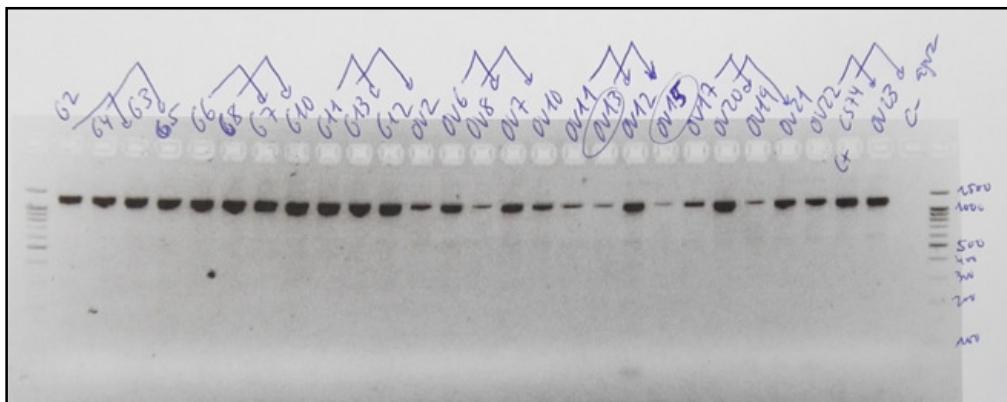


Figura 20. Resultado de una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la amplificación por PCR del marcador mitocondrial citocromo b (1250 pb) en 26 muestras de *C. suaveolens*. En los extremos laterales del gel se puede observar la escala de fragmentos de ADN de tamaño conocido (de 100 en 100 pb). Obsérvese como las bandas de los productos se sitúan en el tamaño esperado para este marcador. La existencia de una banda del tamaño esperado en el control positivo (muestra C+ Cs74) indica que la PCR ha funcionado correctamente, por lo que si algunos de los productos no hubiesen mostrado banda no sería achacable a fallo de la reacción. La ausencia de banda en el control negativo de PCR (muestra C- agua) estaría indicando que no se ha producido contaminación en la mix de reacción, por lo que la amplificación de las muestras es real y correcta.

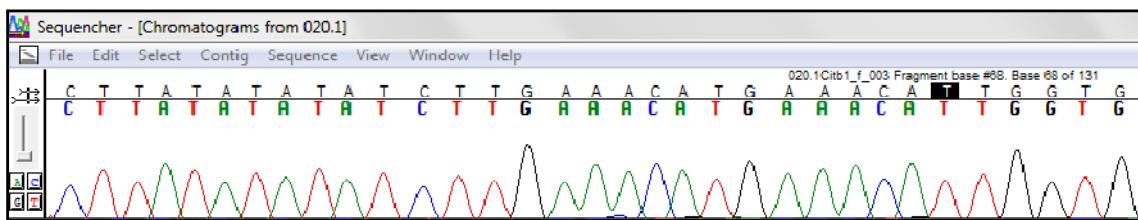


Figura 21. Ejemplo de un cromatograma mostrando una secuencia de nucleótidos.

Para el estudio de genética poblacional (objetivo 3) se emplearon solo muestras de tejido, y se amplificaron y genotiparon diez marcadores microsatélites (ADN nuclear), 8 de ellos específicos de musaraña de campo (GenBank accession numbers AY531118–AY531125, Calmet et al., 2004) y dos desarrollados para musaraña gris pero amplificados con éxito en musaraña de campo (Y09407 y Y09411; loci 3 y 72, respectivamente, Favre & Balloux, 1997). Otros cuatro marcadores microsatélites

fueron descartados por no amplificar con éxito o por ser monomórficos en las poblaciones de estudio. El método empleado para la amplificación y genotipado de los marcadores microsatélites fue el método de marcaje indirecto con cola M13(-21) etiquetada con fluorescencia descrito por Schuelke (2000). Este método se basa en la amplificación de los fragmentos con tres cebadores: un cebador directo (forward) complementario a la región que flanquea el microsatélite en el extremo 5', un cebador inverso (reverse) complementario a la región 3' y un cebador universal de 21 pb M13 con cola marcada con los tintes fluorescentes 6-FAM, VIC, NED, o PET (Applied Biosystems). El cebador directo posee una extensión en su extremo 5' de una secuencia de 21 pb complementaria al cebador M13, lo que permitirá que los fragmentos amplificados sean marcados con fluorescencia. La cantidad del cebador directo debe ser inferior a la mitad del cebador inverso. Las condiciones de termociclado se eligen de tal manera que durante los primeros ciclos, el cebador directo con su secuencia M13(-21) se incorpore a los productos de PCR que se acumulan. Más tarde, cuando el cebador directo se agota, la temperatura de hibridación (annealing) se reduce para facilitar la hibridación del cebador M13(-21) universal. Por lo tanto, el cebador universal M13(-21) marcado con fluorescencia "toma el control" como cebador directo e incorpora el tinte fluorescente en el producto de PCR. Mediante electroforesis en gel de agarosa y una escala de fragmentos de ADN de tamaño conocido de referencia, se comprueba el éxito de amplificación observando una banda del tamaño deseado. Finalmente, los productos de PCR marcados pueden ser analizados por electroforesis capilar en un secuenciador para obtener los alelos separados por tamaños en chromatogramas (Fig. 22).

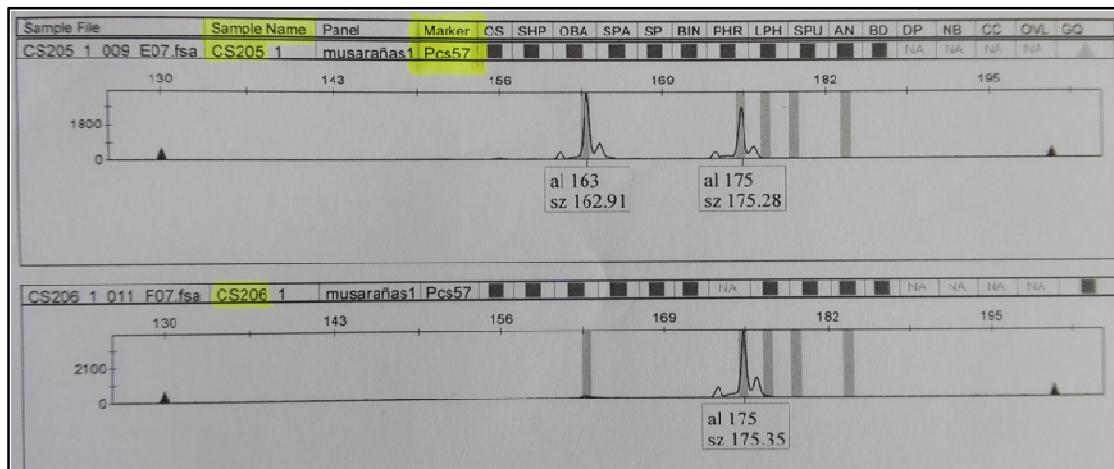


Figura 22. Cromatogramas de dos muestras (CS205, arriba; CS206, abajo) para un mismo marcador microsatélite (Pcs57). El eje X representa el tamaño de los fragmentos (alelos) y el eje Y es la intensidad de la señal. En este ejemplo, el genotipo de la muestra CS205 para el marcador Pcs57 es 163/175, y el de la muestra CS206 es 175/175.

Tanto en el estudio filogeográfico como en el de genética poblacional la amplificación se llevó a cabo mediante PCR usando para ello un termociclador (TDradient, Biometra, Fig. 23), y la secuenciación o genotipado de los productos de PCR fueron analizados en el analizador genético ABI 3130xl (Applied Biosystems) (Fig. 24).



Figura 23. Termociclador (TDradient, Biometra) para amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

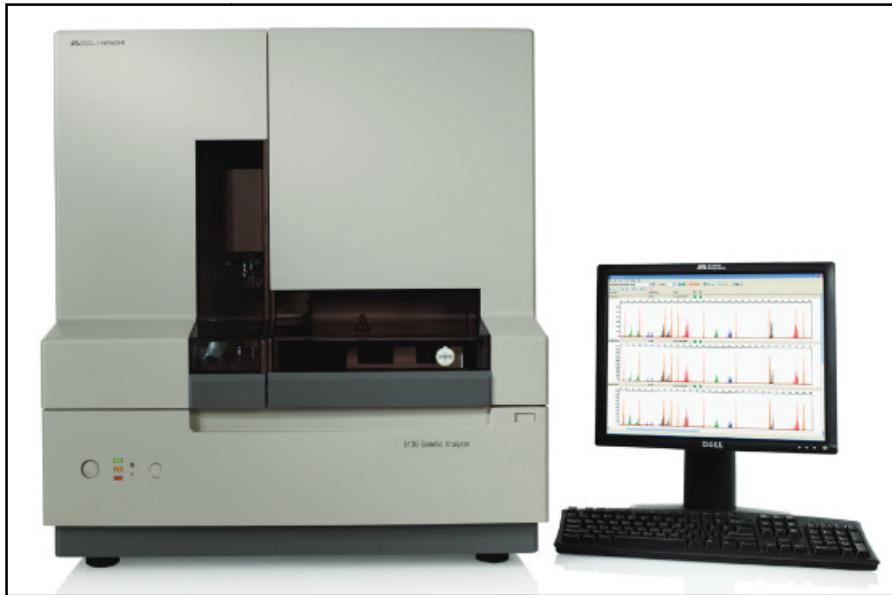


Figura 24. Analizador genético ABI 3130xl (Applied Biosystems).

-Prueba diagnóstica para confirmación genética de muestras de *C. suaveolens*

Como ya se ha comentado, *C. suaveolens* presenta una morfología muy variable y extremadamente similar a *C. russula*. Por ello, en algunos casos la identificación morfológica de las musarañas capturadas planteaba dudas y fue necesario obtener confirmación genética de la especie. Para la confirmación genética de las muestras de ejemplares dudosos se realizó una prueba diagnóstica consistente en la amplificación por PCR de un par de marcadores microsatélites (Y09508 y Y09412, loci 9 y 45, respectivamente, en Favre & Balloux, 1997). Estos dos marcadores presentan distintos tamaños en *C. suaveolens* y *C. russula*, por lo que permiten una fácil y rápida asignación de la especie a partir del tamaño de los productos amplificados. El loci 9 presenta un tamaño en torno a las 250 pb en *C. suaveolens* y en torno a las 150 pb en *C. russula*. El loci 45 presenta un tamaño en torno a las 500 pb en *C. suaveolens* y en torno a las 200 pb en *C. russula*. Los resultados de la amplificación eran observados mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 25). En la electroforesis se usó una escala de fragmentos de ADN de tamaño conocido como referencia, muestras control para *C. suaveolens* y *C. russula* (controles positivos), así como controles negativos de

extracción y de amplificación para evaluar la existencia de contaminación en ambos procesos.

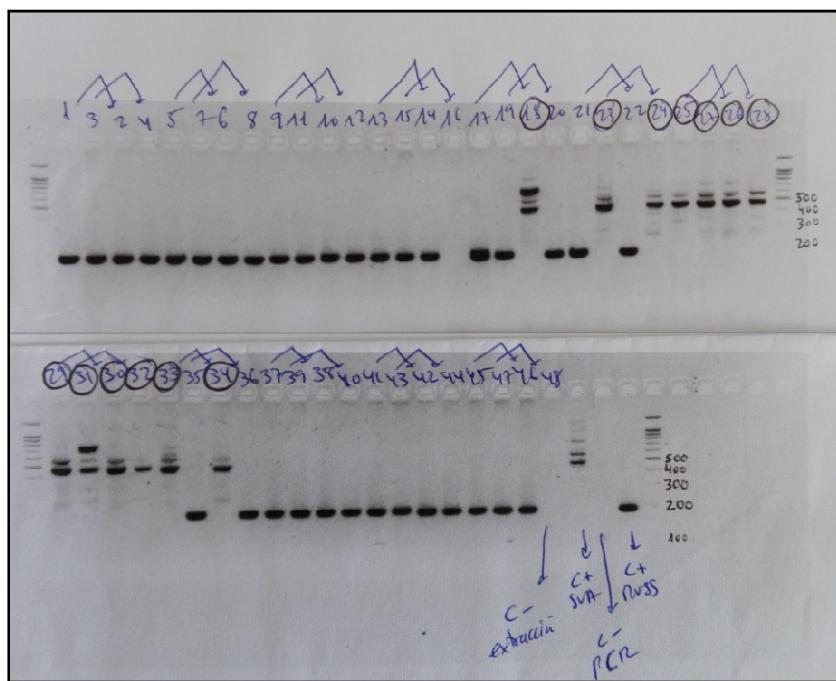


Figura 25. Resultado de una electroforesis en gel de agarosa para realizar la confirmación genética de 47 muestras de musarañas *Crocidura*. En los extremos laterales del gel (tanto en la fila superior como en la inferior) se puede observar la escala de fragmentos de ADN de tamaño conocido (de 100 en 100 pb). Se muestran los resultados para el loci 45, cuyo tamaño esperado en *C. suaveolens* es de 500 pb (control positivo, C+ sua) y para *C. russula* de 200 pb (control positivo, C+ russ). Las muestras rodeadas (18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34) pertenecen a *C. suaveolens*, ya que presentan una banda en torno a 500 pb. El resto de muestras pertenecen a *C. russula*, porque presentan una banda en torno a 200 pb. También se muestran los controles negativos de extracción (C- extracción) y de PCR (C- PCR). En este caso, la ausencia de bandas en ambos controles negativos indica que no se ha producido contaminación en la extracción de la muestras ni en la mix de reacción, respectivamente.

Con esta sencilla prueba diagnóstica se obtuvo una rápida confirmación genética de los ejemplares dudosos sin necesidad de secuenciar los productos amplificados, lo que permitió un considerable ahorro de tiempo y de costes económicos.

2.4 REFERENCIAS

Aulagnier S, Haffner P, Mitchell-Jones A, Moutou F, Zima J. 2009. *Guía de los mamíferos de Europa, del norte de África y de Oriente Medio*. Lynx Edicions: Barcelona.

Avenant N. 2005. Barn owl pellets: a useful tool for monitoring small mammal communities. *Belgian Journal of Zoology* 135: 39-43.

Barrientos JA. 1988. *Bases para un curso práctico de entomología*. Asociación Española de Entomología: Barcelona.

Buś MM, Źmihorski M, Romanowski J, Balčiauskienė L, Cichocki J, Balčiauskas L. 2014. High efficiency protocol of DNA extraction from *Micromys minutus* mandibles from owl pellets: a tool for molecular research of cryptic mammal species. *Acta Theriologica* 59: 99-109.

Calmet CE, Lambourdière J, Abdelkrim J, Pascal M, Samadi S. 2004. Characterization of eight polymorphic microsatellites in the shrew *Crocidura suaveolens* and its application to the study of insular populations of the French Atlantic coast. *Molecular Ecology Notes* 4: 426-428.

Calzada J, Román J. 2017. EgaEduca. Una herramienta didáctica de investigación con egagrópilas. XVIII Convocatoria de proyectos de innovación docente y de investigación educativa para la mejora de la docencia universitaria 2015/2017. Vicerrectorado de calidad y formación de la Universidad de Huelva, Huelva. Available at: <http://www.uhu.es/egaeduca/ficha-5-como-diferenciar-entre-las-dos-especies-de-musarañas-de-dientes-blancos-del-genero-crocidura> (accesed on 22 November 2017).

Centeno-Cuadros A, Delibes M, Godoy JA. 2009. Phylogeography of Southern Water Vole (*Arvicola sapidus*): evidence for refugia within the Iberian glacial refugium? *Molecular Ecology* 18: 3652-3667.

Dick J. 1985. *Guía de campo de los arácnidos de España y Europa*. Omega: Barcelona.

Favre L, Balloux F. 1997. Characterization of microsatellite loci in the greater white-toothed shrew *Crocidura russula*. *Molecular Ecology* 6: 595-596.

Gosàlbez J. 1987. *Insectívors i rosegadors de Catalunya*. Ketres Editora, S.A: Barcelona, Spain.

Guimaraes S, Fernandez-Jalvo Y, Stoetzel E, Gorgé O, Bennett EA, Denys C, Grange T, Geigl EM. 2016. Owl pellets: a wise DNA source for small mammal genetics. *Journal of Zoology* 298: 64-74.

Heisler LM, Somers CM, Poulin RG. 2016. Owl pellets: a more effective alternative to conventional trapping for broad-scale studies of small mammal communities. *Methods in Ecology and Evolution* 7: 96-103.

Hutterer R. 2005. Order Soricomorpha. In: Wilson DE and Reeder DM, eds. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3rd edn ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 220-311.

López-Fuster MJ. 2007. *Crocidura russula* (Hermann 1780). In: Palomo LJ, Gisbert J and Blanco JC, eds. *Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España*. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad -SECEM-SECEMU. 125-127.

Müllenbach R, Lagoda PJ, Welter C. 1989. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends in genetics: TIG* 5: 391.

Ohdachi S, Dokuchaev NE, Hasegawa M, Masuda R. 2001. Intraspecific phylogeny and geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the mitochondrial cytochrome b sequences. *Molecular Ecology* 10: 2199-2213.

Rohland N, Hofreiter M. 2007. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques* 42: 343.

Roulin A. 2002. *Tyto alba* barn owl. *BWP Update* 4: 115-138.

Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.

Siewers J, Schirmel J, Buchholz S. 2014. The efficiency of pitfall traps as a method of sampling epigeal arthropods in litter rich forest habitats. *European Journal of Entomology* 111: 69-74.

Taberlet P, Fumagalli L. 1996. Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. *Molecular Ecology* 5: 301-305.

Torre I, Fernández L, Arrizabalaga A. 2015. Using Barn Owl *Tyto alba* Pellet Analyses to Monitor the Distribution Patterns of the Yellow-Necked Mouse (*Apodemus flavicollis* Melchior 1834) in a Transitional Mediterranean Mountain. *Mammal Study* 40: 133-142.

Zahradník J. 1989. *Guía coleópteros de España y de Europa* Omega: Barcelona.

Capítulo 3. Resultados

Capítulo 3: Resultados

Las versiones editor de los artículos publicados, que forman parte del capítulo 3: Resultados, han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a derechos de autor. En sustitución de los artículos ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, enlace a la revista y resumen.

-Biedma, L., Román, J., Calzada, J., Friis, G., & Godoy, J. A. (2017). Phylogeography of *Crocidura suaveolens* (Mammalia: Soricidae) in Iberia has been shaped by competitive exclusion by *C. russula*. Biological Journal of the Linnean Society, 123(1), 81–95. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx126>.

Enlace al artículo: <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx126>

RESUMEN:

Despite their potential importance, biological processes such as competitive exclusion (CE) have been largely neglected in phylogeographical studies. Here, we analyse the role of glacial events and CE in the evolutionary history of the lesser white-toothed shrew, *Crocidura suaveolens*, in Iberia based on cytochrome *b* sequences. All the Iberian samples grouped together with the rest of western European populations within the previously described clade IV. We identified three distinct evolutionary lineages within this major clade, two of them occurring exclusively in Iberia. Iberian lineage B extends throughout the northwest with a continuous distribution and moderate to high diversity values, whereas Iberian lineage C has a highly patchy distribution and is structured in four sublineages, all having low diversity values. No signs of demographic growth were detected for any of the lineages. The evolutionary history of *C. suaveolens* in Iberia supports the refugia-within-refugia scenario, but ecological studies in areas of sympatry, molecular and fossil datings, and contrasting patterns in the Italian Peninsula suggest that CE exerted by *C. russula* since its arrival in Iberia has been the main factor shaping the distribution, phylogeography and population genetics of lineage C.

- Biedma, L., Román, J., Godoy, J. A., & Calzada, J. (2019). Using owl pellets to infer habitat associations and clarify the regional distribution of a cryptic shrew. Journal of Zoology, 308(2), 139–148. <https://doi.org/10.1111/jzo.1266>.

Enlace al artículo: <https://doi.org/10.1111/jzo.1266>

RESUMEN:

Accurate knowledge of the distribution of rare species remains a great challenge in conservation biology because these species are prone to extinction and the number of species becoming rare is increasing. However, the distribution of rare species is usually difficult to delimit because of their low abundances and/or small distribution ranges. These difficulties are even greater when they are sympatric with morphologically similar species that can lead to identification errors. Here, we use barn owl (*Tyto alba*) pellets

to infer, indirectly, potential habitat associations of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura suaveolens*) in the Gulf of Cádiz, south-western Iberia and to clarify the distribution of the species in this region. In the Gulf of Cádiz, *C. suaveolens* is a rare species that lives in sympatry with its congener, the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*), a much more abundant and extremely similar species. Through several indirect lines of evidence we inferred a possible association of *C. suaveolens* with tidal marsh habitat. This was a very surprising finding since *C. suaveolens* is a habitat generalist throughout its global distribution range. The species presented a highly restricted distribution in the Gulf of Cádiz occurring only in four tidal marshes. The causes of this limited distribution remain poorly understood to date, but our results are consistent with the hypothesis that *C. suaveolens* was displaced to tidal marshes through competitive exclusion by *C. russula*, although the geomorphological history of the tidal marshes of the Gulf of Cádiz may also explain its regional distribution and the phylogeographical patterns recently described in the region.

- Biedma, L., Calzada, J., Román, J., & Godoy, J. A. (2019). Rare and rear: population genetics of marsh-specialist *Crocidura suaveolens* populations in the Gulf of Cádiz. *Journal of Mammalogy*, 100(1), 92–102. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyy172>.

Enlace al artículo: <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyy172>

RESUMEN:

Crocidura suaveolens is a rare, habitat-specialist species in the Gulf of Cádiz (southwestern Iberia), the southwesternmost limit of its distributional range. In this region, it is present only in six tidal marshes distributed in four isolated areas as a result of competitive exclusion by *C. russula*. These rear-edge populations of *C. suaveolens* could have a high conservation value because they are predicted to contain high and unique genetic diversity, given their isolation in climatic refugia through Quaternary climatic oscillation. Here, we performed a genetic characterization of these populations using 10 microsatellite loci as a first assessment of their conservation status and to guide their conservation and management. A total of six genetic clusters of *C. suaveolens* were identified, corresponding to the six marshes sampled. Levels of differentiation among them were correlated with geographic distance, except for the high differentiation of one site (Estero Domingo Rubio [EDR]) despite its close proximity to two other sites (Tinto and Odiel), probably as a consequence of recent anthropic isolation. However, moderate levels of local and high levels of regional genetic diversity were observed, making the Gulf of Cádiz a region with a great evolutionary potential to face future threats. The four isolated tidal marsh areas occupied by the species should be treated as management units.

Crocidura suaveolens es una especie rara y especialista de hábitat en el Golfo de Cádiz (suroeste de Iberia), el límite más suroccidental de su rango de distribución. En esta región, la especie está presente solo en seis marismas mareas distribuidas en cuatro áreas aisladas como resultado de exclusión competitiva por *C. russula*. Estas poblaciones en la retaguardia del rango de *C. suaveolens* podrían tener un alto valor de conservación

porque se predice que contienen diversidad genética alta y única, derivada de su aislamiento en refugios glaciares durante las oscilaciones climáticas del Cuaternario. En el presente estudio realizamos una caracterización genética de estas poblaciones utilizando 10 loci microsatélites como una primera evaluación de su estado de conservación y para orientar su conservación y manejo. Se identificaron un total de seis grupos genéticos de *C. suaveolens*, correspondiente a las seis marismas muestreadas. Los niveles de diferenciación entre ellas estuvieron correlacionados con la distancia geográfica, excepto por la alta diferenciación de Estero Domingo Rubio a pesar de la gran proximidad a Tinto y Odiel, y probablemente como consecuencia de aislamiento antrópico reciente. Sin embargo, se observaron niveles moderados de diversidad local y altos niveles de diversidad genética regional, lo que convierte al Golfo de Cádiz en una región con un gran potencial evolutivo para afrontar futuras amenazas. Las cuatro áreas de marisma mareal aisladas ocupadas por la especie deberían tratarse como unidades de manejo.

3.1. ARTÍCULO 1

PHYLOGEOGRAPHY OF *CROCIDURA SUAVEOLENS* (MAMMALIA: SORICIDAE) IN IBERIA HAS BEEN SHAPED BY COMPETITIVE EXCLUSION BY *C. RUSSULA*.

Published in:



Biological Journal of the Linnean Society

Publishing company: Oxford University

Press

Editor-in-Chief: John A. Allen

Volume 123, Issue 1, pages 81-95

Year: 2018

ISSN: 0024-4066 (Print) 1095-8312 (Online)

DOI: 10.1093/biolinнейан/blx126

Category	Journal rank/Total journals	Quartile	Impact factor (2017)
Evolutionary Biology	26/49	Q3	2.532

1 **Phylogeography of *Crocidura suaveolens***
2 **(Mammalia: Soricidae) in Iberia has been shaped**
3 **by competitive exclusion by *C. russula***

4 LUIS BIEDMA, JACINTO ROMÁN, JAVIER CALZADA, GUILLERMO FRIIS and JOSÉ A. GODOY

5 **SUPPORTING INFORMATION**

6 **Supplementary Methods**

7 **Sample collection**

8 Samples of 119 lesser white-toothed shrews, *C. suaveolens*, were collected in this study, 55 of
9 them consisted in bone samples (mandibles or skulls) obtained from owl pellets and 64 were
10 tissue samples of specimens specifically captured for this work. Fresh tissues were stored in
11 95% ethanol and cold conditions. Sampling was designed to cover most of the distribution
12 range of the species in the Iberian Peninsula, however, our attempts to sample the species in
13 Portugal were unsuccessful (Fig. 1, see also Table S1 in Supporting Information for a full
14 description of the collection localities). This project received positive report by the committee
15 of bioethics at the University of Huelva and all captures were performed with official permits
issued by the corresponding nature conservation institutions.

16 **DNA Extraction**

17 Different extraction protocols were employed according to the nature of the samples. DNA
18 was extracted from tissue samples using two different methods, the NucleoSpin® 96 Tissue Kit
19 (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) and a ‘salting-out’ protocol (Müllenbach, Lagoda &
20 Welter, 1989) modified to include two successive LiCl precipitations and chloroform
21 extractions for protein removal. Bones samples were first frozen under liquid nitrogen and
22 homogenized to powder with a ball-mill (RETSCH Mod.MM301) or with a mortar and pestle.
23 Then, DNA was extracted using a guanidinium silica protocol [method C in Rohland and
24 Hofreiter (2007)]. The final elution volume was 50µl in all cases. New disposable material was
25 used for extractions of each specimen and the work surface was cleaned with bleach-
26 containing solution between each sample to prevent contamination. In addition, extraction
27 blanks were included so that any possible contamination could be detected at each step. For
28 bones samples, extractions were performed in a sterile laboratory with UV irradiation where
29 no fresh tissue extraction had been performed. Moreover, pre-PCR set up was carried out in a
30 dedicated UV-hood situated in a separate isolated room in this same sterile laboratory.

31 **PCR amplification and sequencing**

32 DNA from fresh tissue samples was amplified using primers L14734/H15985 (Ohdachi,
33 Dokuchaev, Hasegawa & Masuda, 2001) to obtain a fragment of 1251bp that includes the
34 whole cytochrome b gene. Additionally, we designed five pairs of internal partially overlapping
35 primers which we used for sequencing and for amplification of degraded bone DNA extracts
36 (Table S2). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a final volume of 20µl and
37 consisted of 2-4µl of extract, 2 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, 0.4 µM of each primer, 1x Taq
38 polymerase buffer and 0.4 U/mL Taq (BIOTAQ- DNA Polymerase; Bioline). Bovine Serum
39 Albumine (BSA; Roche), 0.2 mg/mL, was added to prevent inhibition. PCR conditions consisted
40 of an initial denaturation of 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 30
41 s, annealing at 52°C for 30 s and extension at 72°C for 90 s (large fragments) or 30 s (short
42 fragments), and finishing with a final extension step at 72°C for 5 min. To control the
43 performance of the process and monitor for contamination, positive (DNA obtained from fresh
44 tissue) and negative (water) DNA controls, respectively, were included with each set of PCR
45 reactions. As a cleaning step before sequencing, we incubated 10µl of PCR product with 4µl
46 ExoSAP-IT enzyme (Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase in buffer) (USB
47 Corporation) for 15 min at 37°C followed by inactivation for 15 min at 80°C. Fragments were
48 bidirectionally sequenced using the Applied Biosystems BigDye Terminator Cycle Sequencing
49 Kit v.1.1 following manufacturer's instructions and the same primers used for the
50 amplification. Sephadex gel columns were used for filtration. Forward and reverse sequences
51 for each PCR product were edited and assembled using SEQUENCER 4.9 (Gene Codes
52 Corporation, Ann Arbor, MI, USA). All multiple sequence alignments used in this study were
53 constructed using Geneious alignment in GENEIOUS version 8.1.5 (<http://www.geneious.com>,
54 Kearse, Moir, Wilson, Stones-Havas, Cheung, Sturrock, Buxton, Cooper, Markowitz, Duran,
55 Thierer, Ashton, Mentjies & Drummond, 2012). All sequences generated were deposited in
56 GenBank (Accession numbers: MF987937 - MF988055).

57 **Phylogenetic and network analyses**

58 We performed a phylogenetic analysis of the 119 sequences we obtained (Table S1), together
59 with 122 additional sequences we downloaded from GenBank (Table S3), which represent all
60 the ten clades that were identified in previous studies (Dubey, Cosson, Magnanou, Vohralík,
61 Benda, Frynta, Hutterer, Vogel & Vogel, 2007; Dubey, Zaitsev, Cosson, Abdulkadier & Vogel,
62 2006). Sequences of *C. nigripes* and *C. brunnea*, two species that are included within the sister
63 clade of the *C. suaveolens* group (Dubey, Salamin, Ruedi, Barrière, Colyn & Vogel, 2008), were

64 used as outgroup. A Bayesian phylogenetic tree was obtained in BEAST 2.4.1 (Bouckaert,
65 Heled, Kühnert, Vaughan, Wu, Xie, Suchard, Rambaut & Drummond, 2014). We used the HKY
66 substitution model with a Gamma distribution, which was the best fitting model suggested by
67 JMODELTEST version 2.1.6. (Darriba, Taboada, Doallo & Posada, 2012; Guindon & Gascuel,
68 2003). A strict molecular clock was chosen and a coalescent constant-size model was used as
69 tree prior. Three independent Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analyses of 100 million
70 generations each were run in BEAST 2. The first 10% of the generations were discarded as
71 burn-in and the effective sample size estimator was used to diagnose convergence in TRACER
72 v1.6 (Rambaut, Suchard, Xie & Drummond, 2014). The tree files were combined using the
73 LogCombiner program and for each run the first 33% of trees were discarded in order to obtain
74 a total sample of 10053 trees. TreeAnnotator was used to estimate the maximum clade
75 credibility tree with median node heights. Finally, the tree with posterior probabilities of each
76 clade was viewed in FIGTREE version 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). MCMC simulations were
77 repeated without sequence data to test their influence on the posterior distributions. Bayesian
78 analyses were performed in the version of BEAST 2 hosted at the CIPRES Science Gateway
79 Portal v3.3 (San Diego Supercomputer Center; Miller, Pfeiffer & Schwartz, 2010;
80 <http://www.phylo.org/portal/>) as well as the analyses of JMODELTEST 2 and TreeAnnotator.

81 Phylogenetic relationships among sequences of *C. suaveolens* were also inferred with
82 maximum-likelihood (ML) in Mega 7. We used the same alignment mentioned above and a
83 Tamura-Nei substitution model (TN93) with gamma distribution ($G = 1.22$) plus a proportion of
84 invariant sites of 0.49 (the second-best model), since the best model (HKY) model was not
85 available in Mega. Node support was evaluated with 100 bootstrap replicates.

86 To further explore the internal structure of clade IV, a phylogenetic network was constructed
87 in NETWORK 4.6., using a median-joining (MJ) algorithm (Bandelt, Forster & Röhl, 1999) and
88 the haplotypes identified by the program DNASP 5.10 (Librado & Rozas, 2009) from all
89 sequences grouping within clade IV.

90 In order to estimate the arrival date of *C. russula* to Iberia, and to evaluate the possible
91 influence of competitive exclusion on the evolutionary history of *C. suaveolens* in this area, we
92 constructed a Bayesian phylogenetic tree in BEAST 2.4.1 (Bouckaert et al., 2014) with a set of
93 81 cytochrome b sequences of *C. russula* and *C. pachyura* (previously classified within *C.*
94 *russula*). These sequences were either downloaded from GenBank (accessed on September 29,
95 2016), sequences AY918373-AY918400 (Brändli, Handley, Vogel & Perrin, 2005) and KT167326-
96 KT167363 (Gargan, Cornette, Yearsley, Montgomery, Paupério, Alves, Butler, Pascal, Tresset,

97 Herrel, Lusby, Tosh, Searle & McDevitt, 2016), or requested from the authors (Cosson,
98 Hutterer, Libois, Sarà, Taberlet & Vogel, 2005). Two sequences of this latter work were used as
99 outgroup, one of *C. suaveolens* (Su1.1) and another of *C. leucodon* (Le1.1). In this case, a HKY
100 substitution model with Gamma distribution and a proportion of invariant sites of 0.1 was
101 used. All other procedures in BEAST2 were as described above for the *C. suaveolens* analysis.

102 **Estimation of cytochrome b substitution rate: BEAST2**

103 The estimation of a branch-specific cytochrome b substitution rate was carried out following
104 Igea, Aymerich, Bannikova, Gosálbez and Castresana (2015). To the set of Soricidae
105 cytochrome b sequences used by these authors, we added one arbitrarily selected sequence of
106 *C. suaveolens* obtained in this study and three more from *Myosorex cafer*, *Myosorex sclateri*
107 and *C. russula* downloaded from GenBank (DQ630418, DQ630436 and AY769263,
108 respectively). With this set of 61 sequences of soricids species, a Bayesian relaxed clock
109 analysis was performed in BEAST2. The alignment was partitioned by codon position in order
110 to minimize the effect of saturation. A GTR substitution model and rate heterogeneity
111 modeled with a Gamma distribution and a proportion of invariable sites was used, as
112 suggested by JMODELTEST2 applying the Akaike information criterion. A lognormal relaxed
113 molecular clock was applied to permit the variation of the rate among different branches of
114 the tree. The tree was calibrated using six fossil constraints available for soricids (Table S4),
115 previously used by Igea et al. (2015) and Jacquet, Denys, Verheyen, Bryja, Hutterer, Peterhans,
116 Stanley, Goodman, Couloux and Colyn (2015). All modifications realized in the tab of the priors
117 were carried out following the recommendations given by Igea et al. (2015). In this way, we set
118 lognormal prior distributions on all calibrated nodes, in which the offset was defined by the
119 hard minimum, the mean in real space was adjusted so that the upper 95th percentile of the
120 probability density distribution was coincident with the soft maximum, and the standard
121 deviation parameter was set to 1 (Table S4). Moreover, monophyly was enforced in all them.
122 Priors of the substitution rate parameters of the GTR model were changed to uniform
123 distributions between 0 and 100 in order to improved convergence. A speciation Yule Model
124 was used as tree prior since it is generally more appropriate when considering sequences from
125 different species (Drummond & Bouckaert, 2015). Three independent MCMC analyses of 100
126 million generations each were run, sampled every 20000 generations and excluding the first
127 10% of the generations as burn-in. Proper mixing and convergence of the chains was checked
128 with TRACER 1.6 (Rambaut et al., 2014). The tree files were combined using the LogCombiner
129 program and for each run the first 33% of trees were discarded in order to obtain a total
130 sample of 10053 trees, which could be analyzed later with TreeAnnotator to obtain a

131 maximum clade credibility tree using median node heights. Finally, the tree with the
132 substitution rates in the branches was visualized in FIGTREE version 1.4.2
133 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>) and the substitution rates in the *C. suaveolens* and the *C. russula*
134 branches were extracted, both being of the same value.

135 **Divergence time estimates: StarBEAST2**

136 We dated the times of divergence between lineages within clade IV in StarBEAST2, using the
137 same sequences, partitions and substitution models previously employed in the phylogenetic
138 tree reconstruction, and by setting the different clades found there as independent
139 populations. Similarly, we estimated the time of split of European and African *C. russula*
140 populations from the phylogenetic tree of *C. russula*, setting sequences of *C. pachyura*,
141 European *C. russula* and Moroccan *C. russula* as predefined populations. Population function
142 was set as constant and the ploidy type as mitochondrial. A coalescent constant size model
143 was used as tree prior. A lognormal distribution was set as prior for the clock rate parameter
144 with the mean in real space and a standard deviation of 0.3. The specific substitution rates of
145 *C. suaveolens* or *C. russula*, estimated from the Soricidae phylogeny, were used here as the
146 mean clock rates. The standard deviation was set to match the values of the 2.5% and 95%
147 quartiles of the distribution, approximately, with the values of the 95% confidence interval of
148 the estimated rate. Three independent MCMC analyses of 100 million generations each were
149 run, sampled every 20000 generations and we excluded the first 10% of the generations as
150 burn-in. The program TRACER 1.6 (Rambaut et al., 2014) was used to check that the effective
151 sample sizes of all the parameters of interest were above 200 and convergence of the chains
152 had been reached. The tree files of the three independent runs were combined using the
153 LogCombiner program and for each run the first 33% of trees were discarded, obtaining a total
154 sample of 10053 trees. TreeAnnotator was used to build the maximum clade credibility tree
155 with median node heights. Finally, the trees with dated split times and 95% confidence
156 intervals were visualized in FIGTREE version 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

157 **Genetic structure and diversity**

158 Estimates of the genetic structure, genetic diversity as well as inferences of historical
159 demography were carried out using clade IV sequences.

160 We used Spatial Analysis of Molecular Variance (SAMOVA 2.0; Dupanloup, Schneider &
161 Excoffier, 2002) to infer groups of populations. Samples were grouped *a priori* in 12
162 geographical populations generally corresponding to separate sampling localities; localities

163 with less than five samples were pooled when geographically proximate (<100 Kms) or
164 discarded for population genetic analyses otherwise, resulting in a final dataset of 120
165 sequences representing the Iberian range of clade IV (Fig. 1; Tables S1 and S3). SAMOVA was
166 run for 10000 iterations from each of 100 random initial conditions, and testing the predefined
167 number of groups (K) from 2 to 12. The inferred hierarchical structure was then used for the
168 analysis of molecular variance (AMOVA), genetic diversity estimates and pairwise comparisons
169 based on F_{ST} (using only haplotype frequencies) or Φ_{ST} (using also nucleotide distances among
170 haplotypes) in ARLEQUIN v3.11 (Excoffier, Laval & Schneider, 2005).

171 Number of sequences, polymorphic sites, haplotypes and average number of nucleotide
172 differences, as well as the haplotype and nucleotide diversities were estimated for each
173 population, population groups as suggested by SAMOVA, and for lineages of the clade IV using
174 ARLEQUIN v3.11 (Excoffier et al., 2005).

175 **Demographic history**

176 We investigated the demographic history of clade IV lineages using several complementary
177 methods. Mismatch distributions of pairwise nucleotide differences were compared with
178 expected values for an expanding population and examined based on the sum of squared
179 deviations (SSD) and Harpending's raggedness index (HRI) (Rogers & Harpending, 1992).
180 Mismatch analyses, as well as Tajima's D (Tajima, 1989) and Fu's FS statistics (Fu, 1997), were
181 analyzed using ARLEQUIN v3.11 (Excoffier et al., 2005). In addition, Fu and Li's F^* and D^* (Fu &
182 Li, 1993)and R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) tests were estimated using DNAsP 5.10 (Librado
183 & Rozas, 2009). Tests for goodness of fit for all methods were generated using parametric
184 bootstrapping with 1000 replicates.

185 We also generated Bayesian Skyline Plots (BSPs; Drummond, Rambaut, Shapiro & Pybus, 2005)
186 with BEAST2, using Tamura-Nei or HKY as substitution model as suggested by JMODELTEST2. A
187 strict molecular clock was used with the clock rate set at the estimated species-specific
188 substitution rate (3.77×10^{-8} substitutions/site/year) and analyses were run under the
189 coalescent Bayesian skyline tree prior. A lognormal distribution was set as prior for the clock
190 rate parameter, with the mean in real space and a standard deviation of 0.3. For all other
191 parameters, priors were set to default values. The length of the Markov chain was set to 100
192 millions of generations and log parameters were sampled every 10000 generations. BSPs were
193 plotted with TRACER v1.6 (Rambaut et al., 2014).

194

195 Supplementary References

- 196 **Bandelt H-J, Forster P, Röhl A.** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific
197 phylogenies. *Molecular biology and evolution* **16**: 37-48.
- 198 **Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, Xie D, Suchard MA, Rambaut A,**
199 **Drummond AJ.** 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis.
200 *PLoS Comput Biol* **10**: e1003537. doi:1003510.1001371/journal.pcbi.1003537
- 201 **Brändli L, Handley I-JL, Vogel P, Perrin N.** 2005. Evolutionary history of the greater white-
202 toothed shrew (*Crocidura russula*) inferred from analysis of mtDNA, Y, and X
203 chromosome markers. *Molecular phylogenetics and evolution* **37**: 832-844.
- 204 **Cosson J-F, Hutterer R, Libois R, Sarà M, Taberlet P, Vogel P.** 2005. Phylogeographical
205 footprints of the Strait of Gibraltar and Quaternary climatic fluctuations in the western
206 Mediterranean: a case study with the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*
207 (Mammalia: Soricidae). *Molecular Ecology* **14**: 1151-1162.
- 208 **Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D.** 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics
209 and parallel computing. *Nature methods* **9**: 772-772.
- 210 **Drummond AJ, Bouckaert RR.** 2015. *Bayesian evolutionary analysis with BEAST*. Cambridge
211 University Press.
- 212 **Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG.** 2005. Bayesian coalescent inference of past
213 population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution* **22**:
214 1185-1192.
- 215 **Dubey S, Cosson J-F, Magnanou E, Vohralík V, Benda P, Frynta D, Hutterer R, Vogel V, Vogel
216 P.** 2007. Mediterranean populations of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura*
217 *suaveolens* group): an unexpected puzzle of Pleistocene survivors and prehistoric
218 introductions. *Molecular Ecology* **16**: 3438-3452.
- 219 **Dubey S, Salamin N, Ruedi M, Barrière P, Colyn M, Vogel P.** 2008. Biogeographic origin and
220 radiation of the Old World crocidurine shrews (Mammalia: Soricidae) inferred from
221 mitochondrial and nuclear genes. *Molecular phylogenetics and evolution* **48**: 953-963.
- 222 **Dubey S, Zaitsev M, Cosson J-F, Abdulkadier A, Vogel P.** 2006. Pliocene and Pleistocene
223 diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group).
224 *Molecular phylogenetics and evolution* **38**: 635-647.
- 225 **Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L.** 2002. A simulated annealing approach to define the
226 genetic structure of populations. *Molecular Ecology* **11**: 2571-2581.
- 227 **Excoffier L, Laval G, Schneider S.** 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package
228 for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics* **1**: 47-50.
- 229 **Fu Y-X.** 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking
230 and background selection. *Genetics* **147**: 915-925.
- 231 **Fu Y-X, Li W-H.** 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**: 693-709.
- 232 **Gargan LM, Cornette R, Yearsley JM, Montgomery WI, Paupério J, Alves PC, Butler F, Pascal
233 M, Tresset A, Herrel A, Lusby J, Tosh DG, Searle JB, McDevitt AD.** 2016. Molecular and
234 morphological insights into the origin of the invasive greater white-toothed shrew
235 (*Crocidura russula*) in Ireland. *Biological Invasions* **18**: 857-871.
- 236 **Guindon S, Gascuel O.** 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large
237 phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology* **52**: 696-704.
- 238 **Igea J, Aymerich P, Bannikova AA, Gosálbez J, Castresana J.** 2015. Multilocus species trees
239 and species delimitation in a temporal context: application to the water shrews of the
240 genus *Neomys*. *BMC Evolutionary Biology* **15**: 209.
- 241 **Jacquet F, Denys C, Verheyen E, Bryja J, Hutterer R, Peterhans JCK, Stanley WT, Goodman
242 SM, Couloux A, Colyn M.** 2015. Phylogeography and evolutionary history of the
243 *Crocidura olivieri* complex (Mammalia, Soricomorpha): from a forest origin to broad
244 ecological expansion across Africa. *BMC Evolutionary Biology* **15**: 71.

- 245 **Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A,**
246 **Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A.** 2012. Geneious
247 Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization
248 and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647-1649.
- 249 **Librado P, Rozas J.** 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA
250 polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- 251 **Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T.** 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of
252 large phylogenetic trees. Proceedings of the Gateway Computing Environments
253 Workshop (GCE). New Orleans, LA, 1-8.
- 254 **Müllenbach R, Lagoda PJ, Welter C.** 1989. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from
255 blood and tissues. *Trends in genetics: TIG* **5**: 391.
- 256 **Ohdachi S, Dokuchaev NE, Hasegawa M, Masuda R.** 2001. Intraspecific phylogeny and
257 geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the
258 mitochondrial cytochrome b sequences. *Molecular Ecology* **10**: 2199-2213.
- 259 **Rambaut A, Suchard M, Xie D, Drummond A.** 2014. Tracer v1. 6 Available at:
260 <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 10 September 2016).
- 261 **Ramos-Onsins SE, Rozas J.** 2002. Statistical properties of new neutrality tests against
262 population growth. *Molecular biology and evolution* **19**: 2092-2100.
- 263 **Rogers AR, Harpending H.** 1992. Population growth makes waves in the distribution of
264 pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution* **9**: 552-569.
- 265 **Rohland N, Hofreiter M.** 2007. Comparison and optimization of ancient DNA extraction.
266 *Biotechniques* **42**: 343.
- 267 **Tajima F.** 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA
268 polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.
- 269
- 270

Phylogeography of *Crocidura suaveolens* (Mammalia: Soricidae) in Iberia has been shaped by competitive exclusion by *C. russula*

LUIS BIEDMA, JACINTO ROMÁN, JAVIER CALZADA, GUILLERMO FRIIS and JOSÉ A. GODOY

SUPPORTING INFORMATION

Tables S1–S6, Figures S1–S6

Table S1 *Crocidura suaveolens* samples collected for this study. Populations were defined a priori based on the geographical distribution of the samples. Population groups were those inferred by SAMOVA analysis.

Sample ID	Sample Code	Accession number	Sample type	Collecting locality (Province, locality)	Map number	Lat.	Long.	Lineage	Population	Population Group	Haplotype number
1*	OV2	MF988001	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H26
2*	OV5	MF988011	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H19
3*	OV6	MF988002	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H29
4*	OV7	MF988003	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H26
5*	OV8	MF988004	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H19
6*	OV11	MF987994	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H25
7*	OV12	MF987985	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H19
8*	OV17	MF987995	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H26
9*	OV19	MF987996	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H27
10*	OV20	MF987997	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H26
11*	OV21	MF987998	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H28
12*	OV22	MF987999	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H27
13*	OV23	MF988000	Tissue	Oviedo, Oviedo	1	43.3841	-5.8662	B	Oviedo	Oviedo	H26
14	G2	MF987989	Tissue	La Coruña, Toques	2	42.9784	-7.9000	B	Galicia	Galicia	H22
15	G3	MF987990	Tissue	La Coruña, Toques	2	42.9784	-7.9000	B	Galicia	Galicia	H23
16	G4	MF987991	Tissue	La Coruña, Toques	2	42.9784	-7.9000	B	Galicia	Galicia	H24
17	G5	MF987992	Tissue	La Coruña, Toques	2	42.9784	-7.9000	B	Galicia	Galicia	H20
18	G6	MF987983	Tissue	La Coruña, Toques	2	42.9784	-7.9000	B	Galicia	Galicia	H17
19	G7	MF987993	Tissue	La Coruña, Toques	2	42.9784	-7.9000	B	Galicia	Galicia	H23
20	G8	MF987984	Tissue	La Coruña, Toques	2	42.9784	-7.9000	B	Galicia	Galicia	H18
21	G9	MF988010	Tissue	Pontevedra, Forcarei	3	42.6036	-8.4004	B	Galicia	Galicia	H20
22	G10	MF987986	Tissue	Pontevedra, Forcarei	3	42.6036	-8.4004	B	Galicia	Galicia	H20
23	G11	MF987987	Tissue	Pontevedra, Forcarei	3	42.6036	-8.4004	B	Galicia	Galicia	H21
24	G12	MF987988	Tissue	Pontevedra, Forcarei	3	42.6036	-8.4004	B	Galicia	Galicia	H20
25	G13	MF987982	Tissue	Pontevedra, Forcarei	3	42.6036	-8.4004	B	Galicia	Galicia	H16
26	eCCA5	MF987951	Bone	Ourense, Castro Caldelas	4	42.3761	-7.4158	B	Galicia	Galicia	H6
27*	eSAN1	MF987963	Bone	Zamora, Sanabria	5	42.1118	-6.8351	B	Zamora	Zamora	H8
28	eFIG1	MF987954	Bone	Zamora, Figueiruela de Arriba	6	41.8694	-6.4505	B	Zamora	Zamora	H8
29	eFIG2	MF987955	Bone	Zamora, Figueiruela de Arriba	6	41.8694	-6.4505	B	Zamora	Zamora	H8
30	eFIG3	MF987956	Bone	Zamora, Figueiruela de Arriba	6	41.8694	-6.4505	B	Zamora	Zamora	H9
31	eFIG4	MF987957	Bone	Zamora, Figueiruela de Arriba	6	41.8694	-6.4505	B	Zamora	Zamora	H8
32	ZA7	MF987981	Tissue	Zamora, Flechas	6	41.8817	-6.4208	B	Zamora	Zamora	H13
33	eTOR1	MF987964	Bone	Zamora, Torres de Aliste	6	41.8748	-6.3005	B	Zamora	Zamora	H13
34	eTOR2	MF987965	Bone	Zamora, Torres de Aliste	6	41.8748	-6.3005	B	Zamora	Zamora	H14
35	eTOR3	MF987966	Bone	Zamora, Torres de Aliste	6	41.8748	-6.3005	B	Zamora	Zamora	H9
36	eTOR4	MF987967	Bone	Zamora, Torres de Aliste	6	41.8748	-6.3005	B	Zamora	Zamora	H14
37	eGAT1	MF987958	Bone	Cáceres, Gata	7	40.2375	-6.5964	B	Western-CS	Western-CS	H10
38	eGAT2	MF987959	Bone	Cáceres, Gata	7	40.2375	-6.5964	B	Western-CS	Western-CS	H10
39	eGAT3	MF987960	Bone	Cáceres, Gata	7	40.2375	-6.5964	B	Western-CS	Western-CS	H10

[CAPÍTULO 3. RESULTADOS]

40	eGAT4	MF987961	Bone	Cáceres, Gata	7	40.2375	-6.5964	B	Western-CS	Western-CS	H11
41	CC23	MF988005	Tissue	Cáceres, Robledillo de Gata	7	40.3480	-6.4562	B	Western-CS	Western-CS	H11
42	CC24	MF988006	Tissue	Cáceres, Robledillo de Gata	7	40.3480	-6.4562	B	Western-CS	Western-CS	H11
43	CC31	MF987969	Tissue	Cáceres, Garganta la Olla	8	40.1274	-5.8080	B	Eastern-CS	Eastern-CS	H4
44	eYUS4	MF987968	Bone	Cáceres, Cuacos de Yuste	8	40.1135	-5.7388	B	Eastern-CS	Eastern-CS	H4
45	SISCEN01	MF988051	Bone	Cáceres, Cuacos de Yuste	8	40.1135	-5.7388	B	Eastern-CS	Eastern-CS	H4
46	SISCEN06	MF988052	Bone	Cáceres, Cuacos de Yuste	8	40.1135	-5.7388	B	Eastern-CS	Eastern-CS	H4
47	eCAN1	MF987945	Bone	Salamanca, Candelario	9	40.3655	-5.7415	B	Eastern-CS	Eastern-CS	H4
48	eCAN2	MF987946	Bone	Salamanca, Candelario	9	40.3655	-5.7415	B	Eastern-CS	Eastern-CS	H4
49	eCAN4	MF987948	Bone	Salamanca, Candelario	9	40.3655	-5.7415	B	Eastern-CS	Eastern-CS	H4
50	eCAN6	MF987950	Bone	Salamanca, Candelario	9	40.3655	-5.7415	B	Eastern-CS	Eastern-CS	H4
51	eCAN3	MF987947	Bone	Salamanca, Candelario	9	40.3655	-5.7415	C2	Eastern-CS	Eastern-CS	H5
52	eCAN5	MF987949	Bone	Salamanca, Candelario	9	40.3655	-5.7415	C2	Eastern-CS	Eastern-CS	H5
53	ePAR1	MF987962	Bone	Burgos, Partearroyo	10	43.1453	-3.2941	C1	Burgos	NC-IP	H12
54	SCAN03	MF988054	Bone	Burgos, Caniego	10	43.1142	-3.3000	C1	Burgos	NC-IP	H3
55	eBUR1	MF987944	Bone	Burgos, Caniego	10	43.1142	-3.3000	C1	Burgos	NC-IP	H3
56	SUNG04	MF988053	Bone	Burgos, Ungo	10	43.1404	-3.2647	C1	Burgos	NC-IP	H35
57	eEAN1	MF987953	Bone	Burgos, Encima Angulo	10	43.0368	-3.1756	C1	Burgos	NC-IP	H3
58*	PV2	MF988012	Tissue	Vizcaya, Iurreta	11	43.1785	-2.6233	C1	PV-Navarra	NC-IP	H3
59*	ePVA14	MF987942	Bone	Guipúzcoa, Elosua	12	43.1287	-2.3832	C1	PV-Navarra	NC-IP	H3
60*	ePVA15	MF987941	Bone	Guipúzcoa, Elosua	12	43.1287	-2.3832	C1	PV-Navarra	NC-IP	H3
61*	ePVA16	MF987940	Bone	Guipúzcoa, Elosua	12	43.1287	-2.3832	C1	PV-Navarra	NC-IP	H3
62*	ePVA17	MF987939	Bone	Guipúzcoa, Oyarzun	12	43.2989	-1.8624	C1	PV-Navarra	NC-IP	H3
63*	ePVA18	MF987937	Bone	Guipúzcoa, Ibarra	12	43.1323	-2.0663	C1	PV-Navarra	NC-IP	H3
64*	ePVA19	MF987938	Bone	Guipúzcoa, Landarbaso_Rentería	12	43.2576	-1.8973	C1	PV-Navarra	NC-IP	H3
65*	eNAV1	MF987943	Bone	Navarra, Elbete	13	43.1486	-1.5130	C1	PV-Navarra	NC-IP	H3
66*	eNAV2	MF988055	Bone	Navarra, Elbete	13	43.1486	-1.5130	C1	PV-Navarra	NC-IP	H36
67	AYA12	MF988041	Bone	Huelva, Río Guadiana	14	37.2013	-7.3806	C3	Guadiana	SW-Huelva	H15
68	AYA14	MF988042	Bone	Huelva, Río Guadiana	14	37.2013	-7.3806	C3	Guadiana	SW-Huelva	H33
69	AYA15	MF988043	Bone	Huelva, Río Guadiana	14	37.2013	-7.3806	C3	Guadiana	SW-Huelva	H33
70	CS238	MF987970	Tissue	Huelva, Río Guadiana	14	37.2013	-7.3806	C3	Guadiana	SW-Huelva	H15
71	CS258	MF987972	Tissue	Huelva, Río Guadiana	14	37.2013	-7.3806	C3	Guadiana	SW-Huelva	H15
72	CS2	MF988045	Tissue	Huelva, Río Guadiana	14	37.2013	-7.3806	C3	Guadiana	SW-Huelva	H15
73	2801	MF988033	Tissue	Huelva, Río Piedras	15	37.2283	-7.1554	C3	Piedras	SW-Huelva	H15
74	2802	MF988034	Tissue	Huelva, Río Piedras	15	37.2283	-7.1554	C3	Piedras	SW-Huelva	H15
75	2803	MF988035	Tissue	Huelva, Río Piedras	15	37.2283	-7.1554	C3	Piedras	SW-Huelva	H15
76	2805	MF988036	Tissue	Huelva, Río Piedras	15	37.2283	-7.1554	C3	Piedras	SW-Huelva	H15
77	2901	MF988037	Tissue	Huelva, Río Piedras	15	37.2283	-7.1554	C3	Piedras	SW-Huelva	H15
78	SALM05	MF988049	Bone	Huelva, Río Piedras	15	37.2283	-7.1554	C3	Piedras	SW-Huelva	H15
79	SALM16	MF988048	Bone	Huelva, Río Piedras	15	37.2283	-7.1554	C3	Piedras	SW-Huelva	H15
80	SALM85	MF988050	Bone	Huelva, Río Piedras	15	37.2283	-7.1554	C3	Piedras	SW-Huelva	H15
81	CS1	MF988044	Tissue	Huelva, Río Odiel	16	37.1838	-6.9436	C3	Odiel	SW-Huelva	H34
82	CS3	MF988046	Tissue	Huelva, Río Odiel	16	37.1838	-6.9436	C3	Odiel	SW-Huelva	H30
83	CS4	MF988047	Tissue	Huelva, Río Odiel	16	37.1838	-6.9436	C3	Odiel	SW-Huelva	H15
84	CS74	MF988007	Tissue	Huelva, Río Odiel	16	37.1838	-6.9436	C3	Odiel	SW-Huelva	H30
85	SMENO01	MF988038	Bone	Huelva, Río Odiel	16	37.1838	-6.9436	C3	Odiel	SW-Huelva	H15
86	SOP112	MF988039	Bone	Huelva, Río Odiel	16	37.1838	-6.9436	C3	Odiel	SW-Huelva	H15
87	6804.1	MF988040	Bone	Huelva, Río Odiel	16	37.1838	-6.9436	C3	Odiel	SW-Huelva	H15
88	CS248	MF987971	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
89	CS274	MF987973	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
90	CS277	MF987974	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
91	CS279	MF987975	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
92	CS281	MF987976	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
93	CS451	MF987977	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
94	CS453	MF987978	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
95	CS455	MF987979	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
96	CS456	MF987980	Tissue	Huelva, Río Tinto	17	37.2086	-6.9314	C3	Tinto	SW-Huelva	H15
97	20.1	MF988013	Bone	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
98	20.4	MF988014	Bone	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
99	20.5	MF988015	Bone	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
100	20.6	MF988016	Bone	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31

[CAPÍTULO 3. RESULTADOS]

101	20.7	MF988017	Bone	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H7
102	20.8	MF988018	Bone	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
103	20.10	MF988019	Bone	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H7
104	1301	MF988022	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
105	1302	MF988023	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
106	1401	MF988024	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H32
107	1402	MF988025	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
108	1403	MF988026	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
109	1406	MF988027	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
110	1407	MF988028	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H7
111	1408	MF988029	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
112	1409	MF988030	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
113	1501	MF988031	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H7
114	1502	MF988032	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
115	eDON1	MF987952	Bone	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H7
116	D71	MF988008	Tissue	Huelva, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H7
117	D74	MF988009	Tissue	Cádiz, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H7
118	SARG04	MF988020	Bone	Cádiz, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31
119	SARG08	MF988021	Bone	Cádiz, Río Guadalquivir	18	36.8767	-6.3537	C4	Guadalquivir	Guadalquivir	H31

*Samples provided by: Merino-Sainz, I.; Anadón, A. and Somoano, A. (samples ID: 1-13); Ramos Bueno, P.L. (sample ID: 27); Burgos, G.; Elorduizapaterietxe, I. and Ugarteburu, J. (sample ID: 58); Aranzadi Society of Sciences (samples ID: 59-66). (Western-CS = Western Central System; Eastern-CS = Eastern Central System; NC-IP = North Central Iberian Peninsula and SW-Huelva = Southwestern Huelva).

Table S2 Primers used for the amplification of the cytochrome b gene.

Primer	Sequence	Fragment (Length in bp)	Design
L14734	AAAAACCATCGTTGTTATTCAACT	Complete (1251)	(Ohdachi <i>et al.</i> , 2001)
H15985	TAGAATGTCAGCTTGGGTGCT		(Ohdachi <i>et al.</i> , 2001)
citbcro1_f	CCTTTCCCTCCGTCACACAT		This study
citbcro1_r	CCTCAAGGGAGAACATAGCC	First (213)	This study
citbcro2_f	GGCTATGTTCTCCCTTGAGG		This study
citbcro2_r	GTTGTTTGAGCCGGTTTCAT	Second (232)	This study
citbcro3_f	CCGCACTCGCAGGAGTACA		This study
citbcro3_r	TGATATGGGGTGGTGTGTTG	Third (206)	This study
citbcro4_f	CAACACACCACCCATATCA		This study
citbcro4_r	TTGGCCAATTACTACAAATGGA	Fourth (297)	This study
citbcro5_f	GGGCCAACCAGTTGAATATC		This study
	H15985 was used as reverse	Fifth (222)	

References

Ohdachi, S., Dokuchaev, N.E., Hasegawa, M. & Masuda, R. (2001) Intraspecific phylogeny and geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the mitochondrial cytochrome b sequences. *Molecular Ecology*, **10**, 2199-2213.

Table S3 *Crocidura suaveolens* cytochrome *b* sequences downloaded from Genbank, including location, lineage and haplotype information only for sequences of the clade IV.

Sequence ID	Clade	GenBank Accesion	Reference	Country	Locality (Province, Locality)	Map number	Lineage	Haplotype number
120	IV	AY843489	[1]	England	Sark	25	A2	H_2
121	IV	AY843490	[1]	France	Hoedic	23	A2	H_38
122	IV	AY850035	[1]	France	Trielen	24	A2	H_37
123	IV	DQ630066	[2]	France	Porquerolles	20	A1	H_42
124	IV	DQ630067	[2]	France	Porquerolles	20	A1	H_44
125	IV	DQ630068	[2]	France	Porquerolles	20	A1	H_43
126	IV	AY843493	[1]	Italy	Imperia, Fraitusa	22	A1	H_39
127	IV	AY843494	[1]	Italy	Imperia, Fraitusa	22	A1	H_39
128	IV	AY843495	[1]	Italy	Imperia, Ventimiglia	21	A1	H_40
129	IV	DQ630065	[2]	Italy	Imperia, Ventimiglia	21	A1	H_45
130	IV	AY843491	[1]	Spain	Gerona, Figueras	19	A1	H_41
131*	IV	AY843492	[1]	Spain	Salamanca, Candelario	9	C2	H_1
132	I	AB077077	[3]					
133	I	AB077079	[3]					
134	I	AB077080	[3]					
135	I	AB077082	[3]					
136	I	AY843447	[1]					
137	II	DQ630062	[2]					
138	II	DQ630063	[2]					
139	II	AY843466	[1]					
140	II	AY843467	[1]					
141	II	AY843475	[1]					
142	II	AY843476	[1]					
143	II	AY843477	[1]					
144	II	AY843479	[1]					
145	II	AY843480	[1]					
146	II	AY843481	[1]					
147	II	AY843483	[1]					
148	III	DQ630055	[2]					
149	III	DQ630056	[2]					
150	III	DQ630057	[2]					
151	III	AY843487	[1]					
152	III	AY843488	[1]					
153	V	DQ630069	[2]					
154	V	DQ630070	[2]					
155	V	DQ630071	[2]					
156	V	DQ630072	[2]					
157	V	DQ630073	[2]					
158	V	DQ630074	[2]					

159	V	DQ630075	[2]						
160	V	DQ630076	[2]						
161	V	DQ630077	[2]						
162	V	DQ630078	[2]						
163	V	DQ630079	[2]						
164	V	DQ630080	[2]						
165	V	DQ630081	[2]						
166	V	DQ630082	[2]						
167	V	DQ630083	[2]						
168	V	DQ630084	[2]						
169	V	DQ630085	[2]						
170	V	DQ630086	[2]						
171	V	DQ630087	[2]						
172	V	DQ630088	[2]						
173	V	DQ630089	[2]						
174	V	DQ630090	[2]						
175	V	DQ630091	[2]						
176	V	DQ630092	[2]						
177	V	DQ630093	[2]						
178	V	DQ630094	[2]						
179	V	DQ630095	[2]						
180	V	DQ630096	[2]						
181	V	DQ630097	[2]						
182	V	DQ630098	[2]						
183	V	DQ630099	[2]						
184	V	DQ630100	[2]						
185	V	DQ630101	[2]						
186	V	DQ630102	[2]						
187	V	DQ630103	[2]						
188	V	DQ630104	[2]						
189	V	DQ630105	[2]						
190	V	DQ630106	[2]						
191	V	DQ630107	[2]						
192	V	DQ630108	[2]						
193	V	DQ630109	[2]						
194	V	DQ630110	[2]						
195	V	DQ630111	[2]						
196	V	DQ630112	[2]						
197	V	DQ630113	[2]						
198	V	DQ630114	[2]						
199	V	DQ630115	[2]						
200	V	DQ630116	[2]						
201	V	DQ630117	[2]						
202	V	DQ630118	[2]						
203	V	DQ630119	[2]						
204	V	DQ630120	[2]						
205	V	DQ630121	[2]						
206	V	DQ641270	[2]						
207	V	AY843496	[1]						
208	V	AY843497	[1]						
209	V	AY843498	[1]						
210	V	AY843499	[1]						
211	V	AY843500	[1]						

212	V	AY843501	[1]						
213	V	AY843502	[1]						
214	VI	DQ630053	[2]						
215	VI	DQ630054	[2]						
216	VI	AY452174	[4]						
217	VI	AY843460	[1]						
218	VI	AY843461	[1]						
219	VII	DQ630051	[2]						
220	VII	DQ630052	[2]						
221	VII	DQ630064	[2]						
222	VII	AB077280	[3]						
223	VII	AY843448	[1]						
224	VII	AY843449	[1]						
225	VII	AY843450	[1]						
226	VII	AY843451	[1]						
227	VII	AY843452	[1]						
228	VII	AY843453	[1]						
229	VII	AY843454	[1]						
230	VII	AY843455	[1]						
231	VII	AY843456	[1]						
232	VII	AY843457	[1]						
233	VII	AY843458	[1]						
234	VII	AY843459	[1]						
235	VIII	DQ630058	[2]						
236	VIII	DQ630059	[2]						
237	IX	DQ630060	[2]						
238	IX	DQ630061	[2]						
239	X	DQ630050	[2]						
240	<i>C.brunnea</i>	DQ059025	[1]						
241	<i>C.nigripes</i>	DQ059024	[1]						

*Sequence used in SAMOVA analysis grouped within the EasternCentral System (Eastern-CS) population.

References

- [1] Dubey, S., Zaitsev, M., Cosson, J.-F., Abdukadier, A. & Vogel, P. (2006) Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Molecular phylogenetics and evolution*, **38**, 635-647.
- [2] Dubey, S., Cosson, J.-F., Magnanou, E., Vohralík, V., Benda, P., Frynta, D., Hutterer, R., Vogel, V. & Vogel, P. (2007) Mediterranean populations of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura suaveolens* group): an unexpected puzzle of Pleistocene survivors and prehistoric introductions. *Molecular Ecology*, **16**, 3438-3452.
- [3] Ohdachi, S.D., Iwasa, M.A., Nesterenko, V.A., Abe, H., Masuda, R. & Haberl, W. (2004) Molecular phylogenetics of *Crocidura* shrews (Insectivora) in east and central Asia. *Journal of Mammalogy*, **85**, 396-403.
- [4] Poulakakis, N., Lymberakis, P., Paragamian, K. & Mylonas, M. (2005) Isolation and amplification of shrew DNA from barn owl pellets. *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**, 331-340.

Table S4 Calibrations constrains (in Myr) used as priors in the BEAST2 analysis of cytochrome b of soricids. Node numbers correspond to number in Figure S1.

Clade (Node number)	Minimum hard bound	Maximum soft bound	Log Normal Parameters	
			Mean	Offset
Soricinae and Myosoricinae-				
Crocidurinae (1)	20	25	1.59	20
Blarinini (2)	15	20	1.59	15
Myosoricinae-Crocidurinae (3)	12	17	1.59	12
Oldest Cryptotis (4)	9	12	0.96	9
Oldest Crocidura (5)	6	8	0.64	6
Otisorex (6)	3.5	5	0.48	3.5

Table S5 Populations of occurrence and frequencies of haplotypes found within clade IV of *Crocidura suaveolens* group.

Haplotype number	Populations																			TOTAL
	OVIEDO	GALICIA	ZAMORA	WESTERN-CS	EASTERN-CS	BURGOS	PV_NAVARRA	GUADIANA	PIEDRAS	ODIEL	TINTO	GUADALQUIVIR	Hoedic	Triélen	Sark	Figueras	Porquerolle	Ventimiglia	Fraitusa	
H_1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
H_3	0	0	0	0	0	3	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
H_4	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
H_5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	7
H_8	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
H_9	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_10	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
H_11	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
H_12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_13	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_14	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_15	0	0	0	0	0	0	0	4	8	4	9	0	0	0	0	0	0	0	0	25
H_16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_19	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
H_20	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
H_21	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_22	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_23	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_24	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_26	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
H_27	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	15
H_32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H_33	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_35	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_36	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H_37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
H_38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H_39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H_40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
H_41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H_42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H_43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H_44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H_45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TOTAL	13	13	10	6	11	5	9	6	8	7	9	23	1	1	1	1	3	2	2	131

Population groups suggested by SAMOVA are indicated in bold capital letters.

Table S6 Matrix of population pairwise comparisons for Iberian population of *Crocidura suaveolens*. Values based on F_{ST} (using only haplotype frequencies, in lower hemimatrix) or Φ_{ST} (using also nucleotide distances among haplotypes, in upper hemimatrix) are shown. Values with significant P-values are in bold (P-value = $P < 0.05$). (Populations: 1 País Vasco and Navarra, 2 Burgos, 3 Eastern-CS, 4 Western-CS, 5 Galicia, 6 Oviedo, 7 Zamora, 8 Guadalquivir, 9 Guadiana, 10 Piedras, 11 Odiel, 12 Tinto).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	0.063	0.651	0.856	0.762	0.824	0.847	0.894	0.900	0.976	0.914	0.977
2	0.070	-	0.569	0.784	0.704	0.776	0.794	0.868	0.833	0.941	0.857	0.946
3	0.643	0.443	-	0.307	0.392	0.451	0.434	0.747	0.614	0.658	0.632	0.673
4	0.620	0.353	0.476	-	0.254	0.393	0.388	0.894	0.816	0.873	0.834	0.882
5	0.399	0.174	0.300	0.219	-	0.246	0.124	0.831	0.749	0.785	0.761	0.794
6	0.446	0.227	0.346	0.270	0.135	-	0.351	0.849	0.804	0.837	0.815	0.845
7	0.479	0.241	0.368	0.287	0.143	0.189	-	0.894	0.832	0.872	0.844	0.879
8	0.595	0.438	0.510	0.467	0.318	0.359	0.378	-	0.833	0.879	0.840	0.882
9	0.649	0.389	0.503	0.433	0.246	0.296	0.315	0.488	-	0.262	0.170	0.287
10	0.882	0.727	0.731	0.741	0.476	0.523	0.567	0.657	0.262	-	0.135	0.000
11	0.577	0.318	0.444	0.365	0.197	0.246	0.261	0.441	0.028	0.248	-	0.156
12	0.889	0.746	0.743	0.757	0.492	0.539	0.584	0.665	0.287	0.000	0.272	-

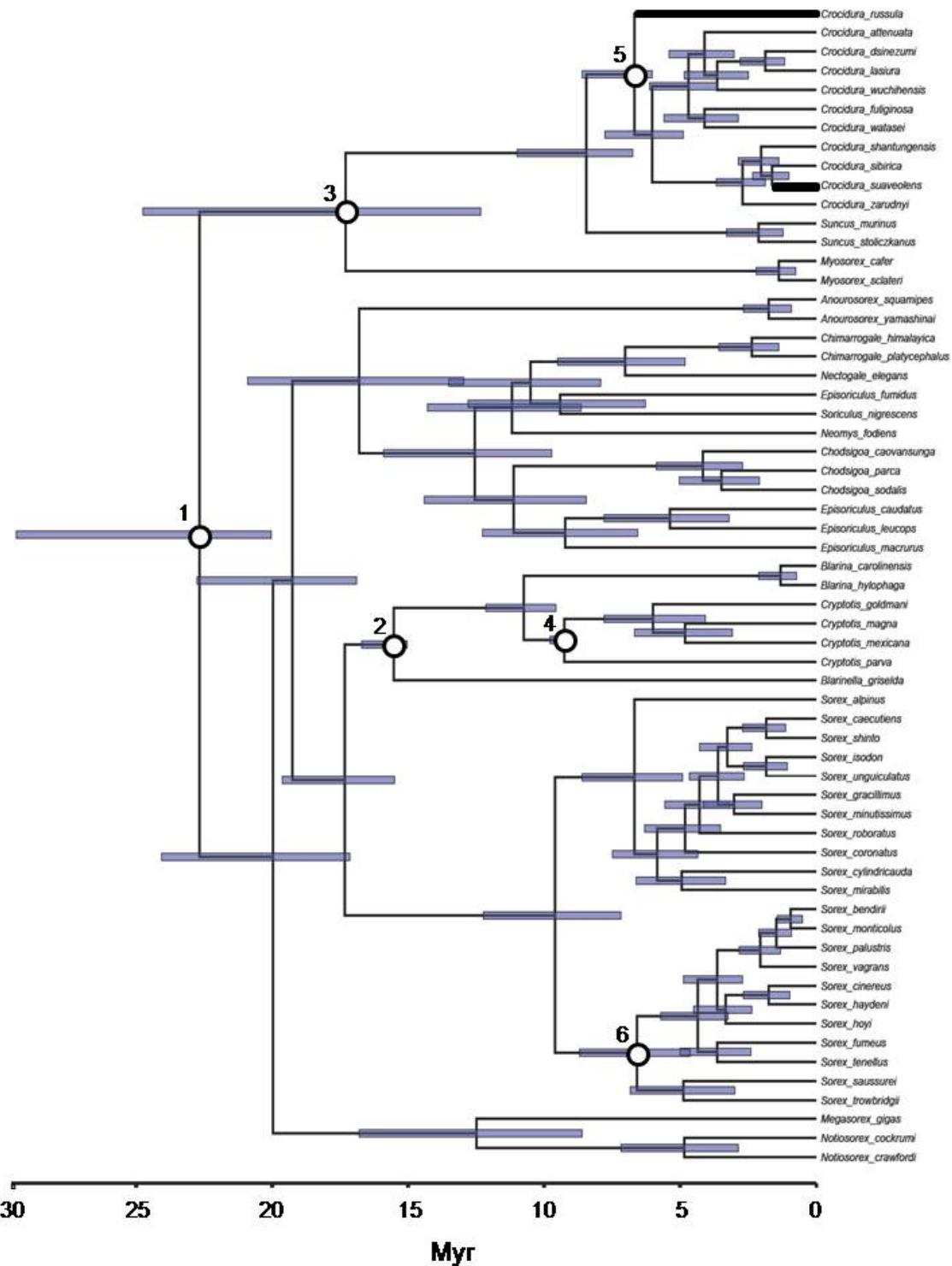


Figure S1 Bayesian relaxed clock tree reconstructed with cytochrome b sequences of soricids. Calibration nodes are shown with a white circle and the corresponding constraints are given in Table S4. The *Crocidura suaveolens* (and *Crocidura russula*) branch from which the mutations rate was estimated is shown with a thicker line. The mutation rate obtained was identical for both species.

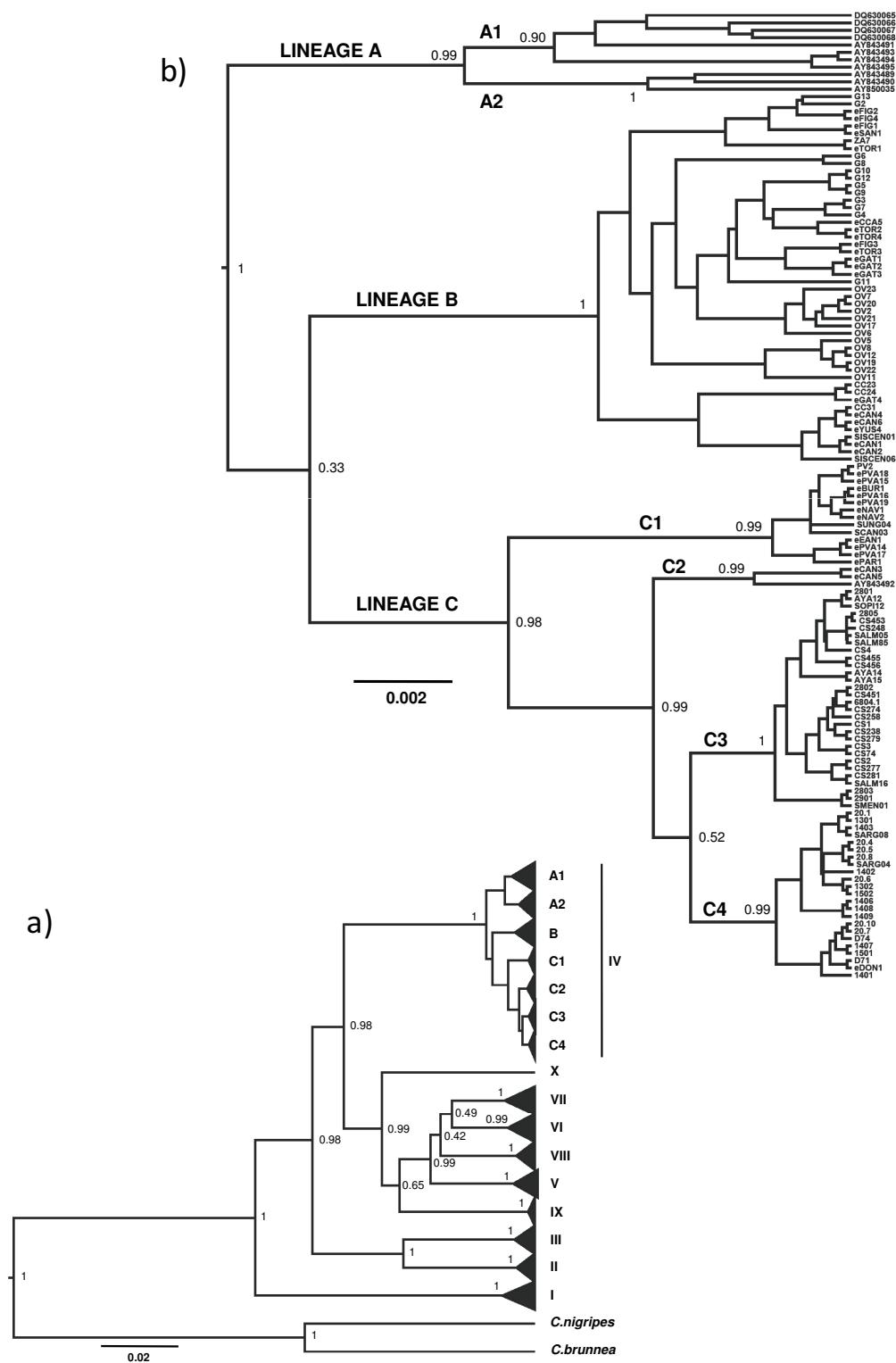


Figure S2 a) Bayesian phylogenetic tree of the *Crocidura suaveolens* group. All clades are shown collapsed except clade IV, for which its internal structure is also depicted. Numbers on nodes indicate posterior probability. **b)** Amplified view of clade IV subtree showing samples grouped within each lineage/sublineage.

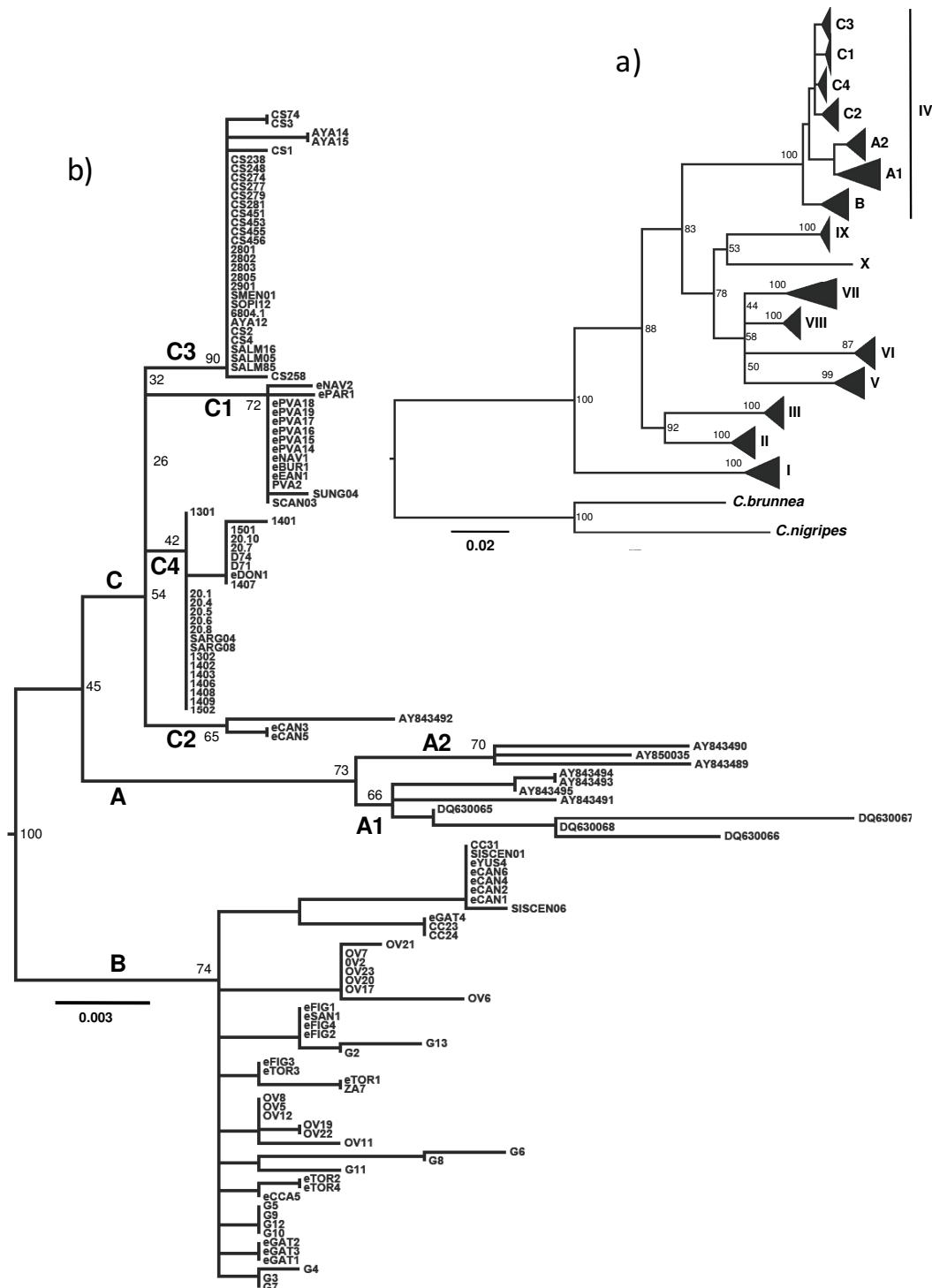


Figure S3 Maximum-likelihood phylogenetic tree of the *Crocidura suaveolens* group. All clades are shown collapsed except clade IV, for which its internal structure is also depicted. Numbers on nodes indicate non-parametric bootstrap support. **b)** Amplified view of clade IV subtree showing samples grouped within each lineage/sublineage.

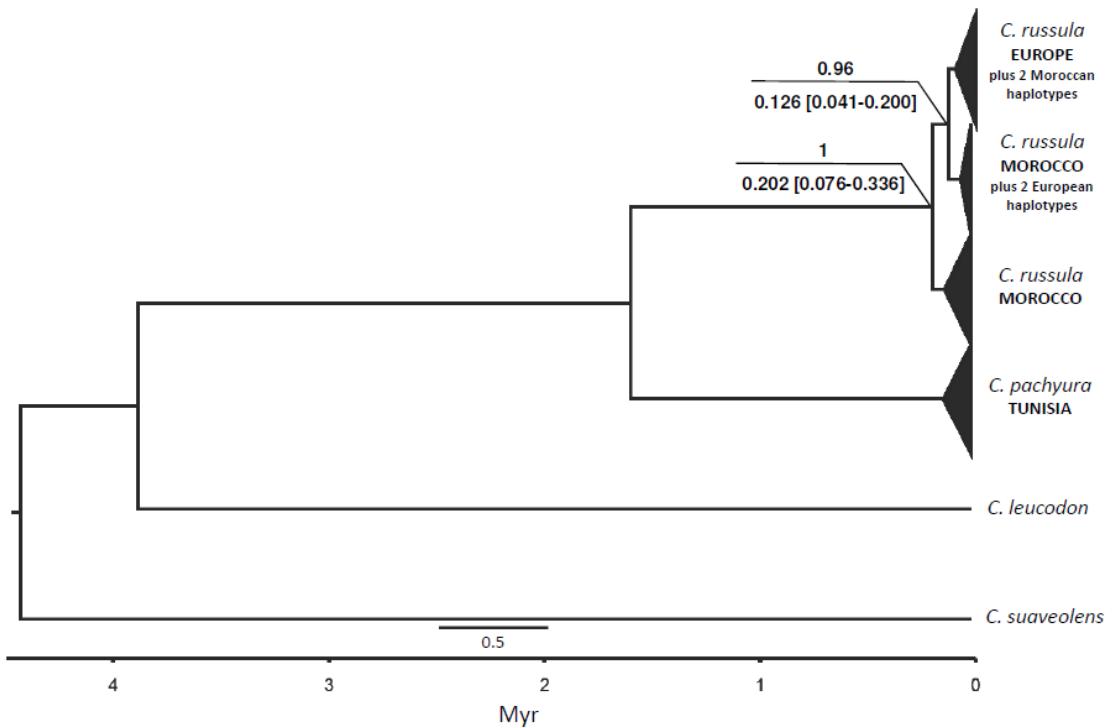


Figure S4 Dated tree of *Crocidura russula*. Bayesian posterior probabilities (above branch) and estimated times of divergence and credibility intervals within brackets (below branch) are indicated only for nodes that separate Moroccan and European haplotypes. Time to the most recent common ancestor (TMRCA) of European haplotypes was 0.126 Myr.

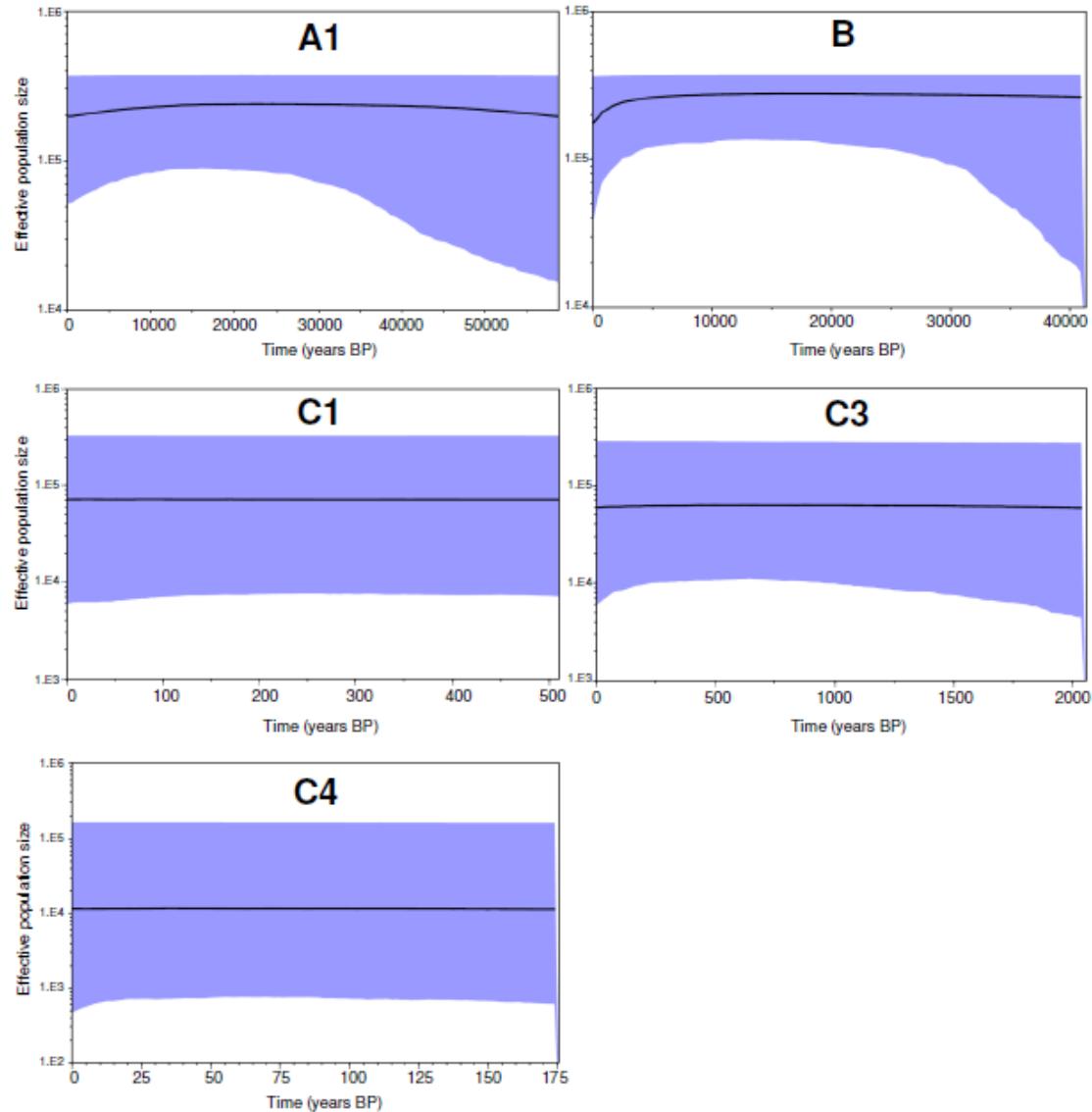


Figure S5 Bayesian skyline plots showing demographic histories of the different lineages / sublineages identified within clade IV. Sublineages A2 and C2 are not included owing to a low number of specimens ($N = 3$ in both). Estimates of the effective female population size (N_{ef}) are shown on a log scale against time going backwards since the present. The black line indicates the median estimate of effective female population size and the grey areas represent the 95% highest posterior densities.

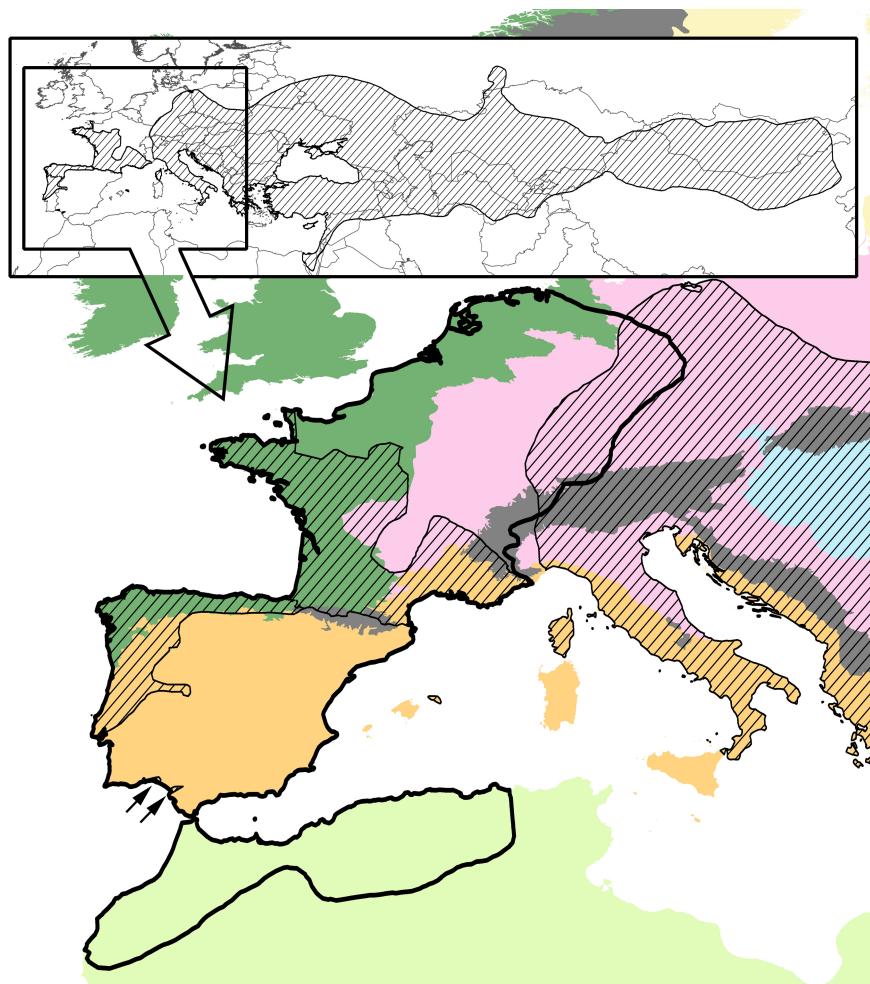
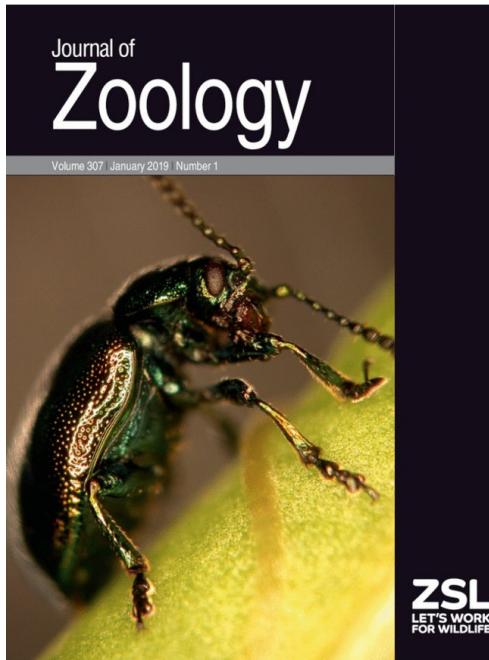


Figure S6 Distribution of *Crocidura suaveolens* (striped; southwestern Iberian populations are indicated with arrows) and *Crocidura russula* (continue within the area circumscribed by thick black line) in western Europe. The different European biogeographic regions are shown with colors: orange, Mediterranean; dark green, Atlantic; pink, Continental; dark gray, Alpine; light blue, Pannonian. Areas outside Europe are shown in light green. Note how the distribution of *Crocidura suaveolens* is fragmented only in areas of sympatry with *Crocidura russula*, and specially those in the Mediterranean region.

3.2. ARTÍCULO 2

USING OWL PELLETS TO INFER HABITAT ASSOCIATIONS AND CLARIFY THE REGIONAL DISTRIBUTION OF A CRYPTIC SHREW.

Published in:



Journal of Zoology

Publishing company: Zoological

Society of London

Editor-in-Chief: Nigel Bennett

Editor: Andrew Kitchener

In press

Year: 2019

ISSN: 0952-8369 (Print) 1469-7998 (Online)

DOI: 10.1111/jzo.12660

Category	Journal rank/Total journals	Quartile	Impact factor (2017)
-----------------	------------------------------------	-----------------	-----------------------------

Zoology	35/167	Q1	1.955
---------	--------	----	-------

3.3. ARTÍCULO 3

RARE AND REAR: POPULATION GENETICS OF MARSH-SPECIALIST *CROCIDURA SUAVEOLENS* POPULATIONS IN THE GULF OF CÁDIZ.

Published in:



Journal of Mammalogy

Publishing company: Oxford University

Press

Editor-in-Chief: Edward J. Heske

Associate Editor: Tereza Jezkova

Volume 100, Issue 1, pages 92-102

Year: 2019

ISSN: 0022-2372 (Print) 1545-1542 (Online)

DOI:10.1093/jmammal/gyy172

Category	Journal rank/Total journals	Quartile	Impact factor (2017)
----------	-----------------------------	----------	----------------------

Zoology	28/166	Q1	2.139
---------	--------	----	-------

3.4. ARTÍCULO 4

HABITAT SPECIALIZATION AS AN EVOLUTIONARY RESPONSE TO INTERSPECIFIC COMPETITION BETWEEN TWO SYMPATRIC SHREWS.

Under review in:



Journal of Mammalogy

Publishing company: Oxford University

Press

Editor-in-Chief: Edward J. Heske

Under review

ISSN: 0022-2372 (Print) 1545-1542 (Online)

Category	Journal rank/Total journals	Quartile	Impact factor (2017)
----------	-----------------------------	----------	----------------------

Zoology	28/166	Q1	2.139
---------	--------	----	-------

**Habitat specialization as an evolutionary response to interspecific competition between two sympatric shrews.**

Journal:	<i>Journal of Mammalogy</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Feature Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Biedma, Luis; University of Huelva Faculty of Experimental Sciences, Integrated Sciences Calzada, Javier; University of Huelva Faculty of Experimental Sciences, Integrated Sciences Godoy, José A.; Estacion Biologica de Donana CSIC, Integrative Ecology Roman, Jacinto; Estacion Biologica de Donana CSIC, Conservation Biology
Keywords:	coexistence, Crocidura, ecologically similar species, evolutionary response, habitat specialization, habitat use, interspecific competition, niche segregation

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Habitat specialization as an evolutionary response to interspecific competition between**
2 **two sympatric shrews.**

3

4 Specialization as a response to competition.

5

6 Luis Biedma, Javier Calzada, José A. Godoy, and Jacinto Román*

7

8 *Department of Integrated Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva,*
9 *Avenida de las Fuerzas Armadas, S/N, 21007 Huelva, Spain (LB, JC).*

10

11 *Department of Integrative Ecology, Doñana Biological Station, CSIC, C. Americo Vespucio*
12 *26, 41092 Sevilla, Spain (JAG).*

13

14 *Department of Conservation Biology, Doñana Biological Station, CSIC, C. Americo Vespucio*
15 *26, 41092 Sevilla, Spain (JR).*

16

17 E-mail addresses: luiseduardo.biedma@dbasp.uhu.es, javier.calzada@dbasp.uhu.es,
18 godoy@ebd.csic.es, jroman@ebd.csic.es.

19

20 Interspecific competition affects the population dynamics, distribution ranges and evolution
21 of competing species. The competitive exclusion principle states that ecologically similar
22 species cannot coexist unless they exhibit niche segregation. Here, we assess whether niche

23 segregation allows the coexistence of *C. russula* and *C. suaveolens* in southwestern Iberia and
24 whether segregation is the result of current (ecological effect) or past (evolutionary effect)
25 competition. We performed an annual live-trapping cycle in the two main habitats of the
26 Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR), the tidal marsh and the Mediterranean forest, both
27 in syntopic (i.e. where both species co-occur) and allotopic (where only one of the two
28 species occurs) sites within this Reserve. We modeled the presence / absence of each species
29 in both habitats and sites by generalized linear mixed models. The coexistence of both species
30 was favoured by spatial and temporal niche segregation. *Crocidura suaveolens* was restricted
31 to tidal marsh and did not occupy Mediterranean forest, even when *C. russula* was absent. We
32 interpret this as the result of competition in the past triggering an evolutionary response in *C.*
33 *suaveolens* towards its specialization in tidal marsh. Moreover, the specialist *C. suaveolens* is
34 currently outcompeting *C. russula* in tidal marshes, reversing the dominance pattern observed
35 elsewhere. The degree of co-occurrence between both species in syntopic sites was low
36 because they showed inverse dynamics of seasonal abundances. This study exemplifies how
37 interspecific competition can trigger an evolutionary response leading to habitat specialization
38 and how such specialization can favor the coexistence of ecologically similar species.
39

40 La competencia interespecífica afecta a la dinámica poblacional, los rangos de distribución y
41 la evolución de las especies competidoras. El principio de exclusión competitiva establece
42 que las especies ecológicamente similares no pueden coexistir a menos que segreguen sus
43 nichos. Aquí, evaluamos si el mecanismo que permite la coexistencia entre *C. russula* y *C.*
44 *suaveolens* en el suroeste de Iberia es la segregación de nicho y si esta es el resultado de la
45 competencia interespecífica actual (efecto ecológico) o pasada (efecto evolutivo). Realizamos
46 un ciclo anual de trampeos en vivo en los dos hábitats principales del Paraje Natural
47 Marismas del Odiel (OMNR), la marisma mareal y el bosque mediterráneo, tanto en sitios

48 sintópicos (es decir, donde coexisten ambas especies) como alotópicos (donde solo una de las
49 dos especies ocurre) dentro de este Paraje. Modelamos la presencia / ausencia de cada especie
50 en ambos hábitats y sitios mediante modelos mixtos lineales generalizados. La coexistencia
51 de ambas especies está favorecida por segregación espacial y temporal de nicho. *Crocidura*
52 *suaveolens* está restringida a marisma mareal y no ocupa bosque mediterráneo, incluso
53 cuando *C. russula* está ausente. Nuestra interpretación es que la competencia en el pasado
54 desencadenó una respuesta evolutiva en *C. suaveolens* hacia su especialización en marisma
55 mareal. Además, el especialista *C. suaveolens* está en la actualidad excluyendo
56 competitivamente a *C. russula* en las marismas mareas, un patrón de dominancia opuesto al
57 observado en otros lugares. El grado de coexistencia en los sitios sintópicos es bajo, porque
58 las dos especies muestran dinámicas inversas de abundancias estacionales. Este estudio
59 ejemplifica cómo la competencia interespecífica puede desencadenar una respuesta evolutiva
60 que conduce a la especialización del hábitat, y cómo esta especialización favorece la
61 coexistencia de especies ecológicamente similares.

62

63 **Key words:** coexistence, *Crocidura*, ecologically similar species, evolutionary response,
64 habitat specialization, habitat use, interspecific competition, niche segregation.

65 *Correspondent: jroman@ebd.csic.es.

66 Species coexist in communities which often include species that are ecologically very similar
67 to each other and that apparently use the same resources (Leibold & McPeek 2006,
68 Ruokolainen & Hanski 2016, Staples et al. 2016). However, the coexistence of ecological
69 similar species involves a strong competition, causing one species to suffer a reduction in
70 fertility, growth or survivorship as a result of resource exploitation (Sarà et al. 2005, Ferguson
71 et al. 2013) or interference (Berger & Gese 2007, Gerald 2015) by the other species. This

72 competition affects the population dynamics, the distribution ranges and the evolution of the
73 competing species (Olsen et al. 2016, Drury et al. 2018, Neves et al. 2018).

74 The competitive exclusion principle states that two ecologically similar species cannot coexist
75 unless they exhibit niche segregation (Gause 1934, Hardin 1960). According to this principle,
76 when the competitive relationship between species is highly asymmetric, with one of the
77 species being competitively superior, the competition leads to extinction of the inferior
78 competitor in the long run (Yackulic 2017). However, competing species can coexist by using
79 available resources differently (i.e. through niche segregation) because this causes a relaxation
80 of the competition pressure between them (Macarthur & Levins 1967). Thus, niche
81 segregation may arise as an ecological effect of interspecific competition, by which the
82 inferior competitor is relegated to a reduced niche (realized niche) where competition is
83 avoided (Begon et al. 2006, Reif et al. 2018). In the absence of the superior competitor, it
84 would be expected that the inferior competitor would expand its niche, up to complete its
85 fundamental niche, as a result of competition release. Conversely, the niche of the inferior
86 competitor could remain unchanged in the absence of the superior competitor as a
87 consequence not of current but of past interspecific competition (Connell 1980). Competition
88 in the past may have triggered an evolutionary response in the inferior competitor towards a
89 fixed contraction or shift of its previous fundamental niche (Futuyma & Moreno 1988, Mason
90 et al. 2008). However, we must be cautious in invoking past competition as the driver of
91 current niche differences (Connell 1980), since niche differences may arise through processes
92 other than interspecific competition (Begon et al. 2006). For example, niche differentiation
93 could be a direct consequence of the adaptive response of the species to the different
94 environmental conditions they experienced in allopatry (e.g. Dufour et al. 2015, Wereszczuk
95 & Zalewski 2015).

96 The greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) and the lesser white-toothed shrew
97 (*Crocidura suaveolens*) are two species of small mammals morphologically and ecologically
98 very similar to each other. Both shrews are extremely similar in their external appearances
99 (Biedma et al. 2019), and they show ranges of body size (head-body length; Hb) and weight
100 (w) that are highly overlapping (Hb = 44-86 mm and w = 5-16 g in *C. russula*; Hb = 50-92
101 mm and w = 3-17 g in *C. suaveolens*; Aulagnier et al. 2009). Moreover, both species feed on
102 the same large variety of preys (generalist insectivores). The diet of *C. russula* is based on
103 invertebrates such as insects, isopods, molluscs and annelids, although it occasionally preys
104 on small vertebrates (Bever 1983, Aulagnier et al. 2009, Brahmi et al. 2012). Similarly, *C.*
105 *suaveolens* bases its diet mainly on invertebrates such as insects, arachnids, isopods and
106 myriapods (Burda & Bauerová 1985, Bauerova 1988), and occasionally on molluscs,
107 amphipods, annelids and small vertebrates (Pernetta 1973, Mienis 1996, Rey 2007).
108 Regarding the use of habitats, both species are described as habitat generalists. *Crocidura*
109 *russula* is an abundant and widespread species in North Africa and southwestern Europe,
110 occurring in all habitat types (Ramalhinho et al. 1999, Aulagnier et al. 2016), from highly
111 anthropized habitats, such as urban areas, gardens and crops, to habitats with high vegetation
112 coverage, such as grasslands, shrublands and forests. It has been cited between sea level and
113 2000 m of altitude, from the marshes (Poitevin et al. 1987, Biedma et al. 2019) to the Boreo-
114 supalpine forests of the Mediterranean mountains (López-Fuster 2007, Torre et al. 2014).
115 *Crocidura suaveolens* occurs in the Palaearctic where it lives in many different habitats
116 (Palomo et al. 2016), from the moist deciduous and steppe forests of central Europe (Libois et
117 al. 1999) to the semidesert areas and dry Mediterranean scrublands of Middle East (Mienis
118 1996, Haim et al. 1997). This species is able to live between sea level and 2500 m of altitude,
119 from the marshes (Poitevin et al. 1987, Cagnin et al. 1998, Biedma et al. 2019), to the
120 subalpine meadows (Meylan & Hausser 1974, Bauerova 1988). In terms of demographics,

121 shrews of the genus *Crocidura* usually reach annual maximum abundance in autumn-winter
122 because that is when the breeding season ends, at least in Mediterranean climate, and
123 individuals from different generations co-occur (Poitevin et al. 1987, Genoud & Vogel 1990,
124 Mortelliti & Boitani 2009, Torre et al. 2018).

125 Due to these great similarities between *C. russula* and *C. suaveolens*, some kind of
126 segregation in their ecological niches should be expected when living in sympatry, because
127 “complete competitors cannot coexist” (Hardin 1960). In fact, in southwestern Europe
128 numerous studies show that there is a highly asymmetric competition between both species,
129 with *C. russula* being the dominant species, managing to displace *C. suaveolens* from large
130 areas (e. g. Niethammer 1979, Cosson et al. 1996, Kraft 2000, Biedma et al. 2018).
131 Furthermore, the fossil record (e.g. Ruiz-Bustos et al. 1984, Montoya et al. 2001, Barroso
132 Ruiz & Desclaux 2006) indicates that the distribution of *C. suaveolens* in southwestern
133 Europe was much more extended before the arrival of *C. russula* in the late Pleistocene than
134 nowadays (Brändli et al. 2005, Cosson et al. 2005, Biedma et al. 2018). These lines of
135 evidence indicate that both the present and past relationship between these two *Crocidura*
136 species is dominated by competition. However, *C. russula* and *C. suaveolens* occur in
137 sympatry in some regions of southwestern Europe (Libois et al. 1999, Ramalhinho et al.
138 1999), the mechanisms that allow their coexistence remaining poorly understood. The scarce
139 evidence available points to habitat segregation as an important coexistence mechanism. For
140 example, Poitevin et al. (1987) found that, in areas of sympatry in southern France, *C. russula*
141 was abundant in all habitat types, while *C. suaveolens* was relegated to the most humid and
142 forested ones, but in Corsica, where *C. russula* was absent, *C. suaveolens* occupied a wider
143 range of habitats, indicating current competition as the driver of niche segregation in
144 sympathy.

145 A similar situation seems to occur in the Gulf of Cádiz, southwestern Iberia. Here, *C. russula*
146 is abundant and widespread and occupies all habitat types, while *C. suaveolens* is a rare
147 species that is present only in tidal marshes located at the mouths of some rivers of the region
148 (Biedma et al. 2019). These marshes are thus the only areas of sympatry for both species in
149 the Gulf of Cádiz. However, within these sympatric marshes there are sites of syntopy (i.e.
150 sites occupied by both species) and allotropy (i.e. sites where only one species occurs). The
151 two species are syntopic only on the edge of the marshes, whereas in the interior of the
152 marshes only *C. suaveolens* has been found (Biedma et al. 2019). The interior of the marshes
153 are dominated by marsh habitats but, sometimes, there are also forest habitat patches. So, the
154 interior of the marshes provides a great opportunity to test whether *C. suaveolens* expands its
155 realized habitat-niche when *C. russula* is absent, and thus whether past competition has
156 caused a stable reduction of the fundamental niche of *C. suaveolens* in this region.

157 Therefore, the aim of this study is to assess whether niche segregation allows the coexistence
158 of *C. russula* and *C. suaveolens* in the sympatric marshes of the Gulf of Cádiz, and whether
159 such niche segregation is the result of current (ecological effect) or past (evolutionary effect)
160 interspecific competition. We specifically focus here on the differences in habitat use (spatial
161 dimension of the niche), because habitat use determines access to resources, and hence could
162 influence directly the reproductive success and survival of species (Powell & Mitchell 2012,
163 Dufour et al. 2015). Moreover, we explored whether both species have different dynamics of
164 seasonal abundances, since competing species can coincide spatially in the use of available
165 resources (here habitat) as long as they avoid overlapping by accessing such resources at
166 different times (temporal dimension of the niche, Albrecht & Gotelli 2001). Given the
167 previous knowledge of the competitive relationship between both species, we expected that
168 the coexistence of *C. russula* and *C. suaveolens* would be facilitated by spatial niche

169 segregation associated to differentiated habitat use patterns, and/or by temporal niche
170 segregation determined by an asynchronous variation of their seasonal abundances.
171 Furthermore, if niche segregation were driven by current interspecific competition, then *C.*
172 *suaveolens*, the supposed inferior competitor, should shift its habitat use patterns in sites of
173 allotopy with respect to sites of syntopy with *C. russula*. By contrast, if niche segregation
174 were the result of an evolutionary response to past competition, then *C. suaveolens* should not
175 shift its habitat use patterns between allotopic and syntopic sites.

176 **MATERIALS AND METHODS**

177 *Study area.*---The study was carried out in the Odiel Marshes Nature Reserve (hereafter
178 OMNR), a marsh area located at the Odiel River mouth, on the coast of the Gulf of Cádiz,
179 southwestern Iberia (Fig. 1). The OMNR was declared a Biosphere Reserve in 1983 by
180 UNESCO and it is one of the most extensive (7185 ha) and diverse marshes of the Iberian
181 Peninsula (Nieva et al. 2005). The climate is Mediterranean oceanic subhumid and it is
182 strongly influenced by the Atlantic Ocean (Gómez-Zotano et al. 2015). Summer is hot and
183 dry; the autumn and winter seasons are mild and concentrate the bulk of the rainfall, while
184 spring has intermediate characteristics. The mean annual rainfall ranges from 500 and 900
185 mm.

186 The two main habitats of the OMNR are the tidal marsh and the Mediterranean forest. Most
187 of the OMNR is formed by tidal marsh, but in the periphery and in some islands in the interior
188 of this Reserve there are extensive habitats of Mediterranean forest (Fig. 1). Mediterranean
189 forest habitats in the interior islands are completely surrounded by tidal marsh habitats. The
190 tidal marsh and the Mediterranean forest are habitats considered of community interest by the
191 Habitats Directive (Directive 92/43/CEE). Tidal marsh habitats of the OMNR are
192 characterized by a high coverage of seagrass and a rather homogeneous structure. Some of the

193 most representative plant associations are: *Puccinellio ibericae-Sarcocornietum perennis*,
194 whose dominant species are *Spartina maritima* and *Sarcocornia perennis*; *Cistancho*
195 *phelypaeae-Sarcocornietum fruticosae*, which is characterized by the presence of *Sarcocornia*
196 *fruticosa* and *Halimione portulacoides*; and *Inulo crithmoidis-Arthrocnemetum macrostachyi*
197 and *Polygono equisetiformis-Limoniastrum monopetalum* with *Arthrocnemum*
198 *macrostachyum* and *Limoniastrum monopetalum* being the most representative species,
199 respectively. Unfortunately, many areas of the OMNR are invaded by the South American
200 neophyte *Spartina densiflora*, which can become the most abundant species in some of the
201 tidal marsh associations mentioned, displacing native vegetation. Mediterranean forests of the
202 OMNR are mainly dominated by *Pinus pinea* and the *Osyrio quadripartitae-Juniperetum*
203 *turbinatae* association, with *Juniperus turbinata*, *Olea europaea* and *Quercus coccifera* trees,
204 and *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea angustifolia* and *Myrtus communis* shrub species. Other
205 common shrub species are *Cistus sp.*, *Halimimum sp.*, gorses *Ulex sp.*, *Stauracanthus*
206 *genistoides* and rosemary *Rosmarinus officinalis*.

207 *Shrew sampling*.---A complete annual live trapping cycle, from spring 2013 to spring 2014
208 (both seasons included), was performed. Shrews were sampled using Trip trap live traps
209 (Trixie Heimtierbedarf, Tarp, Germany) baited with *Tenebrio molitor* (yellow mealworms)
210 larvae. Sampling was conducted in the two habitats of the OMNR, the Mediterranean forest
211 and the tidal marsh, and in two study sites, on the OMNR edge and in the Saltés Island, an
212 island located in the OMNR interior (Fig. 1). One trapping session was performed per season.
213 In each season, a total of 11 trapping lines were established (Table 1 and Fig. 1): 4 in
214 Mediterranean forest (2 on the OMNR edge and 2 on the OMNR interior) and 7 in tidal marsh
215 (2 on the OMNR edge and 5 on the OMNR interior). The number of trapping points set by
216 trapping line ranged between 7 and 15 (Table 1). Trapping points were set at 50 m intervals

217 along the trapping lines. The geographical location (latitude / longitude) of the trapping points
218 was the same in all seasons. Three traps were set in each trapping point to increase the capture
219 probability of shrews and minimize saturation by other small mammals. In each season, traps
220 were active for four and three consecutive nights in Mediterranean forest and tidal marsh,
221 respectively. In the Mediterranean forest traps were active one night more because a low
222 capture rate was obtained in a previous test. All captured individuals were sexed, weighed and
223 measured. Individuals were marked by ear-clipping and immediately released. Our study
224 followed ASM guidelines (Sikes et al. 2016) and was performed with official permit from the
225 competent environmental authority (Junta de Andalucía) and with a positive evaluation of the
226 bioethics committee of the University of Huelva.

227 *Prey availability estimation.*---To estimate the prey availability in the two main habitats of the
228 OMNR, an arthropod sampling was carried out simultaneously with the shrew trapping. Three
229 arthropod pitfall traps (diameter: 7.5 cm, height: 11.7 cm; Siewers et al. 2014) were set in
230 each shrew trapping line. Arthropods were preserved in ethanol (96%) and subsequently
231 determined until the Order level using standard determination keys (Barrientos 1988). All
232 captured individuals were counted and measured (total length) with a precision of 0.5 mm.
233 Total *Arthropoda Dry Mass* (mg) was estimated using allometric equations. For non-
234 crustacean arthropods we used equations of Hódar (1996), whereas for *Isopoda* we used the
235 equation for *Tylos ponticus* (Dias et al. 2005), and for *Amphipoda* the equation for *Orchestia*
236 *gammarellus* (Dias & Sprung 2003). As *Malacostraca* crustaceans (*Isopoda* and *Amphipoda*)
237 represented an important proportion (36%) of the total arthropods dry mass and, specially, of
238 the total arthropods dry mass sampled in tidal marsh habitats (62%), *Malacostraca Dry Mass*
239 (mg) was also estimated and considered as explanatory variable in subsequent analyses.
240 Averaged seasonal values of *Arthropoda Dry Mass* and *Malacostraca Dry Mass* were

241 calculated for each shrew trapping line (using the data of the three arthropod traps set in them)
242 and assigned to all trapping points for shrews set on the same trapping line.

243 *Presence-absence modelling for C. suaveolens and C. russula.*---The presence / absence of
244 *Crocidura* species at each trapping point was predicted based on a small set of explanatory
245 variables (Table 2): *Habitat* (Mediterranean forest /tidal marsh), *Location* (OMNR
246 edge/OMNR interior), *Season*, and prey availability (*Arthropoda Dry Mass* and *Malacostraca
247 Dry Mass*). We considered that a *Crocidura* species was present at a trapping point if it was
248 captured at least once in the season. Correlations between continuous variables were
249 computed through Pearson's correlation coefficients and correlations between categorical and
250 continuous variables were computed using generalized linear models (GLMs). These
251 preliminary analyses revealed a high correlation between *Arthropoda Dry Mass* and
252 *Malacostraca Dry Mass* ($r = 0.51$), and between *Arthropoda Dry Mass* and *Season* ($p =$
253 0.0098). So, these pairs of variables were never included in the same model.

254 Candidate model equations were constructed with each of the explanatory variable defined
255 and with all possible combinations. Candidate model equations were fitted using generalised
256 linear mixed models (GLMM) in SAS v. 9.3 (procedure GLIMMIX; SAS Institute Inc., 2012)
257 with a binomial distribution and logit link function. Models were fitted for each *Crocidura*
258 species separately. The identification code of trapping points nested in the trapping line was
259 modelled as random factor. We selected the most supported model using protocols based on
260 the Akaike information criterion (AIC) and we considered as plausible all models with ΔAIC
261 < 2 (Burnham et al. 2011).

262 *Co-occurrence.*---As sometimes spatial niche segregation could only be appreciable at a fine
263 scale (Firth & Crowe 2010), we used the coefficient of Jaccard (Krebs 1999) to estimate the

264 degree of co-occurrence between *C. russula* (*Cr*) and *C. suaveolens* (*Cs*) in sites of syntopy in
265 the OMNR:

266

$$J = \frac{TPCr1Cs1}{(TPCr1Cs1) + (TPCr1Cs0) + (TPCr0Cs1)}$$

267 Where $TPCr1Cs1$ was the number of trapping points where both species were captured
268 together (i.e. both species co-occurred) during the same season and $TPCr1Cs0$ (respectively,
269 $TPCr0Cs1$) was the number of trapping points where only *C. russula* (respectively, *C.*
270 *suaveolens*) was captured. The coefficient of Jaccard varies from 0 (the two species are never
271 captured together), through 0.5 (independence), to 1 (the two species are always captured
272 together). To test significance, observations of all seasons were bootstrapped (10000
273 replicates), and the observed value of the coefficient of Jaccard was considered significant if
274 the 95% confidence interval of the bootstrap distribution did not include 0.5.

275

RESULTS

276 A total of 355 individuals of *C. suaveolens* and 44 individuals of *C. russula* were captured
277 throughout the annual trapping cycle in the OMNR (Table 3), using a trapping effort of 6459
278 trap-nights (3264 trap-nights in Mediterranean forest and 3195 trap-nights in tidal marsh).
279 Practically all individuals of *C. russula* (42 individuals) were captured on the OMNR edge,
280 both in Mediterranean forest and in tidal marsh, although its capture rate was twice as high in
281 tidal marsh as in Mediterranean forest (Table 3). *Crocidura russula* was practically absent on
282 the OMNR interior, where only two individuals of this species were captured in the tidal
283 marsh habitat (Table 3). Overall capture rate of *C. russula* on the OMNR edge was moderate
284 while on the OMNR interior its capture rate was practically null (17.5 and 0.5 individuals per
285 100 trapping points, respectively, Fig. 2). Regarding habitats, overall capture rate of *C.*
286 *russula* was similar in Mediterranean forest and tidal marsh (6.3 and 7.6, respectively, Fig. 2).

287 With respect to *C. suaveolens*, it was present both on the edge and in the interior of the
288 OMNR, but all 355 individuals of *C. suaveolens* were captured in tidal marsh habitat, being
289 this species absent in Mediterranean forest (Table 3). Overall capture rate of *Crocidura*
290 *suaveolens* on the OMNR interior was twice as high as on the OMNR edge (70.8 and 33.7
291 individuals per 100 trapping points, respectively, Fig. 2), and its capture rate in tidal marsh
292 habitat was high (100 individuals per 100 trapping points, Fig. 2).

293 As *C. russula* was practically only found on the OMNR edge (95.4% of the captures), and *C.*
294 *suaveolens* only in tidal marsh habitat (100% of the captures), the variable *Location* could not
295 be used to model the presence of *C. russula*, and the variable *Habitat* could not be used to
296 model the presence of *C. suaveolens*. In these particular cases, a low or null number of
297 presences in one of the two levels of these variables caused the models to not converge. For
298 *C. russula* the best model included as predictors *Season* and *Habitat* (*S+H*) (Table 4). A
299 second model including only *Season* (*S*) as a predictor was also supported ($\Delta\text{AIC} < 2$). The
300 probability of capture of *C. russula* was higher in spring and lower in autumn (Fig. 3), and
301 higher in tidal marsh than in Mediterranean forest (Fig. 4). The *Arthropoda Dry Mass* had a
302 positive low effect on the probability of capture of *C. russula* (Table 4). For *C. suaveolens* the
303 best model included *Season*, *Location* and *Malacostraca Dry Mass* as predictors
304 (*S+L+MDM*) (Table 4). The probability of capture of *C. suaveolens* was highest in autumn
305 and lowest in spring (Fig. 3), greater on the OMNR interior than on the OMNR edge (Fig. 4),
306 and it was positively related to the availability of *Malacostraca Dry Mass* (Fig. 5).

307 In sites of syntopy of the OMNR (i.e. in tidal marsh habitats of the OMNR edge), the degree
308 of co-occurrence between *C. russula* and *C. suaveolens* was very low. Only on 4 occasions of
309 100 possible both species were captured at the same trapping points during the same season

310 (Table 5). The value of the Jaccard coefficient obtained was very close to zero and significant:
311 $J = 0.07$ (0.02-0.14; 95% confidence interval).

312 **DISCUSSION**

313 Our results confirm that the coexistence of *C. russula* and *C. suaveolens* in the OMNR was
314 favoured by both spatial and temporal niche segregation, supporting the predictions postulated
315 by the competitive exclusion principle (Gause 1934, Hardin 1960). As expected for a habitat
316 generalist species, *C. russula* was present in the two habitats of the OMNR (Table 3, Fig. 2).
317 However, contrary to expectations, *C. suaveolens* was found only in tidal marsh habitat, being
318 never captured in Mediterranean forest (Table 3, Fig. 2). The capture rates of both species in
319 the OMNR were also very different from what was expected. In Western Europe, *C.*
320 *suaveolens* is much less abundant than *C. russula* when sympatric (Libois et al. 1999),
321 however, the capture rate of *C. suaveolens* in the OMNR was eight times higher than the
322 capture rate of *C. russula* (56.6 and 7.0 individuals captured by 100 trapping points,
323 respectively, Table 3). Therefore, the marshes of the Gulf of Cádiz are, along with some
324 coastal areas of southern France (Poitevin et al. 1987), the only known places where *C.*
325 *suaveolens* is more abundant than *C. russula* when sympatric.

326 Interestingly, in the OMNR, *C. suaveolens* did not occupy the Mediterranean forest even
327 when *C. russula* was absent (i.e. the Mediterranean forest habitats of the OMNR interior, on
328 the Saltés Island, Table 3 and Fig. 1). We expected that if niche segregation were
329 consequence of current competition between the species, in the absence of the hypothetical
330 superior competitor (i.e. *C. russula*), the inferior (i.e. *C. suaveolens*) would expand its habitat
331 niche. However, this has not happened. *Crocidura suaveolens* did not expand its habitat niche
332 in the absence of *C. russula* indicating that *C. suaveolens* niche is restricted, but not by
333 current competition with *C. russula*. Surprisingly, the Mediterranean forest does not seem to

334 be part of the fundamental niche of *C. suaveolens* in the Gulf of Cádiz. At this point, it is
335 necessary to remark that the Mediterranean forest habitats of the OMNR are well preserved,
336 having a high structural complexity and diverse invertebrate communities (Supplementary
337 Data SD1). So, a low habitat quality cannot explain the absence of *C. suaveolens* in
338 Mediterranean forest habitats. Nor it can be argued that *C. suaveolens* is not a typical species
339 of the Mediterranean forest, since it is a common habitat for this species in other parts of its
340 range where *C. russula* is absent, such as Corsica, Italy and Israel (Poitevin et al. 1987, Haim
341 et al. 1997, Cagnin et al. 1998, Mortelliti & Boitani 2009). Consequently, there is no evidence
342 to suggest that the specialization of *C. suaveolens* could be due to optimal habitat selection
343 (Wereszczuk & Zalewski 2015). Therefore, the restriction of the niche habitat observed for *C.*
344 *suaveolens* in the Gulf of Cádiz may have arisen as an evolutionary response of this species to
345 the past competition with *C. russula*.

346 We are aware that it is really difficult to know if past competition has been the ultimate driver
347 of observed niche differences. Furthermore, as Connell (1980) warns, we must be cautious
348 and not attribute all observed niche differences to the “ghost of past competition”. However,
349 in this specific case, the evidence from the fossil record, the knowledge about the ecological
350 niche of these two *Crocidura* species and our findings in the OMNR suggest that the observed
351 niche differences may have arisen as a result of past competition. Based on this set of
352 evidence gathered, we have outlined a possible reconstruction of how the niches of both
353 species may have evolved in the Gulf of Cádiz.

354 Based on the fossil record (e.g. Ruiz-Bustos et al. 1984, Montoya et al. 2001, Barroso Ruiz &
355 Desclaux 2006), it is known that the distribution of *C. suaveolens* in southwestern Europe was
356 wider than nowadays, and that its range reduction coincides with the arrival of *C. russula* in
357 the late Pleistocene (Brändli et al. 2005, Cosson et al. 2005, Biedma et al. 2018). So, it is not

358 unreasonable to think that competition with the newly arrived species was the cause of the
359 contraction of the *C. suaveolens* range. In fact, we have recently shown how the
360 phylogeography of *C. suaveolens* in Iberia has been shaped by competition by *C. russula*
361 (Biedma et al. 2018). Thus, in most of the habitats of the Gulf of Cádiz, the competitive
362 superiority of *C. russula* would have caused the extinction of *C. suaveolens*. However, it is
363 possible that the individuals of *C. suaveolens* inhabiting the tidal marshes could somehow
364 escape from the competition exerted by *C. russula*. Maybe in this exceptionally humid
365 habitat, *C. suaveolens* had some competitive advantage (in fertility, growth or survivorship)
366 over *C. russula*, a more thermophilic species (Torre et al. 2014, Torre et al. 2018) that reaches
367 its optimum in dry Mediterranean climate (López-Fuster 2007, Aulagnier et al. 2016). The
368 tidal marsh is a habitat subjected to periodic flooding where the predominant preys are
369 *Malacostraca* crustaceans (62%, Supplementary Data SD1), which are not frequent preys for
370 these shrews (Bauerova 1988, Brahmi et al. 2012). In this sense, the great ethological and
371 ecological plasticity of *C. suaveolens* (Pernetta 1973) could favour initially its survival in
372 these habitats compared to *C. russula*. In fact, the presence of *C. suaveolens* in the OMNR
373 was very influenced by the availability of *Malacostraca Dry Mass* (Fig. 5). Natural selection
374 may have then generated specific adaptations to tidal marshes in *C. suaveolens*, apparently
375 associated to a loss of the capacity to live in, or the loss of preference for, other habitats,
376 resulting in a habitat specialization that ultimately favoured the stable coexistence of both
377 species in the region (Begon et al. 2006). Indeed, habitat specialization is an effective
378 mechanism of coexistence among competing species (Morris 1996), being the coexistence of
379 similar species favoured when they have a different degree of specialization (Soto &
380 Palomares 2015).

381 In this study, we have also confirmed the practical absence of *C. russula* on the Saltés Island
382 (OMNR interior, Table 3, Fig. 1). We attribute the only two individuals found there to a
383 recent human accidental introduction (a large amount of fill material was brought in to build
384 an access road), since there does not seem to be a population of *C. russula* on this island.
385 Maybe the Saltés Island is inaccessible for this species because of the water channels.
386 Nevertheless, access to this island is not a problem for its congener *C. suaveolens* and nor for
387 other species of the small mammal community captured in this study such as *Mus spretus* and
388 *Suncus etruscus*, or previously cited by us, such as *Rattus norvegicus* (Biedma et al. 2019).
389 So, an alternative hypothesis is that *C. suaveolens* is preventing the establishment of *C.*
390 *russula* on islands of the OMNR interior. This supposes that, unlike what is usually described
391 in other Mediterranean areas (Libois et al. 1999), the competitive dominant species in tidal
392 marsh habitats is not *C. russula* but *C. suaveolens*. This is plausible because habitat specialists
393 are usually the dominant species in interspecific competitive relationships in their specific
394 habitats, being able to displace competitors (Morris 1996, Büchi & Vuilleumier 2014).
395 Therefore, the absence of both *Crocidura* species in the Mediterranean forest habitats in the
396 Saltés Island can be explained; *C. suaveolens* is not able to inhabit them because of its
397 specialization in the tidal marsh habitat, and *C. russula* could not colonize these forest
398 habitats because they are completely surrounded by tidal marsh habitats, where *C. suaveolens*
399 is dominant and acts as a biological barrier for *C. russula*.

400 The competitive superiority of *C. suaveolens* in tidal marsh habitats would also be supported
401 by the fact that *C. russula* is abundant in others tidal marshes of the Gulf of Cádiz (Biedma et
402 al. 2019) and southwestern Europe where *C. suaveolens* is absent (Marques et al. 2015, van
403 der Ende et al. 2017). So, *C. russula* only seems to be scarce or even absent in tidal marshes
404 occupied by *C. suaveolens*. Furthermore, the low degree of co-occurrence recorded on the

405 OMNR edge also supports current competition between these species [Table 5; $J = 0.07$ (0.02-
406 0.14; 95% confidence interval)], and probably this competition is determining their
407 segregation by habitat but, interestingly, not in the direction we expected. Thus, in the Gulf of
408 Cádiz, *C. russula* is competitively excluded from tidal marshes by *C. suaveolens*, which is the
409 only known case where the relationship of competition between these species is reversed.

410 Regarding the temporal dimension of the niche, *C. suaveolens* had patterns of seasonal
411 abundances concordant with those described for the genus *Crocidura* in Mediterranean areas
412 (Poitevin et al. 1987, Genoud & Vogel 1990, Mortelliti & Boitani 2009), while *C. russula*
413 showed patterns of seasonal abundances totally inverse to these (Fig. 3). The unusual patterns
414 of seasonal abundances in *C. russula* do not seem to be explained by prey availability, since
415 the season of maximum abundance of *C. russula* (spring, Fig. 3) did not correspond with the
416 season of maximum prey availability (summer in Mediterranean forest and autumn in tidal
417 marsh, Supplementary Data SD1). Moreover, in other Mediterranean habitats of Iberia where
418 *C. suaveolens* is absent, *C. russula* shows seasonal abundance patterns concordant with those
419 described for the genus in Mediterranean areas (Torre et al. 2018). So, again interspecific
420 competition may explain these unusual patterns of *C. russula* in the OMNR. In fact, the
421 habitat use patterns observed for both species in sites of syntopy in the OMNR (i.e. tidal
422 marshes of the OMNR edge) are concordant with the predictions of the optimal foraging
423 theory (Isoleg theory; Pimm & Rosenzweig 1981, Rosenzweig 1981). According to this
424 theory, *C. russula* (the subordinate generalist species) reached its maximum abundance in
425 spring-summer because it may be occupying tidal marsh habitats in an opportunistic way,
426 since the abundance of *C. suaveolens* (the dominant specialist species) was somewhat lower
427 in these seasons (Fig. 3). Conversely, the high abundance of *C. suaveolens* in autumn-winter
428 would cause a low abundance of *C. russula*. In this way, the coexistence of both species in the

429 OMNR edge is favoured because *C. russula* segregates from *C. suaveolens* both spatially, by
430 occupying the Mediterranean forest adjacent to the tidal marsh, and temporally, by using the
431 tidal marsh in different seasons.

432 In conclusion, the coexistence between *C. russula* and *C. suaveolens* in the marshes of the
433 Gulf of Cádiz is facilitated by spatial and temporal niche segregation. This niche segregation
434 is the result of two competitive processes that have acted at different times. Probably, a first
435 process of interspecific competition in the past triggered an evolutionary response in *C.*
436 *suaveolens* that caused this species to specialize in tidal marsh. The habitat specialization of
437 *C. suaveolens* may have favoured its coexistence with *C. russula* by reversing the competitive
438 relationship between both species. This is concordant with a second process of current
439 interspecific competition, in which the specialist *C. suaveolens*, the competitively dominant
440 species, is driving an ecological response of *C. russula* consisting of a restriction of its
441 fundamental niche to the exclusion of tidal marsh habitats from its realized niche in the Gulf
442 of Cádiz. Therefore, this study exemplifies how interspecific competition can lead to habitat
443 specialization and how such specialization can favor the coexistence of ecologically similar
444 species.

445 **ACKNOWLEDGMENTS**

446 We thank the Junta de Andalucía for granting us the permits to sample in the Odiel Marshes
447 Natural Reserve. We thank Enrique Martínez Montes, director of the Odiel Marshes Natural
448 Reserve, his kind attention and disposition as well as environmental agents who assisted us
449 with the sampling. Logistical support was provided by University of Huelva. L.B. benefited
450 from a FPU fellowship (2013-2017) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

451

452

SUPPLEMENTARY DATA

453 **Supplementary Data SD1.**--Prey availability by *Habitat* and *Season* in the Odiel Marshes
454 Natural Reserve (OMNR). Preys are shown grouped by Class. For each Class, the average
455 number of individuals caught per trap and the average dry mass per trap (in parentheses) are
456 shown. *n* is the number of arthropod traps used in each season.

457

LITERATURE CITED

458 ALBRECHT, M. AND N. J. GOTELLI. 2001. Spatial and temporal niche partitioning in
459 grassland ants. *Oecologia* 126:134-141.

460 AULAGNIER, S., P. HAFFNER, A. MITCHELL-JONES, F. MOUTOU, AND J. ZIMA. 2009.
461 Guía de los mamíferos de Europa, del norte de África y de Oriente Medio. Lynx Edicions,
462 Barcelona.

463 AULAGNIER, S., et al. 2016. *Crocidura russula*. In: IUCN 2016. The IUCN Red List of
464 Threatened Species. (Errata version published in 2017). www.iucnredlist.org. Accessed 04
465 January 2019.

466 BARRIENTOS, J. A. 1988. Bases para un curso práctico de entomología. Asociación
467 Española de Entomología, Barcelona.

468 BARROSO RUIZ, C. AND E. DESCLAUX. 2006. Les insectívoros (Mammalia, Insectivora)
469 du pléistocène supérieur de la grotte du Boquete de Zafarraya. Pp. 979-997 in La grotte du
470 Boquete de Zafarraya, Málaga, Andalousie, Tome II (C. Barroso Ruiz and H. De Lumley,
471 eds.). Junta de Andalucía, Consejería de Cultura, Sevilla.

472 BAUEROVA, Z. 1988. The food of *Crocidura suaveolens*. *Folia Zoologica* 37:301-308.

473 BEGON, M., C. R. TOWNSEND, AND J. L. HARPER. 2006. Ecology: from individuals to
474 ecosystems, 4th ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

- 475 BERGER, K. M. AND E. M. GESE. 2007. Does interference competition with wolves
476 limit the distribution and abundance of coyotes? *Journal of Animal Ecology* 76:1075-1085.
- 477 BEVER, K. 1983. Zur Nahrung der Hausspitzmaus, *Crocidura russula* (Hermann
478 1780). *Säugetierkundliche Mitteilungen* 31:13-26.
- 479 BIEDMA, L., J. ROMÁN, J. CALZADA, G. FRIIS, AND J. A. GODOY. 2018. Phylogeography
480 of *Crocidura suaveolens* (Mammalia: Soricidae) in Iberia has been shaped by competitive
481 exclusion by *C. russula*. *Biological Journal of the Linnean Society* 123:81-95.
- 482 BIEDMA, L., J. ROMÁN, J. A. GODOY, AND J. CALZADA. 2019. Using owl pellets to infer
483 habitat associations and clarify the regional distribution of a cryptic shrew. *Journal of
484 Zoology* In press.
- 485 BRAHMI, K., S. AULAGNIER, S. SLIMANI, C. MANN, S. DOUMANDJI, AND B. BAZIZ.
486 2012. Diet of the greater white-toothed shrew *Crocidura russula* (Mammalia: Soricidae) in
487 Grande Kabylie (Algeria). *Italian Journal of Zoology* 79:239-245.
- 488 BRÄNDLI, L., L.-J. L. HANDLEY, P. VOGEL, AND N. PERRIN. 2005. Evolutionary history
489 of the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) inferred from analysis of mtDNA, Y,
490 and X chromosome markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:832-844.
- 491 BÜCHI, L. AND S. VUILLEUMIER. 2014. Coexistence of specialist and generalist species
492 is shaped by dispersal and environmental factors. *American Naturalist* 183:612-624.
- 493 BURDA, H. AND Z. BAUEROVÁ. 1985. Hearing adaptations and feeding ecology in
494 *Sorex araneus* and *Crocidura suaveolens* (Soricidae). *Acta Zoologica Fennica* 173:253-254.
- 495 BURNHAM, K. P., D. R. ANDERSON, AND K. P. HUYVAERT. 2011. AIC model selection
496 and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and
497 comparisons. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65:23-35.

- 498 CAGNIN, M., et al. 1998. Comparative study of Spanish and Italian terrestrial small
499 mammal coenoses from different biotopes in Mediterranean peninsular tip regions. *Journal of*
500 *Biogeography* 25:1105-1113.
- 501 CONNELL, J. H. 1980. Diversity and the Coevolution of Competitors, or the Ghost of
502 Competition Past. *Oikos* 35:131-138.
- 503 COSSON, J. F., R. HUTTERER, R. LIBOIS, M. SARÀ, P. TABERLET, AND P. VOGEL. 2005.
504 Phylogeographical footprints of the Strait of Gibraltar and Quaternary climatic fluctuations in
505 the western Mediterranean: a case study with the greater white-toothed shrew, *Crocidura*
506 *russula* (Mammalia: Soricidae). *Molecular Ecology* 14:1151-1162.
- 507 COSSON, J. F., M. PASCAL, AND F. BIORET. 1996. Origine et répartition des
508 musaraignes du genre *Crocidura* dans les îles bretonnes. *Vie et Milieu-Life and Environment*
509 46:233-244.
- 510 DIAS, N. AND M. SPRUNG. 2003. Population dynamics and production of the amphipod
511 *Orchestia gammarellus* (Talitridae) in a Ria Formosa saltmarsh (Southern Portugal).
512 *Crustaceana* 76:1123-1141.
- 513 DIAS, N., M. SPRUNG, AND M. HASSALL. 2005. The abundance and life histories of
514 terrestrial isopods in a salt marsh of the Ria Formosa lagoon system, southern Portugal.
515 *Marine Biology* 147:1343-1352.
- 516 DRURY, J. P., J. A. TOBIAS, K. J. BURNS, N. A. MASON, A. J. SHULTZ, AND H. MORLON.
517 2018. Contrasting impacts of competition on ecological and social trait evolution in
518 songbirds. *PLoS Biology* 16:e2003563.
- 519 DUFOUR, C. M. S., et al. 2015. Space use variation in co-occurring sister species:
520 response to environmental variation or competition? *PLOS ONE* 10:e0117750.

- 521 FERGUSON, N., C. R. WHITE, AND D. J. MARSHALL. 2013. Competition in benthic
522 marine invertebrates: the unrecognized role of exploitative competition for oxygen. *Ecology*
523 94:126-135.
- 524 FIRTH, L. B. AND T. P. CROWE. 2010. Competition and habitat suitability: small-scale
525 segregation underpins large-scale coexistence of key species on temperate rocky shores.
526 *Oecologia* 162:163-174.
- 527 FUTUYMA, D. J. AND G. MORENO. 1988. The Evolution of Ecological Specialization.
528 *Annual Review of Ecology and Systematics* 19:207-233.
- 529 GAUSE, G. 1934. The struggle for existence. Williams and Wilkins, Baltimore.
- 530 GENOUD, M. AND P. VOGEL. 1990. Energy requirements during reproduction and
531 reproductive effort in shrews (Soricidae). *Journal of Zoology* 220:41-60.
- 532 GERALDI, N. R. 2015. Prey size structure diminishes cascading effects by increasing
533 interference competition and predation among prey. *Ecology* 96:2533-2543.
- 534 GÓMEZ-ZOTANO, J., J. ALCÁNTARA-MANZANARES, J. A. OLMEDO-COBO, AND E.
535 MARTÍNEZ-IBARRA. 2015. La sistematización del clima mediterráneo: identificación,
536 clasificación y caracterización climática de Andalucía (España). *Revista de Geografía Norte*
537 Grande 61:161-180.
- 538 HAIM, A., A. ROZENFELD, AND I. IZHAKI. 1997. Post-fire response of shrews
539 (*Crocidura suaveolens*) on Mount Carmel, Israel. *Mammalia* 61:527-536.
- 540 HARDIN, G. 1960. The competitive exclusion principle. *Science* 131:1292-1297.
- 541 HÓDAR, J. A. 1996. The use of regression equations for estimation of arthropod
542 biomass in ecological studies. *Acta Oecologica* 17:421-433.
- 543 KRAFT, R. 2000. Ehemalige und aktuelle Verbreitung von Hausspitzmaus, *Crocidura*
544 *russula* (Hermann 1780), und Gartenspitzmaus, *Crocidura suaveolens* (Pallas 1811), in
545 Bayern. *Bonner Zoologische Beiträge* 49:115-130.

- 546 KREBS, C. J. 1999. Ecological Methodology, 2nd ed. Addison-Welsley Educational
547 Publishers, Inc., Menlo Park, California.
- 548 LEIBOLD, M. A. AND M. A. MCPEEK. 2006. Coexistence of the niche and neutral
549 perspectives in community ecology. *Ecology* 87:1399-1410.
- 550 LIBOIS, R., M. G. RAMALHINHO, AND R. FONS. 1999. *Crocidura suaveolens* (Pallas
551 1811), the lesser-white toothed shrew. Pp. 72-73 in *Atlas of European mammals* (A. J.
552 Mitchell-Jones et al., eds.). The Academic Press, London, UK.
- 553 LÓPEZ-FUSTER, M. J. 2007. *Crocidura russula* (Hermann 1780). Pp. 125-127 in *Atlas*
554 y *Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España* (L. J. Palomo, J. Gisbert, and J. C.
555 Blanco, eds.). Dirección General para la Biodiversidad -SECEM-SECEMU, Madrid.
- 556 MACARTHUR, R. AND R. LEVINS. 1967. The limiting similarity, convergence, and
557 divergence of coexisting species. *American Naturalist* 101:377-385.
- 558 MARQUES, S. F., R. G. ROCHA, E. S. MENDES, C. FONSECA, AND J. P. FERREIRA. 2015.
559 Influence of landscape heterogeneity and meteorological features on small mammal
560 abundance and richness in a coastal wetland system, NW Portugal. *European Journal Of*
561 *Wildlife Research* 61:749-761.
- 562 MASON, N. W. H., P. IRZ, C. LANOISELÉE, D. MOUILLOT, AND C. ARGILLIER. 2008.
563 Evidence that niche specialization explains species–energy relationships in lake fish
564 communities. *Journal of Animal Ecology* 77:285-296.
- 565 MEYLAN, A. AND J. HAUSSER. 1974. Position cytotaxonomique de quelques
566 musaraignes de genre *Crocidura*, au Tessin (Mammalia, Insectivora). *Revue Suisse de*
567 *Zoologie* 81:701-710.
- 568 MIENIS, H. 1996. Selective predation on *Monacha haifaensis* (Mollusca: Gastropoda)
569 by *Crocidura suaveolens* (Mammalia: Insectivora). *Nachrichtenblatt der Ersten Vorarlberger*
570 *Malakologische Gesellschaft* 4:43-46.

- 571 MONTOYA, P., et al. 2001. Une faune très diversifiée du Pléistocène inférieur de la
572 Sierra de Quibas (province de Murcia, Espagne). Comptes Rendus de l'Académie des
573 Sciences-Series IIA. Earth and Planetary Sciences 332:387-393.
- 574 MORRIS, D. W. 1996. Coexistence of specialist and generalist rodents via habitat
575 selection. Ecology 77:2352-2364.
- 576 MORTELLITI, A. AND L. BOITANI. 2009. Distribution and coexistence of shrews in
577 patchy landscapes: A field test of multiple hypotheses. Acta Oecologica 35:797-804.
- 578 NEVES, T., J. T. TAPISSO, M. PORTO, H. M. PEREIRA, M. L. MATHIAS, AND L. BORDA-
579 DE-ÁGUA. 2018. The role of competition in driving species global distributions: Soricid
580 shrews as a case study. Journal of Biogeography 0:1-11.
- 581 NIETHAMMER, J. 1979. Arealveränderungen bei Arten der Spitzmausgattung
582 *Crocidura* in der Bundesrepublik Deutschland. Säugetierkundliche Mitteilungen 27:132-144.
- 583 NIEVA, F. J. J., E. M. CASTELLANOS, J. M. CASTILLO, AND M. E. FIGUEROA. 2005.
584 Clonal growth and tiller demography of the invader cordgrass *Spartina densiflora* brongn. at
585 two contrasting habitats in sw european salt marshes. Wetlands 25:122-129.
- 586 OLSEN, S. L., J. P. TÖPPER, O. SKARPAAS, V. VANDVIK, AND K. KLANDERUD. 2016.
587 From facilitation to competition: temperature-driven shift in dominant plant interactions
588 affects population dynamics in seminatural grasslands. Global Change Biology 22:1915-1926.
- 589 PALOMO, L., B. KRYŠTUFEK, G. AMORI, AND R. HUTTERER. 2016. *Crocidura*
590 *suaveolens*. In: IUCN 2016. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2016.
591 www.iucnredlist.org. Accessed 04 January 2019.
- 592 PERNETTA, J. C. 1973. The ecology *Crocidura suaveolens cassiteridum* (Hinton) in a
593 coastal habitat. Mammalia 37:241-256.
- 594 PIMM, S. L. AND M. L. ROSENZWEIG. 1981. Competitors and habitat use. Oikos 37:1-6.

- 595 POITEVIN, F., J. CATALAN, R. FONS, AND H. CROSET. 1987. Biologie évolutive des
596 populations Ouest-Européennes de Crocidures (Mammalia, insectivora). II - Ecologie
597 comparée de *Crocidura russula* (Hermann 1780) et de *Crocidura suaveolens* (Pallas 1811)
598 dans le midi de la France et en Corse : rôle probable de la compétition dans le partage des
599 milieux. Revue d'ecologie-la terre et la vie 42:32-58.
- 600 POWELL, R. A. AND M. S. MITCHELL. 2012. What is a home range? Journal of
601 Mammalogy 93:948-958.
- 602 RAMALHINHO, M. G., R. LIBOIS, AND R. FONS. 1999. *Crocidura russula* (Hermann
603 1780), the greater-white toothed shrew. Pp. 68-69 in Atlas of European Mammals (A. J.
604 Mitchell-Jones et al., eds.). The Academic Press, London, UK.
- 605 REIF, J., R. REIFOVÁ, A. SKORACKA, AND L. KUCZYŃSKI. 2018. Competition-driven
606 niche segregation on a landscape scale: Evidence for escaping from syntopy towards allotropy
607 in two coexisting sibling passerine species. Journal of Animal Ecology 87:774-789.
- 608 REY, J. M. 2007. *Crocidura suaveolens* (Pallas 1811). Pp. 125-127 in Atlas y Libro
609 Rojo de los Mamíferos Terrestres de España (L. J. Palomo, J. Gisbert, and J.C. Blanco, eds.).
610 Dirección General para la Biodiversidad -SECEM-SECEMU, Madrid.
- 611 ROSENZWEIG, M. L. 1981. A theory of habitat selection. Ecology 62:327-335.
- 612 RUIZ-BUSTOS, A., J. M. VARGAS, J. CAMPRODÓN, AND V. SANS-COMA. 1984. Die
613 Gartenspitzmaus, *Crocidura suaveolens* (Pallas 1811) im Jungpleistozän (Wurm I) von
614 Südspanien. Säugetierkundliche Mitteilungen 31:251-256.
- 615 RUOKOLAINEN, L. AND I. HANSKI. 2016. Stable coexistence of ecologically identical
616 species: conspecific aggregation via reproductive interference. Journal of Animal Ecology
617 85:638-647.

- 618 SARÀ, M., A. MILAZZO, W. FALLETTA, AND E. BELLIA. 2005. Exploitation competition
619 between hole-nesters (*Muscardinus avellanarius*, Mammalia and *Parus caeruleus*, Aves) in
620 Mediterranean woodlands. *Journal of Zoology* 265:347-357.
- 621 SAS INSTITUTE INC. 2012. What's new in SAS® 9.3. SAS Institute, Inc. Cary, North
622 Carolina.
- 623 SIEWERS, J., J. SCHIRMEL, AND S. BUCHHOLZ. 2014. The efficiency of pitfall traps as a
624 method of sampling epigean arthropods in litter rich forest habitats. *European Journal of
625 Entomology* 111:69-74.
- 626 SIKES, R. S., AND THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY
627 OF MAMMALOGISTS. 2016. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the
628 use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy* 97:663–688.
- 629 SOTO, C. AND F. PALOMARES. 2015. Coexistence of sympatric carnivores in relatively
630 homogeneous Mediterranean landscapes: functional importance of habitat segregation at the
631 fine-scale level. *Oecologia* 179:223-235.
- 632 STAPLES, T. L., J. M. DWYER, X. LOY, AND M. M. MAYFIELD. 2016. Potential
633 mechanisms of coexistence in closely related forb. *Oikos* 125:1812-1823.
- 634 TORRE, I., M. DÍAZ, AND A. ARRIZABALAGA. 2014. Additive effects of climate and
635 vegetation structure on the altitudinal distribution of greater white-toothed shrews *Crocidura
636 russula* in a Mediterranean mountain range. *Acta Theriologica* 59:139-147.
- 637 TORRE, I., A. RASPALL, A. ARRIZABALAGA, AND M. DÍAZ. 2018. SEMICE: An
638 unbiased and powerful monitoring protocol for small mammals in the Mediterranean Region.
639 *Mammalian Biology* 88:161-167.
- 640 VAN DER ENDE, M., A. M. STRIJKSTRA, E. DIAS, AND C. SMIT. 2017. Spatial ecology
641 and prey choice of tagged feral cats on the island of Schiermonnikoog. *Lutra* 60:73-91.

- 642 WERESZCZUK, A. AND A. ZALEWSKI. 2015. Spatial niche segregation of sympatric
643 stone marten and pine marten – Avoidance of competition or selection of optimal habitat?
644 PLOS ONE 10:e0139852.
- 645 YACKULIC, C. B. 2017. Competitive exclusion over broad spatial extents is a slow
646 process: evidence and implications for species distribution modeling. Ecography 40:305-313.

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

FIGURE LEGENDS

662 Figure 1. Map of the study area showing the locations of the trapping lines on the edge (a) and
663 on the interior (Saltés Island, b) of the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR), Gulf of
664 Cádiz, southwestern Iberia. The tidal marsh habitat is shown with a dotted fill pattern and the
665 Mediterranean forest habitat in dark grey. Other habitat types (mainly crops) are shown in
666 white. Urban and industrial areas are shown with a squared fill pattern. The salt water is
667 shown in light grey. Trapping lines set in Mediterranean forest habitat (black stars) and tidal
668 marsh habitat (black squares) are also shown.

669 Figure 2. Overall capture rates of *Crocidura russula* (*Cr*) and *Crocidura suaveolens* (*Cs*) by
670 *Location* and *Habitat* in the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR). Capture rates are
671 shown as the number of individuals captured by 100 trapping points (TP). See also Table 3
672 for detailed capture rates by *Location* and *Habitat*.

673 Figure 3. Seasonal dynamics of the capture probabilities of *Crocidura suaveolens* and
674 *Crocidura russula* in the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR). Captures probabilities are
675 shown as lsmean ($\pm 95\%$ confidence interval).

676 Figure 4. Capture probability of *Crocidura suaveolens* depending on the *Location* and of
677 *Crocidura russula* depending on the *Habitat* in the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR).
678 Captures probabilities are shown as lsmean ($\pm 95\%$ confidence interval). The variable *Habitat*
679 was not included in the models of *C. suaveolens* because the capture probability of this
680 species in the Mediterranean forest habitat was zero. The variable *Location* was not included
681 in the models of *C. russula* because the capture probability of this species on the OMNR
682 interior was virtually zero.

683 Figure 5. Capture probability of *Crocidura suaveolens* depending on the availability of
684 *Malacostraca Dry Mass* in the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR). Only the model
685 results for *Season* with the minimum (Spring 2013) and maximum (Autumn 2013) capture
686 probabilities are shown. The location on the OMNR edge is represented with continuous lines
687 and the location on the OMNR interior with discontinuous lines.

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

For Review Only

707

TABLES

708 Table 1. Number of trapping lines (TL) and trapping points (TP) set by *Location*, *Habitat* and
 709 *Season* in the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR).

<i>Location</i>	<i>Habitat</i>	Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring
		2013	2013	2013	2014	2014
		TL/TP	TL/TP	TL/TP	TL/TP	TL/TP
OMNR edge	Med. Forest	2/20	2/30	2/30	2/30	2/30
	Tidal marsh	2/20	2/20	2/20	2/20	2/20
OMNR interior	Med. Forest	2/24	2/27	2/27	2/27	2/27
	Tidal marsh	5/51	5/51	5/51	5/51	5/51
TOTAL		11/115	11/128	11/128	11/128	11/128

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721 Table 2. Explanatory variables used to model the capture probability of *Crocidura* shrews in
 722 the Odiel Marshes Nature Reserve (OMNR).

Type	Variable	Abbreviation	Definition	Range
<hr/>				
Categorical				
<hr/>				
Temporal				
	<i>Season</i>	<i>S</i>	Season of the year	Spring 2013, Summer 2013, Autumn 2013, Winter 2014 and Spring 2014
<hr/>				
Spatial				
	<i>Location</i>	<i>L</i>	Location on the OMNR	OMNR edge / OMNR interior
	<i>Habitat</i>	<i>H</i>	Main habitats of the OMNR	Med. Forest / Tidal marsh
<hr/>				
Continuous				
<hr/>				
Prey availability			Mean	C.I.
<i>Arthropoda Dry Mass</i>			Total dry mass of arthropods (in mg)	163 2.5-948
<i>Malacostraca Dry Mass</i>			<i>Malacostraca</i> crustaceans (Amphipoda and Isopoda) dry mass (in mg; only in tidal marsh habitat)	98.5 0-502
<hr/>				

723

724

725 Table 3. Number of individuals of *Crocidura russula* (N*Cr*) and *Crocidura suaveolens* (N*Cs*)
 726 captured, number of trapping points (TP) used and capture rates of each species by *Location*
 727 and *Habitat* in the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR). Capture rates are shown as
 728 number of individuals captured by 100 trapping points. Overall capture rates by *Location* and
 729 *Habitat* in the OMNR for *C. russula* and *C. suaveolens* are shown in Figure 2.

730

<i>Location</i>	<i>Habitat</i>	TP	N <i>Cr</i>	(N <i>Cr</i> /TP)100	N <i>Cs</i>	(N <i>Cs</i> /TP)100
OMNR edge	Med. Forest	140	17	12.1	0	0
	Tidal marsh	100	25	25	81	81
OMNR interior	Med. Forest	132	0	0	0	0
	Tidal marsh	255	2	0.8	274	107.5
TOTAL		627	44	7.0	355	56.6

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745 Table 4. Variables affecting the capture probability of *Crocidura russula* (above) and
 746 *Crocidura suaveolens* (below) in the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR). Models are
 747 ranked by AIC values. ΔAIC is the difference of a given AIC value compared to the smallest
 748 AIC value. The supported models ($\Delta\text{AIC} < 2$) are shown in bold. AIC weights (wAIC)
 749 indicate the relative support of every model.

Model	Abbreviation	AIC	ΔAIC	wAIC	Ranking
Season	S	185.10	1.33	0.334	2
<i>Habitat</i>	<i>H</i>	192.27	8.50	0.009	3
<i>Arthropoda Dry Mass</i>	<i>ADM</i>	195.95	12.18	0.001	5
Season + Habitat	S+H	183.77	0.00	0.649	1
<i>Habitat + Arthropoda Dry Mass</i>	<i>H+ADM</i>	193.08	9.31	0.001	4
<i>Season</i>	<i>S</i>	459.16	14.21	0.001	4
<i>Location</i>	<i>L</i>	486.42	41.47	0.000	7
<i>Arthropoda Dry Mass</i>	<i>ADM</i>	492.22	47.27	0.000	9
<i>Malacostraca Dry Mass</i>	<i>MDM</i>	482.88	37.93	0.000	6
<i>Season + Location</i>	<i>S+L</i>	454.59	9.64	0.007	3
<i>Season + Malacostraca Dry Mass</i>	<i>S+MDM</i>	448.51	3.56	0.143	2
<i>Location + Arthropoda Dry Mass</i>	<i>L+ADM</i>	488.39	43.44	0.000	8
<i>Location + Malacostraca Dry Mass</i>	<i>L+MDM</i>	479.83	34.88	0.000	5
Season + Location + Malacostraca Dry Mass	S+L+MDM	444.95	0.00	0.849	1

750

751

752

753

754

755

756

757 Table 5. Patterns of co-occurrence for *Crocidura russula* (*Cr*) and *Crocidura suaveolens* (*Cs*)
 758 in tidal marsh habitats on the edge of the Odiel Marshes Natural Reserve (OMNR) by season.
 759 TPCr0Cs0, trapping points with no *Crocidura* species; TPCr0Cs1 trapping points with
 760 *Crocidura suaveolens* only; TPCr1Cs0 trapping points with *Crocidura russula* only;
 761 TPCr1Cs1 trapping points with both species present.

762

	Site	Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring	All
763	occupation	2013	2013	2013	2013	2014	seasons
764	TPCr0Cs0	5	12	2	7	14	40
765	TPCr0Cs1	5	3	17	13	3	41
766	TPCr1Cs0	7	5	0	0	3	15
767	TPCr1Cs1	3	0	1	0	0	4
	Total	20	20	20	20	20	100

768

769

770

771

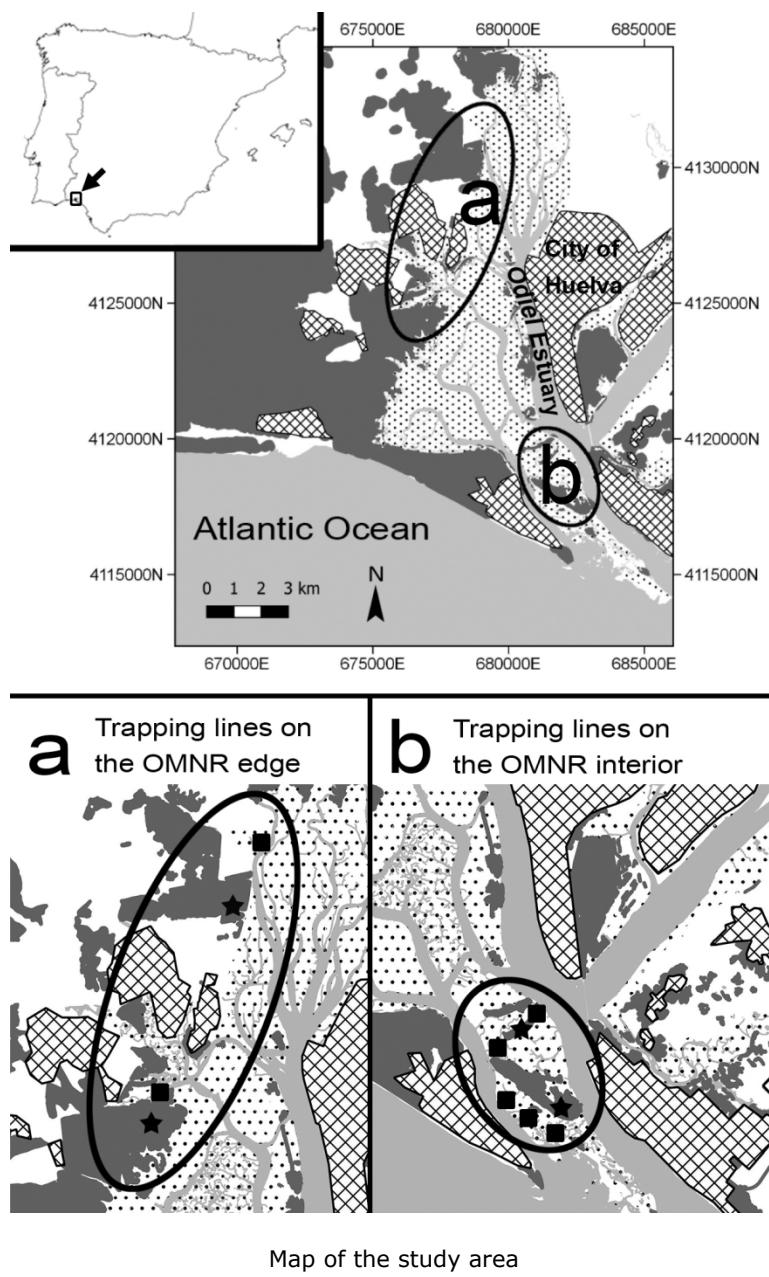
772

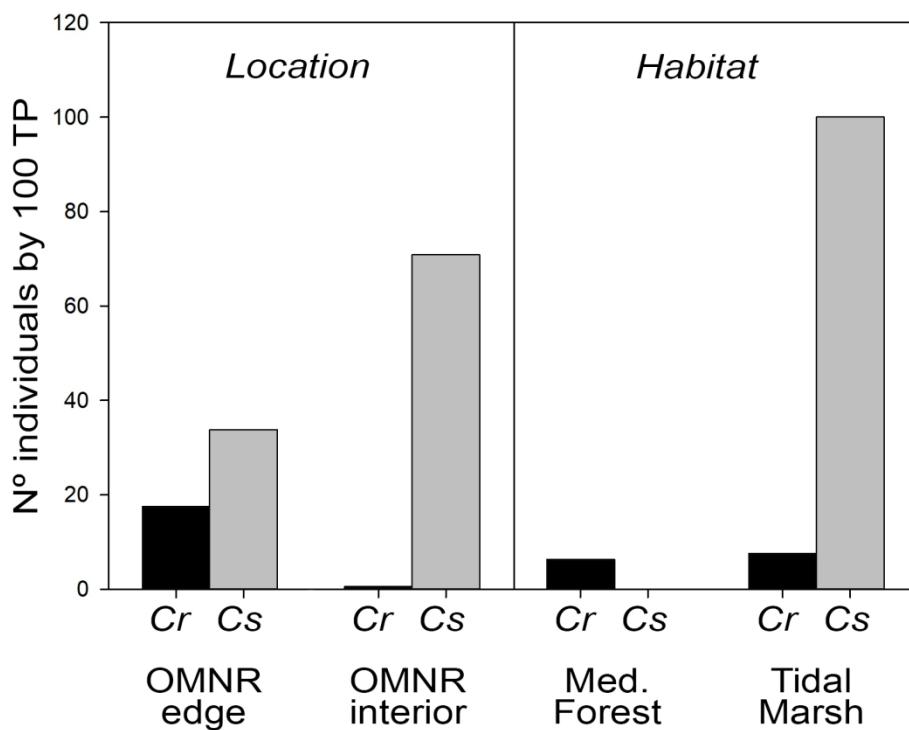
773

774

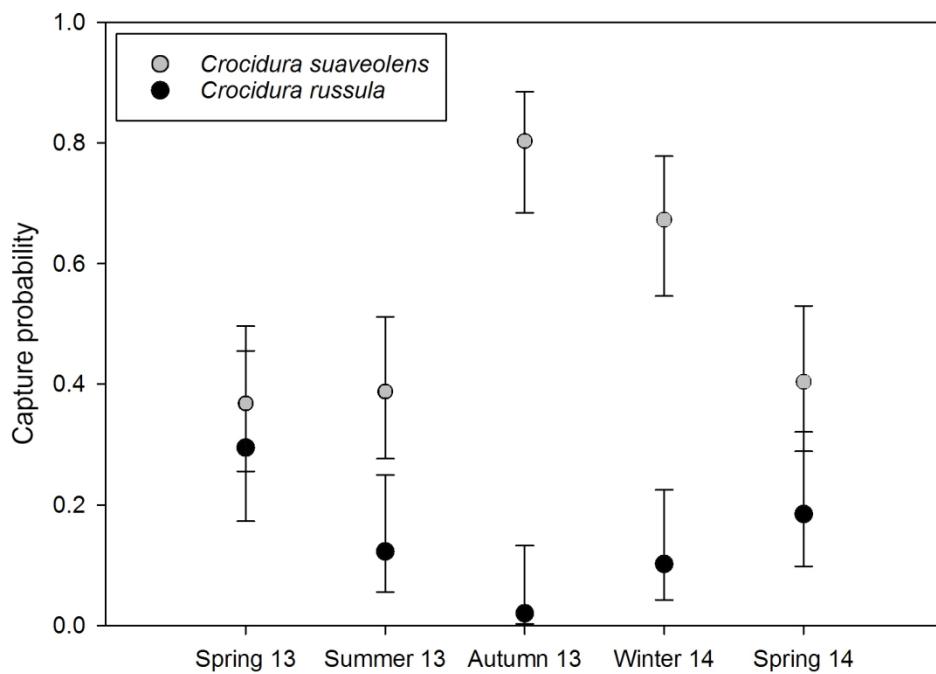
775

776

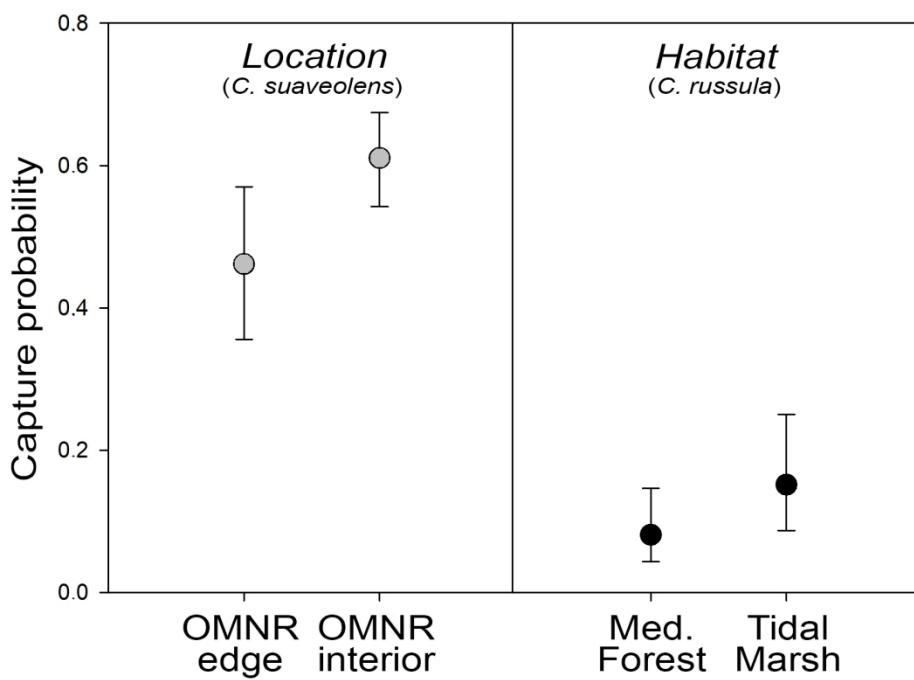




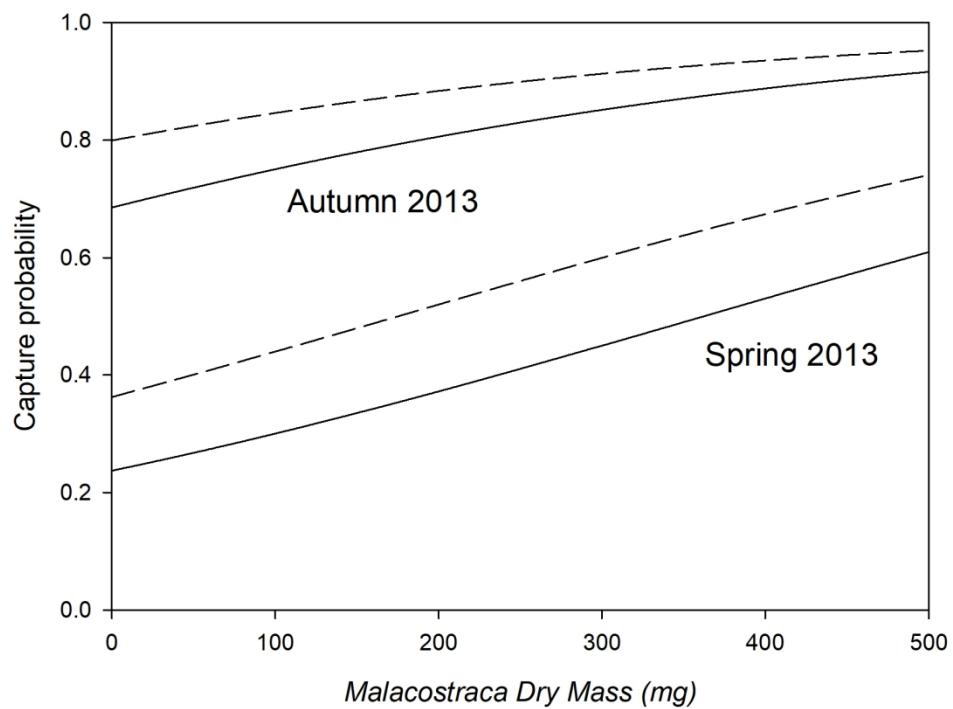
156x133mm (300 x 300 DPI)



149x114mm (300 x 300 DPI)



155x133mm (300 x 300 DPI)



152x138mm (300 x 300 DPI)

[CAPÍTULO 3. RESULTADOS]

	Spring 2013 (n=15)	Summer 2013 (n=12)	Autumn 2013 (n=12)	Winter 2013 (n=12)	Spring 2014 (n=12)
MED. FOREST					
<i>Gastropoda</i>	0.33 (0.41)	0.08 (0.10)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.08 (0.10)
<i>Arachnida</i>	5.20 (29.10)	5.50 (22.00)	2 (14.90)	2.75 (10.87)	3.58 (12.18)
<i>Malacostraca</i>	7.40 (4.02)	1.75 (4.21)	0.67 (0.74)	0.33 (0.76)	0.75 (0.69)
<i>Diplopoda</i>	0.40 (4.02)	0.58 (0.26)	2.33 (21.16)	0.83 (10.95)	0.50 (0.89)
<i>Chilopoda</i>	0.07 (1.82)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.08 (0.10)
<i>Collembola</i>	0.47 (0.02)	0.58 (0.01)	7.83 (0.04)	3.67 (0.08)	4.33 (0.04)
<i>Insecta</i>	41.13 (251.44)	273.25 (160.94)	20.67 (68.59)	7.83 (21.00)	47.75 (170.94)
Indeterminate	0.00 (0.00)	0.17 (0.21)	0.17 (0.21)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Total	55 (290.83)	281.92 (187.72)	33.67 (105.64)	15.42 (43.66)	57.08 (184.93)

	Spring 2013 (n=21)	Summer 2013 (n=21)	Autumn 2013 (n=21)	Winter 2013 (n=21)	Spring 2014 (n=21)
TIDAL MARSH					
<i>Gastropoda</i>	0.33 (0.41)	0.14 (0.18)	0.05 (0.06)	0.38 (0.47)	0.48 (0.59)
<i>Arachnida</i>	5.90 (17.70)	4.67 (15.69)	8.29 (5.57)	4.05 (8.18)	9.57 (14.37)
<i>Malacostraca</i>	125.43 (126.33)	173.62 (104.74)	215.86 (125.73)	54.14 (58.08)	90.24 (71.39)
<i>Diplopoda</i>	0.10 (0.05)	0.00 (0.00)	0.05 (3.40)	0.00 (0.00)	0.10 (1.39)
<i>Chilopoda</i>	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
<i>Collembola</i>	0.48 (0.01)	0.29 (0.01)	8.38 (0.05)	62.43 (1.62)	2.76 (0.04)
<i>Insecta</i>	17.19 (48.39)	22.43 (153.39)	9.33 (14.40)	6 (13.97)	15 (71.34)
Indeterminate	0.05 (0.06)	0.14 (0.18)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Total	149.48 (192.94)	201.29 (274.20)	241.95 (149.21)	127 (82.32)	118.14 (159.12)

Capítulo 4. Discusión

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

El estudio de la musaraña de campo en el golfo de Cádiz y en el resto de la península ibérica ha sido todo un reto. Su detección y trampeo en vivo a menudo han requerido grandes esfuerzos, debido al escaso conocimiento que se disponía sobre esta especie rara y elusiva. Además, ha sido necesario aprender a distinguirla sin error de su congénere, la musaraña gris, con la que guarda una enorme similitud morfológica. Tal es el parecido con su congénere que las identificaciones de numerosos ejemplares han tenido que ser corroboradas mediante pruebas genéticas. A pesar de todas estas dificultades, se ha logrado reunir una importante cantidad de información sobre la musaraña de campo y se han alcanzado todos los objetivos planteados en la tesis. Se han obtenido por primera vez datos sobre la compleja estructura y diferenciación genética de la especie en la península ibérica, sobre su diversidad genética y sobre su distribución y uso del hábitat en el golfo de Cádiz. Algunos resultados se alejan de lo conocido hasta ahora para la especie, como es el caso de su especialización de hábitat y su dominancia competitiva sobre la musaraña gris en las marismas mareas del golfo de Cádiz. Además, los resultados han mostrado una gran coherencia y complementariedad entre sí, lo cual refuerza su validez y permite afirmar que la musaraña de campo en el golfo de Cádiz es, sin lugar a dudas, muy singular y merecedora de mucha atención.

La musaraña de campo presenta una compleja estructura y diferenciación genética dentro del clado IV, el clado de musarañas de campo de Europa occidental. La existencia de tres linajes evolutivos bien diferenciados, dos de ellos exclusivamente ibéricos, y sus tiempos de divergencia, pueden ser explicados por la restricción y aislamiento de la especie en distintos subrefugios geográficamente separados durante períodos glaciares cuaternarios. Esto apoyaría la hipótesis de los “refugios dentro de los refugios”, que postula que en la península ibérica no hubo un único refugio glacial sino una serie de refugios (Gómez & Lunt, 2007). Además, parece ser que uno de los

factores más relevantes, y a la vez más distintivos, en el modelado de la historia evolutiva y distribución de la musaraña de campo en la península ibérica ha sido la competencia con la musaraña gris. De hecho, la competencia entre especies ha sido reconocida como un factor modelador clave de los rangos de distribución de las musarañas (Neves et al., 2018). De acuerdo con la datación realizada, la musaraña gris pudo llegar a la península ibérica desde el norte de África a finales del Pleistoceno. Desde entonces, la musaraña gris habría excluido competitivamente a la musaraña de campo de la inmensa mayoría de hábitats mediterráneos de la península ibérica, ya que las condiciones cálidas y secas de estos hábitats serían más afines al carácter termófilo de la musaraña gris (Torre et al., 2014; Torre et al., 2018). De hecho, el registro fósil indica que la musaraña de campo tuvo en el Pleistoceno, antes de la llegada de la musaraña gris, una distribución más amplia en la península ibérica, ocupando muchas zonas donde ahora no está presente (Ruiz-Bustos et al., 1984). En las zonas mediterráneas de la península ibérica, la musaraña de campo sólo parece haber soportado la presión competitiva de la musaraña gris en hábitats excepcionalmente húmedos, como las marismas mareales del golfo de Cádiz (sublinajes C3 y C4), o en hábitats forestales localizados a gran altura y con elevada precipitación, como las sierras del Sistema Central Ibérico (parte del linaje B y sublinaje C2) o del noreste peninsular (parte del sublinaje A1). Esto sería concordante con lo que ocurre en zonas mediterráneas del sur de Francia, donde la musaraña de campo también parece soportar la competencia de la musaraña gris en hábitats húmedos y/o con elevada cobertura vegetal (Poitevin et al., 1987). Tal vez, las condiciones microclimáticas de temperaturas más frías y de mayor humedad de estos hábitats hacen que la competencia no sea tan favorable para la musaraña gris como en el resto de hábitats mediterráneos, permitiendo a la musaraña de campo resistir de algún modo. Esto dejaría abierta la posibilidad de que nuevas poblaciones de musaraña de campo estén aún por descubrir en otros lugares ibéricos mediterráneos de condiciones similares, dada la complejidad topográfica y climática de la península

ibérica. Estas mismas condiciones de temperaturas más frías y humedad también habrían permitido a la musaraña de campo persistir en las zonas de clima atlántico de la península ibérica, donde la especie presenta una distribución más continua (linaje B y sublinaje C1). Así pues, en este escenario de exclusión competitiva y restricción de la musaraña de campo a determinados hábitats, la musaraña gris habría sido el principal factor causante de aislamiento. Si esto fuera así, es posible que la musaraña gris actuara de barrera biológica entre los linajes/sublinajes de musaraña de campo, impidiendo la migración e intercambio genético entre ellos. De hecho, los tiempos de divergencia de los cuatro sublinajes de musaraña de campo identificados (sublinajes C1-C4) presentan rangos que solapan temporalmente con el de la fecha de llegada de la musaraña gris a la península ibérica. Además de causar aislamiento, la competencia con la musaraña gris habría limitado los tamaños poblacionales de estos sublinajes al restringirlos espacialmente, ya que ninguno mostró señales de crecimiento demográfico. Por lo tanto, los bajos valores de diversidad genética mitocondrial observados en estos cuatro sublinajes pueden ser el resultado de una historia evolutiva de aislamiento y pequeños tamaños poblacionales causados por la competencia de la musaraña gris. Sin embargo, las poblaciones de los dos sublinajes de musarañas de campo del golfo de Cádiz son especialistas de hábitat que viven solo en marismas mareas, por lo que el aislamiento, distribución y abundancia actual de estas poblaciones ya nada tienen que ver con la competencia con la musaraña gris, sino con el aislamiento, distribución y abundancia de la marisma marea. En cualquier caso, un aislamiento prolongado y pequeños tamaños poblacionales son condiciones que aumentan notablemente el riesgo de pérdida de diversidad por endogamia y deriva génica. Es por ello que los cuatro sublinajes de musaraña de campo podrían enfrentar una situación de mayor vulnerabilidad que el más extenso y diverso linaje ibérico noroccidental, lo cual debería ser tenido en cuenta a la hora de gestionar los recursos destinados a la conservación de la especie en la península ibérica. No

obstante, el estudio filogeográfico realizado solo es una primera aproximación al estado genético de la musaraña de campo en la península ibérica, siendo necesarios más estudios que ayuden a diseñar un adecuado plan de manejo y conservación de la especie.

Otro de los objetivos perseguidos con el estudio filogeográfico realizado era esclarecer el origen de las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz. Se planteó la duda de si estas poblaciones tan alejadas del resto y tan cercanas a la costa y a muchos puertos podrían provenir de una introducción antrópica, como sucede con las poblaciones de varias islas del Mediterráneo (Creta, Córcega y Menorca; Dubey et al., 2007). En este sentido, la agrupación de las secuencias de ADN mitocondrial de las poblaciones del golfo de Cádiz con las del resto de Europa Occidental dentro del clado IV indica un origen evolutivo común para todas estas poblaciones. Además, las poblaciones del golfo de Cádiz conforman dos sublinajes exclusivos, cuya diferenciación y divergencia es compatible con la historia evolutiva de la especie en la península ibérica. Así pues, queda descartada la hipótesis de una introducción humana accidental.

Con respecto a las implicaciones taxonómicas, los resultados filogeográficos obtenidos para el clado IV de musarañas de campo muestran distintos linajes y sublinajes bien soportados estadísticamente y con divergencias estimadas entre sí en torno a los 100.000-400.000 años. Sin embargo, el establecimiento de nuevas divisiones taxonómicas es siempre un tema complejo. En este caso, varios de los linajes y sublinajes identificados presentan distribuciones parapátricas, pudiendo haber zonas de contacto secundario en las que se podría valorar el grado de aislamiento reproductivo entre estos linajes. De hecho, se ha encontrado una zona de contacto secundario en el Sistema Central Ibérico entre dos de los linajes identificados (el linaje B del noroeste peninsular y el sublinaje C2 del este del Sistema Central), pero podría haber más. Sería necesario identificar todas las zonas de contacto secundario para

comprobar si hay o no reproducción entre linajes y valorar la viabilidad de los híbridos. Para ello, sería necesario el uso combinado de marcadores mitocondriales y nucleares. Este uso combinado de marcadores ha permitido constatar la hibridación entre linajes de musarañas de campo (clados V, VI y VII; Dubey et al., 2008) con tiempos de divergencia bastante mayores que los linajes internos del clado IV. Así que, es probable que también haya hibridación entre los linajes del clado IV en las posibles zonas de contacto secundario.

A diferencia de lo que ocurre con los linajes del norte y centro de la península ibérica, los dos sublinajes del golfo de Cádiz están geográficamente aislados entre sí y del resto de los linajes de musarañas de campo, tienen un nicho ecológico totalmente distinto al resto de musarañas de campo y las de un sublinaje son distinguibles morfológicamente de las del otro. Todos ellos serían argumentos a favor para reconocer cada sublinaje del golfo de Cádiz como una especie nueva. No obstante, la divergencia genética de estos sublinajes es muy pequeña en comparación con la divergencia tomada como referencia para separar especies dentro del grupo *C. suaveolens*. Así, el tiempo de divergencia de los sublinajes del golfo de Cádiz respecto al resto del clado IV es de 140.000 (50.000-240.000) años, y entre ambos sublinajes de 110.000 (30.000-190.000) años, mientras que el tiempo de divergencia entre *C. shantungensis* y *C. suaveolens*, por ejemplo, es de 1.94 (1.58-2.52) millones de años (Dubey et al., 2006). Por lo tanto, una opción compatible con el marco taxonómico de referencia del grupo *C. suaveolens* sería reconocer cada sublinaje del golfo de Cádiz como una subespecie distinta, dado que cada uno de ellos presenta características morfológicas diferentes y reconocibles y posee una distribución regional concreta. Un ejemplo cercano es el de *C. s. baleárica*. La población de musaraña de campo de la Isla de Menorca es reconocida como una subespecie a pesar de que solo lleva separada 3.000-4.000 años del clado V de Oriente Medio (Dubey et al., 2007). De un modo similar, una posible solución taxonómica para la diferenciación interna del clado

IV podría ser nombrar cada linaje o sublinaje como subespecies. No obstante, sería interesante comprobar si, como ocurre en los sublinajes del golfo de Cádiz, estos otros linajes presentan diferencias morfológicas y/o ecológicas distintivas que pudieran dar mayor soporte a dicha consideración. En cualquier caso, los linajes y sublinajes identificados dentro del clado IV deben ser considerados como Unidades Evolutivas Significativas separadas para fines de conservación, debido a la historia evolutiva independiente del clado y a la probable existencia de adaptaciones locales.

La musaraña de campo es localmente abundante en el golfo de Cádiz. Sin embargo, su distribución es tan restringida, que se la puede considerar una especie rara a escala regional (Rabinowitz, 1981; Gaston, 1994). De hecho, es posible que el golfo de Cádiz sea uno de los lugares donde la especie ocupe menor extensión geográfica. Respecto al uso de hábitats de la musaraña de campo, los resultados obtenidos en el golfo de Cádiz han sido muy sorprendentes ya que son muy distintos de lo que se ha descrito para la especie en el resto de su distribución. En este sentido, la musaraña de campo, que se describe a menudo como una especie generalista, se comporta en el golfo de Cádiz como especialista de hábitat, ocupando exclusivamente marismas mareales. Esta especialización parece haber sido una respuesta a la competencia con la musaraña gris que ha permitido la coexistencia de las dos especies mediante la segregación de nichos. Esta asociación con marismas mareales, que en principio se podría entender como un desplazamiento de la especie dominada hacia hábitats marginales, aparece más bien como una auténtica especialización que ha invertido las relaciones de dominancia entre las dos especies. De hecho, la musaraña gris solo ocupa aquellas marismas mareales del golfo de Cádiz donde la musaraña de campo está ausente. Que la musaraña de campo sea la que excluye competitivamente a la musaraña gris es un hallazgo insólito, ya que en todo lo descrito hasta ahora en la bibliografía científica, la musaraña gris es la dominante en la relación entre ambas especies. La especialización en marismas no parece ser una respuesta ecológica

plástica y reversible a la presencia de la musaraña gris, sino una auténtica respuesta evolutiva, como sugiere el hecho de que la musaraña de campo ha dejado de ocupar otros hábitats como el bosque mediterráneo incluso cuando la musaraña gris está ausente. Además, hasta el momento solo se ha descrito que la especie ocupe marismas mareas en el golfo de Cádiz. En otros lugares, como en el sur de Francia (Poitevin et al., 1987) y en el sur de Italia (Cagnin et al., 1998), la musaraña de campo está presente en marismas pero no mareas. Los trabajos aquí realizados no han permitido averiguar cómo la especie consigue lidiar con las inundaciones periódicas asociadas a este tipo de hábitats. Tal vez el marcaje con radiotransmisores podría ser un método de estudio útil para averiguar más sobre este asunto.

Por otro lado, los resultados genéticos obtenidos, tanto filogeográficos como de genética poblacional, son muy concordantes con los patrones de distribución y uso de hábitats observados. En este sentido, la especialización de hábitat explicaría por qué, a pesar de la proximidad geográfica entre poblaciones, hay poco flujo génico entre ellas, y que cada población marismeña constituya un cluster genético diferenciado. La especialización en marisma marea impide a la musaraña de campo dispersar entre poblaciones al estar separadas por una matriz inhóspita de hábitats no marismeños. Es cierto que la especialización de hábitat no siempre impide la dispersión a través de hábitats hostiles (Centeno-Cuadros et al., 2011), pero este no parece ser el caso de la musaraña de campo ya que las tasas de migración reciente entre poblaciones fueron muy bajas. A pesar de la especialización y aislamiento en marismas mareas, las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz poseen un alto valor de conservación. Estas poblaciones tienen niveles moderados de diversidad genética local y, en conjunto, un elevado nivel de diversidad genética regional (ADN nuclear), que pueden ser claves para que la especie pueda adaptarse a los cambios ambientales y enfrentar amenazas futuras.

La historia evolutiva de las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz, su distribución, ecología y genética, pueden ser explicados por la acción combinada de la competencia con la musaraña gris, la especialización en marisma mareal y la evolución geomorfológica de las marismas mareas de esta región. Una posible secuencia cronológica de los hechos es la siguiente. En el pleistoceno superior, cuando se estima que la musaraña gris pudo colonizar la península ibérica, en el golfo de Cádiz solo existían dos grandes áreas de marisma mareal a las cuales pudo quedar restringida la musaraña de campo, generalista en aquel entonces, por exclusión competitiva. Una de estas áreas marismeñas estaba asociada a la desembocadura del río Guadalquivir y la otra a la desembocadura del complejo fluvial conocido como Paleo-Tinto, donde el río Tinto era el cauce principal y los ríos Odiel y Piedras eran afluentes suyos (Cáceres, 1995). En este escenario se habrían originado los dos sublinajes mitocondriales identificados para la musaraña de campo en la región, cuya fecha de divergencia [110.000 (30.000-190.000) años] solapa con la fecha de llegada de la musaraña gris a la península ibérica [126.000 (41.000 - 200.000) años]. El que la musaraña de campo no fuera excluida de las marismas mareas podría ser debido a que esta especie presentase un mayor fitness (reproducción, alimentación, supervivencia a mareas, etc) que la musaraña gris en estos hábitats anfibios tan peculiares. La restricción en marismas mareas pudo provocar que la selección natural favoreciera aquellos individuos de musaraña de campo mejor adaptados a marisma mareal y, con el paso del tiempo, la especie pudo sufrir un cambio evolutivo que condujo a la especialización de hábitat. Mucho más recientemente, hace unos 6.500 años, con la subida del nivel del mar producida durante el máximo Flandriense (Dabrio et al., 2000), el complejo fluvial Paleo-Tinto se dividió ya que las desembocaduras de los ríos Piedras, Odiel y Tinto retrocedieron a una posición similar a la actual, formando los estuarios separados del río Piedras y Odiel-Tinto que conocemos hoy en día. La formación del resto de áreas de marisma del golfo de Cádiz se produjo en momentos posteriores a la llegada de la musaraña gris, por lo que la

actuación de esta especie como barrera biológica, y más tarde, la especialización de hábitat, habrían impedido que la musaraña de campo pudiera colonizarlas. En cambio, las marismas españolas del río Guadiana pudieron ser colonizadas por la musaraña de campo desde las cercanas marismas del río Piedras, debido a que ambas áreas de marisma al parecer estuvieron conectadas en los últimos siglos (Borrego et al., 1993). El aislamiento de las marismas del río Guadiana y Piedras fue provocado posiblemente por el gran desarrollo urbanístico al que ha sido sometido esta zona costera (Rodríguez-Ramírez et al., 2008). La ausencia de la musaraña de campo en las marismas portuguesas del río Guadiana es concordante con que la especie haya colonizado recientemente las marismas españolas de este río y aún no haya sido capaz de superar (activa o pasivamente) la barrera que supone su gran cauce, el cual constituye el límite más suroccidental del rango de distribución de la especie. Además, el aislamiento reciente de las marismas Guadiana, Piedras, Odiel y Tinto es consistente con los bajos niveles de diferenciación genética obtenidos entre estas poblaciones. La alta diferenciación de la población del EDR es probablemente el resultado de su aislamiento respecto a la población del Tinto por alteración antrópica de la marisma mareal (contaminación minera y edificaciones), y de la deriva genética que esta pequeña población del EDR ha podido sufrir en consecuencia.

Son varias las implicaciones y recomendaciones de conservación para las poblaciones del golfo de Cádiz que se derivan de los estudios realizados. Para empezar, las poblaciones del golfo de Cádiz deben ser consideradas como una Unidad Evolutiva Significativa, dada sus divergencias mitocondriales y ecológicas con el resto de poblaciones ibéricas. Además, cada área de marisma ocupada por la especie (Guadiana, Piedras, Odiel-Tinto-EDR y Guadalquivir) debe ser considerada como una unidad de gestión, debido a la independencia demográfica que presentan. Respecto a la diversidad genética, todas las poblaciones presentan valores moderados o altos, excepto las pequeñas poblaciones de Tinto y EDR. No se han detectado indicios de

que los bajos valores de diversidad puedan estar amenazando la viabilidad de estas dos poblaciones. No obstante, dado la probable conexión entre las poblaciones Tinto, EDR y Odiel en tiempos relativamente recientes y los riesgos generalmente asociados al aislamiento y la erosión genética, sería recomendable facilitar el flujo génico entre estas poblaciones. La población de las marismas del río Guadalquivir también debe recibir cierta atención porque, a pesar de sus altos valores de diversidad genética, se obtuvieron bajos tamaños efectivos, lo que podría indicar reducciones poblacionales recientes. Por otro lado, dada la restricción de las poblaciones del golfo de Cádiz a marisma mareal, la pérdida progresiva de este hábitat podría suponer una amenaza potencialmente grave para la musaraña de campo. Por ello, parte al menos de la evaluación de amenazas para la especie debería centrarse en medir los posibles impactos que atenten contra la integridad y funcionalidad de las marismas mareas. En este sentido, también es importante destacar que, ante las previsiones de subida de nivel del mar como consecuencia del calentamiento global (Rahmstorf, 2007; Nicholls & Cazenave, 2010), sería recomendable establecer un programa de seguimiento para controlar la evolución de los hábitats de marisma mareal en el golfo de Cádiz, así como realizar estudios dirigidos a la obtención de proyecciones sobre el futuro de estos hábitats. Además, dado el alto valor de conservación que tienen estas poblaciones borde de musaraña de campo, por sus valores de diversidad genética y potencial evolutivo, es urgente la elaboración de una adecuada estrategia de conservación. Así, por ejemplo, la introducción de individuos en áreas de marisma mareal que no están ocupadas actualmente por la especie debería ser evaluada. Esto podría ser particularmente importante para asegurar la conservación del sublinaje de la población del Guadalquivir, que está conformado por una única población y es el que tiene una distribución menor. Esto supone un alto riesgo y vulnerabilidad, ya que una catástrofe (enfermedad, destrucción del hábitat, contaminación...) que afectara localmente a esta población podría suponer la extinción de dicho sublinaje.

Esta tesis constituye un avance importante en el conocimiento de la distribución, ecología y genética de la musaraña de campo en el golfo de Cádiz. Además, se ha establecido una base de conocimiento muy sólida a nivel peninsular sobre la que seguir trabajando. El golfo de Cádiz es ahora la región de la península ibérica, y posiblemente también del oeste de Europa, donde se tienen más conocimientos sobre esta especie. Cabe recordar que en Andalucía el estado de conservación de la musaraña de campo permanecía sin evaluar debido a la escasez de conocimientos (Soriguer et al., 2001). En este sentido, la presente tesis proporciona información clave para poder desarrollar un adecuado plan de manejo y gestión de la especie en el golfo de Cádiz y debe, por tanto, alentar a una inminente evaluación del estado de conservación de la especie en esta región.

4.1. REFERENCIAS

- Borrego J, Morales JA, Pendón JG. 1993. Holocene Filling of an Estuarine Lagoon along the Mesotidal Coast of Huelva: The Piedras River Mouth, Southwestern Spain. *Journal of Coastal Research* 9: 242-254.
- Cáceres LM. 1995. Geomorfología del sector occidental de la Depresión del Guadalquivir. Unpublished Ph.D. Thesis, University of Huelva.
- Cagnin M, Moreno S, Aloise G, Garofalo G, Villafuerte R, Gaona P, Cristaldi M. 1998. Comparative study of Spanish and Italian terrestrial small mammal coenoses from different biotopes in Mediterranean peninsular tip regions. *Journal of Biogeography* 25: 1105-1113.
- Centeno-Cuadros A, Román J, Delibes M, Godoy JA. 2011. Prisoners in Their Habitat? Generalist Dispersal by Habitat Specialists: A Case Study in Southern Water Vole (*Arvicola sapidus*). *PLOS ONE* 6: e24613.

- Dabrio CJ, Zazo C, Goy JL, Sierro FJ, Borja F, Lario J, González JA, Flores JA. 2000. Depositional history of estuarine infill during the last postglacial transgression (Gulf of Cadiz, Southern Spain). *Marine Geology* 162: 381-404.
- Dubey S, Cosson J-F, Magnanou E, Vohralík V, Benda P, Frynta D, Hutterer R, Vogel V, Vogel P. 2007. Mediterranean populations of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura suaveolens* group): an unexpected puzzle of Pleistocene survivors and prehistoric introductions. *Molecular Ecology* 16: 3438-3452.
- Dubey S, Diker E, Kurtonur C, Vogel P. 2008. Secondary contact zones and hybridizations: the case of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura suaveolens* group, Soricidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 557-565.
- Dubey S, Zaitsev M, Cosson J-F, Abdukadier A, Vogel P. 2006. Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 635-647.
- Gaston KJ. 1994. *Rarity*. Chapman & Hall: London.
- Gómez A, Lunt DH. 2007. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss S and Ferrand N, eds. *Phylogeography of southern European refugia*. Dordrecht: Springer. 155-188.
- Neves T, Tapisso JT, Porto M, Pereira HM, Mathias ML, Borda-de-Água L. 2018. The role of competition in driving species global distributions: Soricid shrews as a case study. *Journal of Biogeography* 0: 1-11.
- Nicholls RJ, Cazenave A. 2010. Sea-level rise and its impact on coastal zones. *Science* 328: 1517-1520.

Poitevin F, Catalan J, Fons R, Croset H. 1987. Biologie évolutive des populations ouest-européennes de crocidures (Mammalia, insectivora). II - Ecologie comparée de *Crocidura russula* Hermann, 1780 et de *Crocidura suaveolens* Pallas, 1811 dans le midi de la France et en Corse : rôle probable de la compétition dans le partage des milieux. *Revue d'Ecologie-la Terre et la Vie* 42: 32-58.

Rabinowitz D. 1981. Seven forms of rarity. In: Synge H and Chichester J, eds. *The biological aspects of rare plants conservation*. New York: John Wiley and Sons. 205-217.

Rahmstorf S. 2007. A semi-empirical approach to projecting future sea-level rise. *Science* 315: 368-370.

Rodríguez-Ramírez A, Morales JA, Delgado I, Cantano M. 2008. The impact of man on the morphodynamics of the Huelva coast (SW Spain). *Journal of Iberian Geology* 34: 313-327.

Ruiz-Bustos A, Vargas JM, Camprodón J, Sans-Coma V. 1984. Die Gartenspitzmaus, *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811) im Jungpleistozän (Wurm I) von Südspanien. *Säugetierkundliche Mitteilungen* 31: 251-256.

Soriguer RC, Palomo LJ, López-Fuster MJ. 2001. *Crocidura suaveolens* (Pallas 1811). In: Franco Ruiz A and Rodríguez de los Santos M, eds. *Libro rojo de los vertebrados amenazados de Andalucía*. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. 217-218.

Torre I, Díaz M, Arrizabalaga A. 2014. Additive effects of climate and vegetation structure on the altitudinal distribution of greater white-toothed shrews *Crocidura russula* in a Mediterranean mountain range. *Acta theriologica* 59: 139-147.

Torre I, Raspall A, Arrizabalaga A, Díaz M. 2018. SEMICE: An unbiased and powerful monitoring protocol for small mammals in the Mediterranean Region. *Mammalian Biology* 88: 161-167.

Capítulo 5. Conclusiones generales

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES

Filogeografía:

1. La musaraña de campo presenta tres linajes evolutivos mitocondriales dentro del clado IV de Europa occidental. Dos linajes son endémicos de la península ibérica y el tercero agrupa al resto de poblaciones de Europa occidental.
2. Todas las poblaciones de musaraña de campo de la península ibérica, incluidas las aisladas poblaciones del golfo de Cádiz, tienen una historia evolutiva común y pertenecen, junto con el resto de poblaciones de Europa occidental, al clado IV del grupo *C. suaveolens*.
3. La historia evolutiva de la musaraña de campo en la península ibérica puede ser explicada por la combinación de los siguientes factores: los sucesivos ciclos glaciares cuaternarios, la existencia de refugios geográficamente separados dentro del refugio ibérico y la competencia con la musaraña gris.

Distribución en el golfo de Cádiz:

4. En el golfo de Cádiz la musaraña de campo vive exclusivamente en marismas mareales. La especie está presente en las marismas de los ríos Guadiana (orilla española), Piedras, Odiel, Tinto, Estero Domingo Rubio y Guadalquivir. La musaraña de campo no está presente en el resto de marismas del golfo de Cádiz.
5. La historia evolutiva de las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz, su distribución, su composición genética y su ecología, pueden ser explicadas por la acción combinada de la competencia con la musaraña gris, la especialización de la musaraña de campo en marisma mareal y la evolución geomorfológica de las marismas mareales de esta región.

Genética poblacional en el golfo de Cádiz:

6. Las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz se caracterizan por una fuerte estructura genética como resultado de un alto nivel de aislamiento poblacional. La estructura genética está formada por seis grupos genéticos diferenciados correspondientes a las seis marismas ocupadas por la especie: Guadiana, Piedras, Odiel, Tinto, Estero Domingo Rubio y Guadalquivir.
7. Guadalquivir y Estero Domingo Rubio son las poblaciones más diferenciadas genéticamente, mientras que las poblaciones del Guadiana, Piedras, Odiel y Tinto son genéticamente más parecidas entre sí. Los niveles de diferenciación entre poblaciones estuvieron correlacionados con la distancia geográfica, excepto en el caso de la población del Estero Domingo Rubio que mantiene un alto grado de diferenciación a pesar de su gran proximidad a las poblaciones del Tinto y el Odiel. Esto es probablemente consecuencia de un aislamiento antrópico reciente y de la actuación de la deriva genética sobre la pequeña población del EDR.
8. Hay poco flujo génico entre las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz. Esto parece ser debido a que la especie no es capaz de dispersar a través de hábitats no marismeños. Los cauces más anchos de los ríos también limitan el flujo génico, aunque estos no parecen constituir barreras absolutas para la dispersión.
9. Las poblaciones de musaraña de campo del golfo de Cádiz tienen niveles moderados de diversidad local y niveles altos de diversidad genética regional, lo que convierte al golfo de Cádiz en una región con un gran potencial evolutivo para afrontar futuras amenazas.

10. No se han detectado cuellos de botella intensos y recientes en ninguna población de musarañas de campo en el golfo de Cádiz. No obstante, la población del Guadalquivir es pequeña, lo que podría ser consecuencia de una reducción poblacional reciente. Sería conveniente estudiar su estado de conservación con mayor atención.
11. Las cuatro áreas de marisma mareal aisladas ocupadas por la especie (Guadiana, Piedras, Odiel-Tinto-Esteros Domingo Rubio y Guadalquivir) deberían tratarse como unidades de gestión.

Ecología en el golfo de Cádiz:

12. La musaraña de campo es una especie especialista de hábitat en el golfo de Cádiz, donde vive exclusivamente en marismas mareas. Este es el único caso conocido de especialización de hábitat para la especie.
13. La presencia de la musaraña de campo estuvo positivamente correlacionada con la disponibilidad de crustáceos anfípodos, por lo que es probable que estos sean una de las presas predilectas de la especie en las marismas del golfo de Cádiz.
14. El grado de co-ocurrencia de la musaraña de campo y la musaraña gris en áreas sintópicas del golfo de Cádiz es bajo debido a la segregación espacial y temporal de sus nichos ecológicos, lo que favorece la coexistencia de ambas especies en la región.
15. La especialización de la musaraña de campo en hábitat de marisma mareal parece ser un efecto evolutivo de la competencia pasada con la musaraña gris.

16. La musaraña de campo excluye competitivamente a la musaraña gris de los hábitats de marisma mareal (efecto ecológico), invirtiendo el patrón de dominancia observado en cualquier otro lugar de simpatría.

