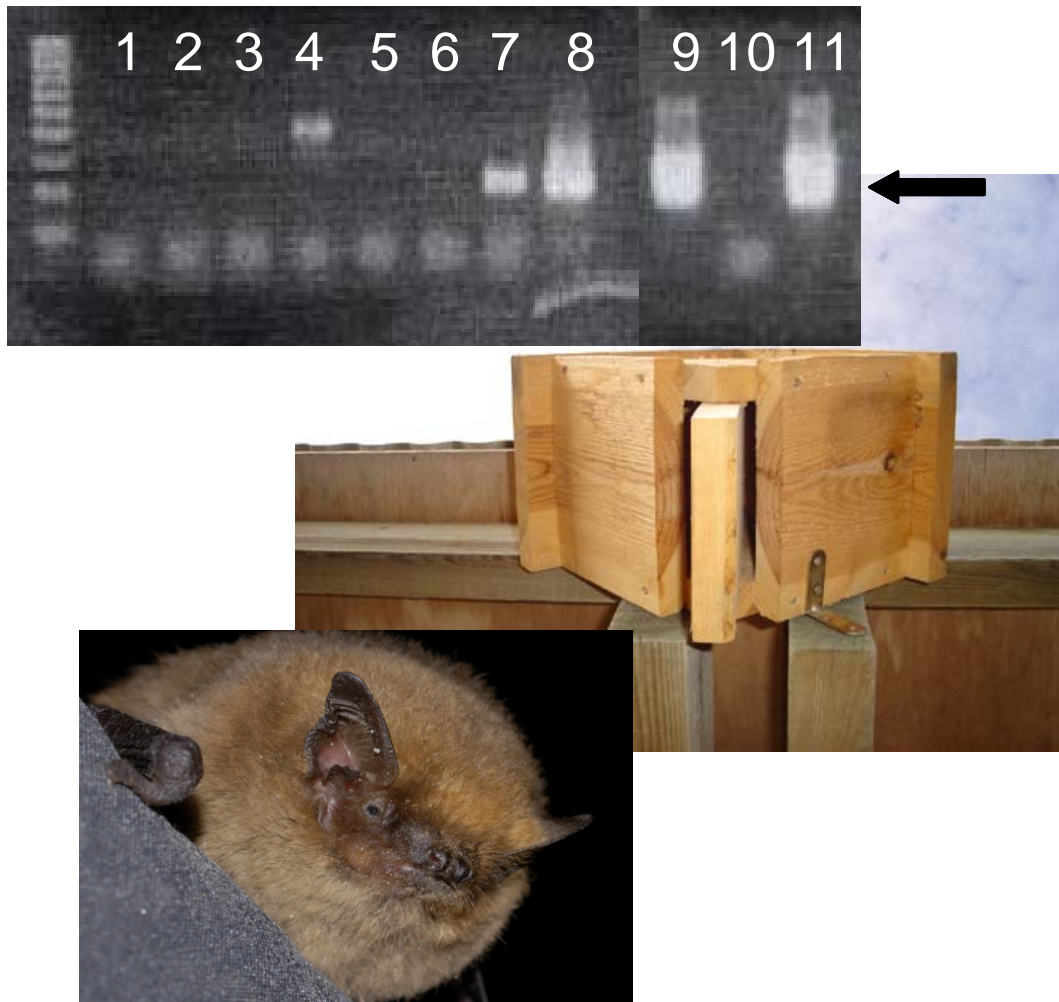


Seguiment de l'estudi de la ratapinyada nana (*Pipistrellus pygmaeus*) com a control de la plaga de la papallona de l'arròs (*Chilo suppressalis*) al delta de l'Ebre. Any 2008.



Generalitat de Catalunya  
Departament d'Agricultura,  
Alimentació i Acció Rural



Agrupació de Defensa  
Vegetal de l'arròs i  
altres cultius al Delta  
de l'Ebre

Col·labora:



Flaquer C; R. G. Ràfols; X. Puig; E. Guerreri; M. Monti; R. Ruíz-Jarillo i A. Arrizabalaga (2008). *Seguiment de l'estudi de la ratapinyada nana (Pipistrellus pygmaeus) com a control de la plaga de la papallona de l'arròs (Chilo suppressalis) al delta de l'Ebre.* Pp 22.

---

**Realització de feina de camp:** gener 2008 - setembre 2008

**Anàlisi de dades :** setembre - octubre del 2008

**Elaboració de l'informe:** novembre del 2008.

### **Equip de treball**

#### **Coordinació i planificació:**

CARLES FLAQUER (Biòleg)

#### **Treball de camp:**

RUTH G. RÀFOLS (biòloga)

CARLES FLAQUER (Biòleg)

XAVIER PUIG (Ambientòleg)

RAMON RUÍZ-JARILLO (Naturalista)

#### **Anàlisi d'excrements de quiròpters:**

EMILIO GUERRERI (Doctor en Biologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche. Istituto per la Protezione delle Piante (IPP). Napoli.

MAURILIA MONTI (Biòloga). Istituto per la Protezione delle Piante (IPP)

#### **Plànols:**

XAVIER PUIG (Ambientòleg)

#### **Elaboració de l'informe:**

CARLES FLAQUER (Biòleg)

#### **Assessorament tècnic i supervisió:**

ANTONI ARRIZABALAGA I BLANCH (Conservador del Museu de Granollers).

#### **Agraïments:**

Aquest Treball no s'hagués pogut dur a terme sense la col·laboració de: Enric Matamoros, Gemma Galimany, Xavier Ferrer, David Gisbert, Francesc Vidal, Toni Curcó i Xavier Porres.

## Índex

1. Resum.....	2
2. Introducció.....	3
3. Material i mètodes.....	4
3.1. Col·locació i seguiment de caixes .....	4
3.2. Radioseguiment .....	6
3.3. Anàlisi de dieta de <i>P. pygmaeus</i> .....	8
4. Resultats i anàlisi de dades.....	12
5. Discussió.....	15
6. Bibliografia de consulta .....	19

## 1. Resum

Entre els anys 2007 a 2009 s'estan fent esforços per tal d'avaluar la capacitat de les poblacions de ratapinyada pipistrel·la nana (*Pipistrellus pygmaeus*) com a possible control de la plaga de la papallona de l'arròs (*Chilo suppressalis*) als arrossars del delta de l'Ebre. Aquests esforços estan centrats en la combinació de metodologies: mesura d'activitat de cacera dels quiròpters o ratpenats en arrossars mitjançant detectors d'ultrasons, radioseguiment de quiròpters i anàlisis de dieta de *P. pygmaeus*.

Durant la present campanya s'han col·locat 24 caixes en arrossars com a prova pilot i després de 6 mesos el 8% han estat ocupades per quiròpters. Dades molt encoratjadores si es té en compte que els quiròpters poden tardar anys a ocupar les caixes. Per altra banda s'ha analitzat genèticament i morfològica la dieta de *P. pygmaeus* a partir de 20 excrements de *P. pygmaeus* de l'agost. Un d'aquests excrements ha donat positiu a presència de *C. suppressalis*. Aquesta és una tècnica molt nova i els resultats estan supeditats a la sensibilitat dels anàlisis (els quals es preveu millorar el proper any) però ha permès assegurar que el quiròpter depreda aquesta papallona. La troballa d'una antena de la papallona en un excrement recol·lectat al Juny també és indicativa de que *P. pygmaeus* és un depredador habitual de *C. suppressalis*.

Les dades obtingudes del radioseguiment de 7 femelles evidencien que *P. pygmaeus* ha estat més estona caçant a prop de les caixes quan més disponibilitat de papallona han tingut (principi de setembre). Aquestes dades coincideixen amb la hipòtesi plantejada el 2007 que proposa que en cas de menjar *C. suppressalis* els quiròpters refugiats en caixes a prop d'arrossar no farien grans desplaçaments per caçar. En tot cas caldria fer molt més esforç per tenir dades significatives sobre aquest fet.

Malgrat són dades totalment especulatives, es podria considerar que en períodes d'elevada activitat de papallona un individu de *P. pygmaeus* pot depredar 88 papallones per nit. En el pitjor dels casos, imaginant que *C. suppressalis* només representés el 5% de la dieta de *P. pygmaeus*, els quiròpters presents a les caixes de Buda depredarien 19.352 papallones per nit.

## 2. Introducció

La fauna quiropterològica del delta de l'Ebre és poc rica en espècies però la ratapinyada pipistrella nana (*Pipistrellus pygmaeus*) hi és molt abundant (Flaquer i Ruíz-Jarillo 2003). Aquesta espècie s'està recuperant gràcies a la prohibició de l'ús d'insecticides d' ampli espectre (p ex. DDT) i a les campanyes de col·locació de caixes refugi per a quiròpters (Flaquer et al. 2006). *P. pygmaeus* és un gran depredador d'insectes que cria al delta, on les femelles s'ajunten a l'estiu formant grans colònies de cria.

Estudis previs han demostrat que els quiròpters cacen insectes als arrossars del delta (Flaquer et al. 2007c). Sembla ser que els quiròpters es desplacen a caçar als arrossars durant un període concret de l'any. Aquest període coincideix amb l'increment de l'activitat de vol de la papallona de l'arròs. L'activitat de vol de la papallona i l'activitat de cacera de *P. pygmaeus* es correlacionen significativament, la qual cosa permet quasi assegurar que els quiròpters van als arrossars a alimentar-se de papallona del arròs (*Chilo supressalis*).

Per confirmar que els quiròpters cacen *C. supressalis* i valorar el control que poden exercir sobre la plaga cal estudiar la dieta de *P. pygmaeus* i intentar extrapolar el nombre de papallones que capturen per quiròpter i nit. Els estudis de dieta de quiròpters es realitzen identificant trossos d'insectes obtinguts d'excrements de quiròpters (Mc Aney et al. 1991; Goiti et al. 2003).

Al delta de l'Ebre s'ha pogut comprovar que les caixes refugi afavoreixen la presencia de colònies de cria de *P. pygmaeus* (Flaquer et al. 2006). Aquestes caixes serveixen de refugi alternatiu als arbres de ribera i durant la present campanya se n'han penjat en arrossars per tal de veure si eren ocupades.

L'objectiu d'aquest estudi és el de demostrar que *P. pygmaeus* caça *Chilo supressalis* i intentar extrapolar el nombre de papallones que poden depredar. A més a més s'estudia el radi d'actuació dels quiròpters des de la seva caixa per tal de valorar si la col·locació de caixes en arrossars pot ser una bona eina de control de la plaga.

### 3. Material i mètodes

#### 3.1. Col·locació i seguiment de caixes

A banda d'una mesura temporal per paliar la manca de refugis per quiròpters en arbres. Les caixes niu són útils per tal d'inventariar i estudiar espècies de quiròpters forestals i ubiqüistes (P. ex. *Nyctalus leisleri*, *Pipistrellus kuhlii*, etc.).

El model de caixa pot variar però imprescindiblement ha de tenir una obertura en forma de fissura de, com a màxim 1,5 cm (d'altra banda hi entren ocells). El material de construcció de la caixa també pot ser variable (p. ex. fusta, formigó, etc.).



Les caixes han de trobar-se a un mínim de 3 metres d'alçada i preferiblement n'hi ha d'haver varies de juntes col·locades en diferents orientacions. D'aquesta manera s'aconsegueix que els quiròpters puguin trobar la temperatura ideal per criar, aparellar-se o fins i tot hivernar.

Per tal de refugiar colònies de cria de *P. pygmaeus* s'ha optat per utilitzar caixes de fusta de senzilla construcció i fàcil revisió (models realitzats per Xavier Porres). Durant l'hivern del 2008 s'han penjat 24 caixes en arrossars de la zona 400 a prop de l'illa de Cort i de la Bassa de les Olles (taula 1). La revisió de les caixes s'ha realitzat en dues ocasions 17/04/08 i 5/08/08 (realitzades per Xavier Ferrer i David Gisbert).

nº Caixa	X	Y	ALT	OR	SUPPORT	LOCALITZACIÓ
1	306515	4515845	2,5	E	Fecsa formigó	Carretera fangar
2	306427	4515845	2,5	E	Fecsa formigó	Carretera fangar
3	306366	4515845	2,5	E	Fecsa formigó	Carretera fangar
4	306293	4515848	2,5	E	Fecsa formigó	Carretera fangar
5	306299	4515848	2,5	E	Fecsa formigó	Carretera fangar
6	306304	4515680	2,5	W	Fecsa formigó	Camí terra paral.lel caixes 1 a 5
7	306229	4515719	2,5	W	Fecsa formigó	Camí terra paral.lel caixes 1 a 6
8	306013	4515730	2,5	E	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
9	306013	4515730	2,5	W	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
10	305885	4515638	2,5	E	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
11	305885	4515638	2,5	W	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
12	305756	4515541	2,5	E	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
13	305756	4515541	2,5	W	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
14	305709	4515506	2,5	E	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
15	305709	4515506	2,5	W	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
16	305681	4515486	2,5	E	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
17	305681	4515486	2,5	W	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
18	305541	4515382	2,5	E	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
19	305541	4515382	2,5	W	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
20	305416	4515293	2,5	E	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
21	305416	4515293	2,5	W	Fecsa formigó	Camí Sèquia Sanitària
22	305100	4515025	2,5	S	Fecsa formigó	Marge arrossar perpend S.Sanitària
23	305139	4514946	2,5	W	Fecsa formigó	Marge arrossar perpend S.Sanitària
24	305183	4514860	2,5	W	Fecsa formigó	Marge arrossar perpend S.Sanitària

**Taula 1.-** Caixes penjades en arrossar amb l'objectiu de veure el procés d'ocupació i la seva capacitat de refugiar colònies de cria de *P. pygmaeus*. ALT= altura de la caixa; OR= orientació de la caixa; SUPORT= tipus de suport on es troba penjada la caixa.

### 3.2. Radioseguiment

El radioseguiment és una metodologia de treball que permet tenir informació d'ús d'hàbitat i de refugis utilitzats pels individus marcats. En aquest sentit el més interessant és marcar varis individus d'una mateixa espècie durant anys diferents, a poder ser individus d'una colònia de cria. La informació que s'obté és de gran valor per a la gestió dels hàbitats de caça i refugis alternatius (Flaquer et al. 2008).



L'objectiu del present estudi és observar les distàncies a les quals van a caçar les femelles de *P. pygmaeus* des de les caixes refugi. A més a més es pretén avaluar si hi ha canvis en el comportament d'ús d'hàbitat en períodes de molta activitat de *C. suppressalis* respecte períodes de poca papallona.

El radioseguiment ha estat plantejat en dues tongades diferents, una a principis de setembre (alta activitat de papallona) i una altra a finals de setembre (baixa activitat de papallona). A principis de setembre s'han capturat 41 quiròpters de caixes-refugi de l'Illa de Buda (1/09/08). Tots aquests animals han estat mesurats, sexats, pesats i finalment alliberats. D'aquests se n'han seleccionat (segons pes i estat de salut) 4 femelles adultes postlactants de ratapinyada pipistrel·la nana (*Pipistrellus pygmaeus*). A finals de setembre s'han capturat 10 quiròpters dels quals se n'ha seleccionat 3 femelles segons pes i estat de salut per tal de radiomarcant-les (taula 2).

Els emissors utilitzats en cap cas han superat el 5,8% del pes dels animals (0,35 gr. Biotrack, Wareham, UK) i han estat col·locats entre les escàpoles (imatge) amb cola mèdica. D'aquesta manera els emissors han caigut al cap de pocs dies d'haver estat col·locats (rang de 1-10 dies). Durant la present campanya s'ha tingut problemes amb la capacitat d'adherència de la cola mèdica i per aquest fet s'ha decidit no marcar més animals i millorar l'esforç de properes campanyes.





Període d'esforç	codi	sexe	pes
1/09/08 a 7/09/08	093	F	6,3
1/09/08 a 7/09/08	124	F	6,3
1/09/08 a 7/09/08	114	F	6,3
1/09/08 a 7/09/08	141	F	6,1
22/09/08 a 28/09/08	176	F	6,8
22/09/08 a 28/09/08	191	F	6,9
22/09/08 a 28/09/08	112	F	7,2

**Taula 2.-** Dades dels *P. pygmaeus* capturats en caixes-refugis de l'illa de Buda i radioseguits. Període d'esforç es refereix als dies en els quals hi ha hagut 2 persones amb 2 cotxes tot terreny buscant i seguint els animals de nit.

En global els animals han estat radioseguits durant 14 nits seguint el mètode del "homing in" (White i Garrott, 1990) i triangulant. El seguiment ha estat realitzat per 2 persones equipades amb receptors (ICOM i TRX-1000, Wildlife Materials, Carbondale, USA) i antenes Yagi de 3 elements muntades sobre un tot terreny (fotografia).



#### *Anàlisi de dades de radioseguiment*

Els anàlisi de dades de radioseguiment requereixen d'un mínim d'esforç de 2 o 3 anys. El nombre d'animals radio-seguits no permet realitzar anàlisis composicionals de selecció d'hàbitat emprant com a unitat l'individu, tal i com resulta desitjable, pel que únicament s'ha pogut fer una exploració superficial de les dades per determinar-ne les tendències.

Per realitzar una primera aproximació a l'ús d'hàbitat a partir de les localitzacions obtingudes mitjançant el radio-seguiment, s'han realitzat uns "buffers" en els quals s'indica les probabilitats que un punt de la mostra es trobi dins de cadascun dels polígons concèntrics (Arcview - Kernel anàlisi).



### 3.3. Anàlisi de dieta de *P. pygmaeus*

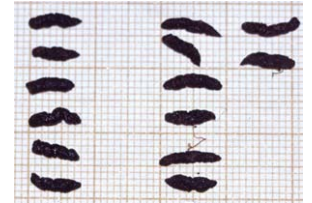
#### Anàlisi de pes de *Chilo suppressalis*

Per tal de poder extrapolar el nombre de papallones de *C. suppressalis* que és capaç de depredar un individu de *P. pygmaeus* s'han pesat un total de 60 papallones. Les pesades s'han realitzat de 10 en 10 amb una balança digital. Del pes de totes les papallones se n'ha fet la mitjana.

L'apartat d'anàlisi de dieta i excrements duta a terme per part del "Istituto per la Protezione delle Piante" s'ha preferit mantenir-la en el seu idioma



original per tal de no perdre en la traducció informació que pot ser



d'interès. En tot cas la tècnica es basa en la dissolució d'excrements de quiròpters (fotografia dreta) en tubs en alcohol 75% (fotografia esquerra) als quals s'hi realitzen

tractaments per obtenir marcadors de DNA de *C. suppressalis*. També s'ha mirat si els excrements presentaven parts del cos de *C. suppressalis* (p. ex. antenes).

#### DNA extraction from *Chilo suppressalis* and primers design

Different part of *Chilo suppressalis* were used, a whole wing, the head, wing nerves, a leg. Samples of were homogenized with a plastic pestle and treated with Chelex resin/proteinaseK as described by (Vickerman *et al.* 2004).

The DNA was amplified with two different set of universal primers, ND2F/ND2Rev and C1-J-2183/TL2-N-3014 respectively specific for the 28S-D2 region (Campbell *et al.* 1993) and for the mitochondrial gene COI (corresponding to nucleotides 2183 to 3014 referred to *Drosophila yakuba* mtCOI gene)(Simon *et al* 1994).

The PCR cycling program for 28S-D2 primers pair was: 3min at 94 °C, followed by 35 cycles of 45s at 94 °C, 1min at 52 °C, 2min at 72°C, and a final extension of 7min at 72°C. For the mtCOI gene the PCR cycles were the same as described for D2-28S except that the annealing temperature was lowered to 48°C. All the amplifications were carried out in a 40µl reactions using 4µl of DNA template, 1x buffer (Promega), 0.2 mM of each dNTP, 10 pmol of each primer and 0,6 units of GoTaq DNA polymerase (Promega), and checked on 1% agarose gel stained with etidium bromide.

The amplicons were direct sequenced using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready ReactionKit (PE Applied Biosystems), on the ABI PRISM 310 DNA Sequencer.

A second region of mtCOI (corresponding to nucleotides 1737 to 2204 referred to *Drosophila yakuba* mtCOI gene) from different strains of *C. suppressalis* was recovered from genebank.

Primers specific for *C. suppressalis* 28S and COI were designed with the software Primer-blast at NCBI (Rozen and Skaletsky 2000). It uses Primer3 to design PCR primers and then submits them to BLAST search against user-selected database. In this study the database was made of all Lepidoptera other than *C. suppressalis* known sequences of the same regions. The blast results are then automatically analyzed to avoid primer pairs that can cause amplification of targets other than the input template.

The primers chosen are listed below:

On the 28S-D2 region

28S 333F (5' ATC GAG GTC CTG CCT ATG TG 3')

28S 434R (5' GAA CTG ATC ATCGCA GAC AGA G 3')

On the mtCOI region both the couples of primers annealed in the first 5' region of the mtCOI. No region characteristic of *C. suppressalis* was found in the second half of this gene.

COI PPF1 (5' AAT GGA GCT GGA ACA GGA TG 3')

COI PPR1d (5' GAA TTG GAT CTC CAC CAC CA 3')

COI PPF2a (5' GCT CAC GCT GGA AGT TCA G 3')

COI PPR2b (5' CAG CTA ATA CTG GTA GAG ATA GAA GT 3')

The length of the amplified product is respectively 99bp, 331bp, and 202bp.

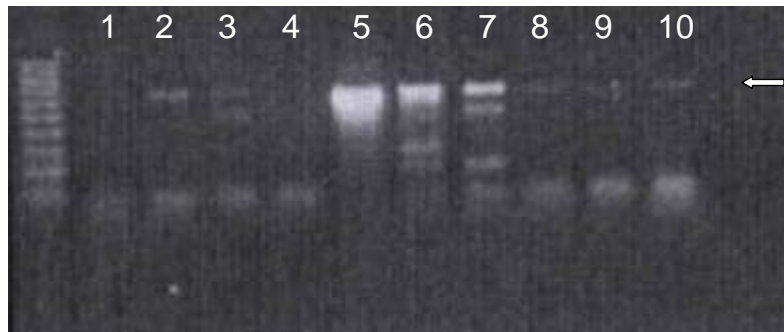
### **DNA extraction from bats' droppings**

Droppings were air dried on filter paper to remove as much ethanol as possible, then placed into eppendorf tubes containing 150 µl of extraction buffer (10 mM tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 200 µg/ml Proteinase K) vortexed briefly, incubated overnight at 55°C, and 2 h at -20°C. Samples were then subjected to a second round of lyses by adding 50 µl more of new prepared extraction buffer, and incubation at 55°C for 2h. Proteinase K was inactivated boiling the sample 10 minutes, and DNA recovered after centrifugation of 10 minutes at 14.000 rpm. The pellet containing the dropping debris was utilized for microscopy analysis. **Twenty samples were**

**analysed**, from droppings collected in the peak season of presence of *C. suppressalis* (late August). Each sample was split in two, and one of the portions was saved for later analysis. As positive control a small fragment of antenna and of tarsus (same dimension of fragments retrieved in bats' droppings) were added to two different faeces samples prior to perform DNA extraction (to be sure that there aren't compounds inhibiting the PCR in the faeces). As negative control, DNA was extracted, with the same protocol described above, from fragments retrieved in bat droppings, and identified as "not Lepidoptera" specimens by microscopy analysis; they were two legs, a head, and head with antenna.

### PCR screening

PCR was carried with the universal primers ND2F/ND2Rev and C1-J- 2183/TL2-N-3014 could work also with DNA extracted from droppings, in this way we could know both if the DNA was intact, and if we could use the universal primers. The PCR conditions were the same as described above.



**Figure 1.-** PCR products with 28S primers run on 1% agarose gel, stained with ethidium bromide. Lanes 2,3,4,and10: fragments identified as "not Lepidoptera". Lane 1: Blank sample, without any DNA. Lane 5: DNA template from *C. suppressalis*. Lanes 6,7,8,9: droppings. PCR with C1-J-2183/TL2-N-3014 primers gave very faint bands, in droppings but no signal in "not Lepidoptera" samples (photo not shown).

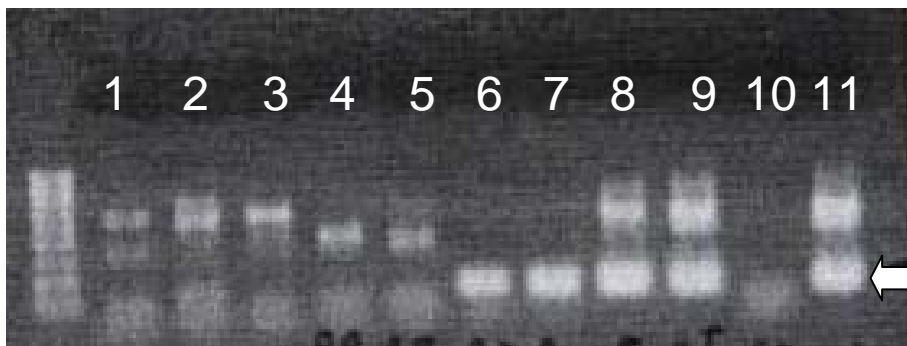
The specific couples of primers, 28S 333F/28S 434R, COI PPF1/COI PPR1d, and COI PPF2a/COI PPR2b, designed on *C. suppressalis* sequences, were the used, on total DNA extracted from droppings, from fragments of "not Lepidoptera", and from *C. suppressalis*.

The conditions were the same as described above, except for amplification cycles that were the following: 3min at 94 °C, followed by 35 cycles of 45s at 94 °C, 45s at 55 °C, 45s at 72°C, and a final extension of 5min at 72°C. Only DNA from *C. suppressalis* gave the expected bands

To improve the probability of detection of even small and/or few fragments of *C. suppressalis* we decided to perform a nested PCR, consisting of a first round of amplification with external primers,

on total DNA as template, followed by a second round with inner primers on the product from the previous amplification as template. For the 28S region the external primers were ND2F/ND2Rev, and the inner primers 28S 333F/28S 434R. For the COI the external primers were COI PPF1/COI PPR1d and the inner primers COI PPF2a/COI PPR2b.

With the external primer pairs the PCR conditions were the same as described above, but the annealing temperature was set at 55°C, and the number of cycles was 30. One ml of the PCR product was used as template for the second round of amplification, carried out at the same conditions, but for 35 cycles. PCR products were run on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide. To validate the method a number of positive samples were included in the analysis, such as DNA from *C. suppressalis*, and the DNA from droppings with *C. suppressalis* antenna and tarsus added. (Fig.2)



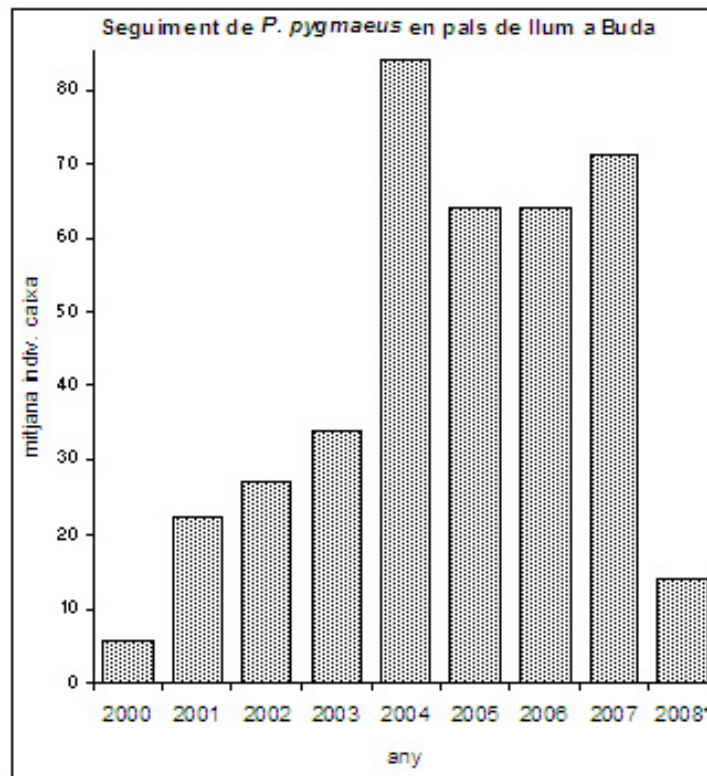
**Figure 2.** PCR products of nested amplification with 28S primers



**Figure 3.** PCR products of nested amplification with COI primers. Lane 1: fragment identified as "not Lepidoptera". Lanes 2, 3, 4, 5: bat droppings. Lanes 6,7: droppings with *C. suppressalis* antenna and tarso added. Lanes 8,9, 11: *C. suppressalis*. Lane 10: Blank sample, without any DNA. The white arrow show the 99bp and the 202bp long positive bands.

## 4. Resultats i anàlisi de dades

La primera revisió de caixes-refugi ha estat negativa mentre que a la segona s'hi ha observat 2 quiròpters, que representen una ocupació d'un 8,33% de les caixes en menys de mig any des de la seva col·locació. Si ens fixem amb la mitjana de quiròpters que han ocupat les caixes penjades a l'illa de Buda pel Parc Natural del Delta de l'Ebre (Flaquer et al. 2006) veiem que la mitjana d'individus per caixa un any després de la seva col·locació no arribava a 6 individus per caixa i no va ser fins 5 anys després que es va establir. Durant l'any 2008 s'han hagut de canviar totes les caixes penjades en arrossar i la població de quiròpters ha tingut una davallada de 71 a 14 indiv./caixa (figura 4).



**Figura 4.-** Mitjana d'individus de *P. pygmaeus* comptabilitzats en caixes situades en pals de llum d'arrossars de l'illa de Buda. \* Reposició de les caixes (col·locades el 1999) perquè s'havien fet malbé.

Els animals radiomarcats a mitjans de setembre pesaven, de mitjana, un 10% menys dels capturats a principi de setembre (taula 2; pàg. 7).

El primer any de radioseguiment aporta poques dades però s'observa un patró diferent d'ocupació de l'espai. Durant la primera setmana de setembre les femelles de *P. pygmaeus* han tingut una àrea de caça molt concentrada a l'entorn de les caixes on van ser capturades (figura 5). Per altra

banda durant la tercera setmana de setembre les femelles es van dispersar més (figura 6). Cal comentar, però, que amb les femelles radioseguides la 3 setmana de setembre només s'hi han tingut 36 contactes (s'entenen com animals caçant), mentre la primera setmana de radioseguiment ha aportat 108 contactes. Aquest fet també mostra que durant la 3 setmana les femelles es movien més i per això es perdien més fàcilment.

L'anàlisi genètic mitjançant marcadors moleculars de 20 excrements recol·lectats de caixes de Buda a l'agost ha donat un positiu irrefutable (s'han utilitzat 2 gens diferents). Per altra banda la troballa d'una antena de *C. suppressalis* en excrements han constatat que *P. pygmaeus* també depreda *C. suppressalis* de la segona corba de vol (Juny).

El pes mitjà d'una papallona de *Chilo suppressalis* sense ales és de 0,22 grams (taula 3).

<b>Pesades (n=60)</b>	<b>Grms 10 indiv</b>
P1 (n=10)	0,3318
P2 (n=10)	0,3018
P3 (n=10)	0,2877
P4 (n=10)	0,2481
P5 (n=10)	0,2273
P6 (n=10)	0,1523
mitja 10	<b>0,2581</b>
P sense ales de 10 papallones	<b>0,2269</b>

**Taula 3.-** Resultat de pesar 60 papallones en 6 pesades i la mitja.

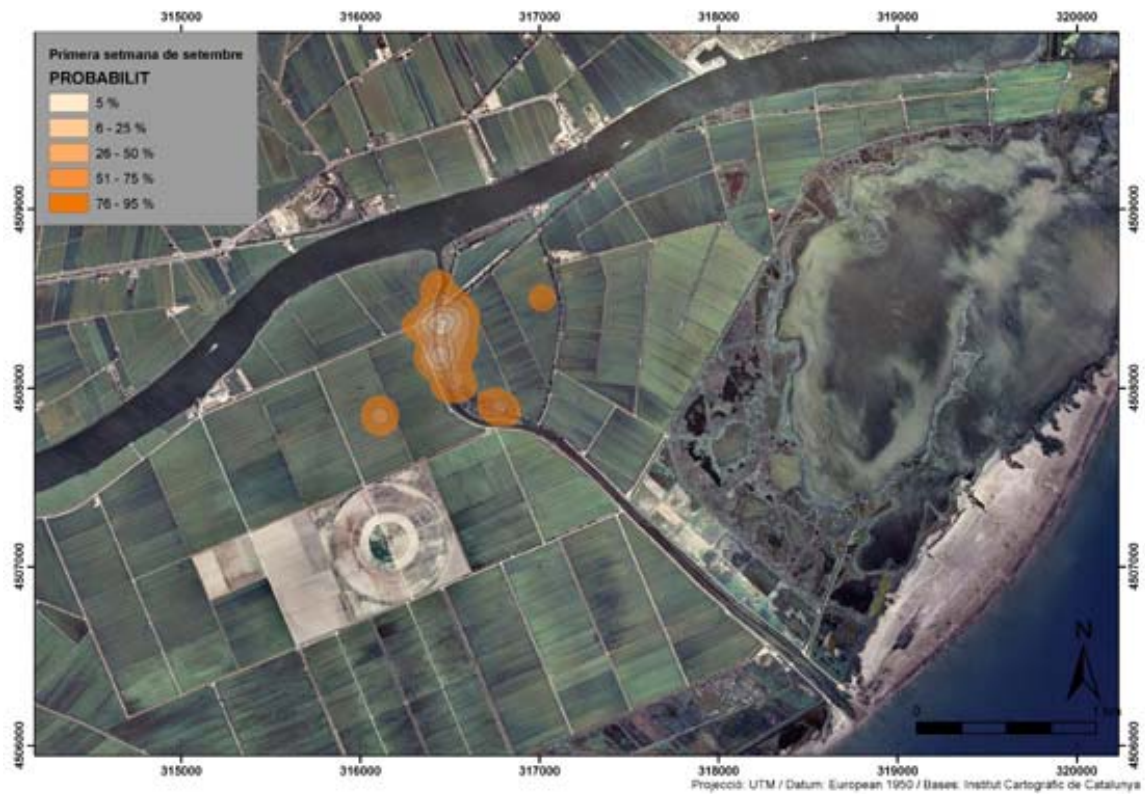


Figura 5.- "Buffers" en els quals s'indica les probabilitats que un punt de la mostra es trobi dins de cadascun dels polígons concèntrics (Arcview - Kernel anàlisi). Radioseguiment realitzat entre el 1/09/08 a 7/09/08 (taula 2).

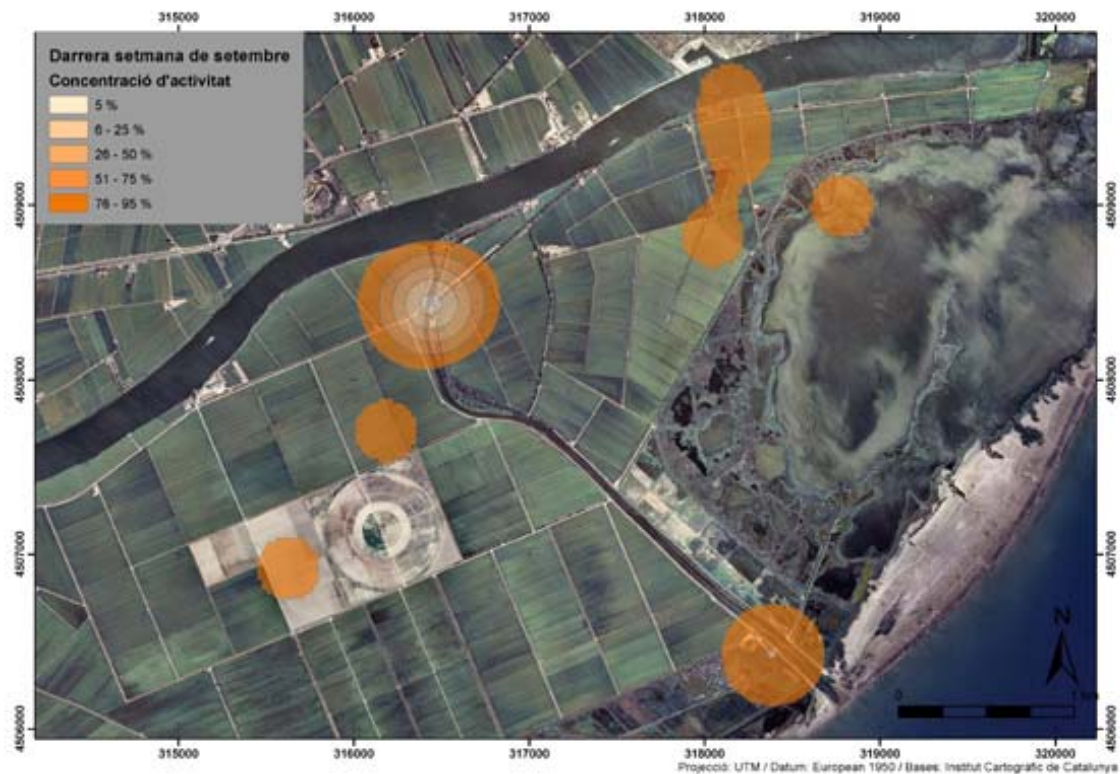


Figura 6.- "Buffers" en els quals s'indica les probabilitats que un punt de la mostra es trobi dins de cadascun dels polígons concèntrics (Arcview - Kernel anàlisi). Radioseguiment realitzat entre el 22/09/08 a 28/09/08 (taula 2).



## 5. Discussió

En general l'ocupació de caixes refugi per quiròpters és molt variable, així en el pitjor dels casos les caixes tarden anys en ocupar-se (o no s'ocupen mai) i en d'altres casos tarden mesos en ser ocupades pels primers quiròpters. Normalment el primer dels casos es dona quan hi ha molt refugi natural disponible (en arbre o cavitats en roca), seria el cas d'un bosc de ribera ben preservat (Flaquer et al. 2007b i referències allí citades). El segon dels casos és característic de zones amb poca disponibilitat de refugi i en canvi molt d'aliment, com seria un arrossar amb presència d'aiguamolls (Flaquer et al 2006).

Amb l'objectiu de comprovar la possible ocupació de caixes en arrossars, s'han penjat caixes en arrossars més o menys allunyats de llacunes o rius. Els resultats d'ocupació obtinguts en mig any (més d'un 8%) són positius. L'ocupació de les caixes acostuma a ser exponencial i és un bon símptoma que alguns animals les comencin a ocupar dins el primer any de col·locació. En tot cas caldrà esperar a l'estiu vinent per veure si aquesta ocupació incrementa.

El radioseguiment és, segurament, una de les metodologies d'estudi de quiròpters més complexes i implica varis anys d'esforç abans d'obtenir resultats significatius. Els resultats, però, són molt interessants ja que ofereixen dades sobre refugis, vies de pas i zones de caça dels quiròpters (Flaquer et al. 2008). L'objectiu de radioseguir femelles de *P. pygmaeus* ha estat el de confirmar un comportament de caça diferenciat segons els períodes d'activitat de papallona de l'arròs (alta o baixa). Els resultats evidencien que *P. pygmaeus* ha estat més estona caçant a prop de les caixes quan més disponibilitat de papallona han tingut (principi de setembre). Aquesta dada coincideix amb la hipòtesi plantejada el 2007 que proposa que en cas de menjar *C. suppressalis* els quiròpters refugiats en caixes a prop d'arrossar no farien grans desplaçaments per caçar (Flaquer et al. 2007c). Com la major part d'animals, els quiròpters cerquen el balanç energètic òptim. En tot cas manca esforç de radioseguiment per realitzar en properes campanyes.

A banda de l'ús d'hàbitat el radioseguiment ha servit per confirmar que els quiròpters són capaços de desplaçar-se varis quilòmetres des de les caixes on es refugien i per tant la col·locació de caixes allunyades de llacunes no representa un impediment alhora d'utilitzar les llacunes com a zona de caça (figura 6). Igualment les caixes situades en llacunes poden servir per quiròpters que vagin a caçar a arrossars.

L'anàlisi de dieta mitjançant identificació de peces d'insectes trobades en excrements implica un elevat coneixement d'entomologia ja que els quiròpters masteguen els insectes que cacen (sobretot els que són una mica grans com el *C. suppressalis*) i en els excrements només hi resten mandíbules, tarsos i d'altres petites parts dels insectes. A més a més les papallones tenen molta part tova que incrementa la dificultat de trobar restes de peces en excrements. En aquest sentit la troballa d'una antena de *C. suppressalis* es pot considerar com a una important evidència de que *P. pygmaeus* caça *C. suppressalis* en segona corba de vol (Juny).

Els anàlisi amb marcadors genètics, per altra banda, són més costosos de preparar però un cop elaborats els marcadors permeten mecanitzar el procés de busca d'insectes concrets en excrements (en aquest cas *C. suppressalis*). Aquesta metodologia és inèdita en l'estudi de *C. suppressalis* i per aquest fet cal temps per depurar-la i incrementar la sensibilitat alhora de detectar els marcadors més adients. Els resultats obtinguts confirmen que *P. pygmaeus* depreda *C. suppressalis* a finals d'agost.

El present estudi té com a objectiu principal confirmar la presència de la papallona de l'arròs en la dieta de *P. pygmaeus* i aquest fet s'ha aconseguit amb les dues metodologies esmentades. Considerant que una papallona aporta més energia que un dípter, la confirmació de presència de *C. suppressalis* en la dieta dels quiròpters dona credibilitat a la hipòtesi que fa referència a que *P. pygmaeus* caça en aiguamolls i rius tot l'any a excepció de quan apareix la papallona en l'arrossar (Flaquer et al. 2007c).

La baixa aparició de papallona en la mostra analitzada (5%) pot ser deguda a que els quiròpters no capturin massa papallona o a una baixa sensibilitat dels anàlisis (més probable, en ser una tècnica complicada i nova). La millora d'aquests anàlisis es pot realitzar canviant els mètodes d'extracció de DNA (utilitzant columnes purificades o resines) i/o canviant les condicions dels PCR (aplicant diferents taq polimerasses, diferent cicles). Sigui com sigui seria molt interessant poder tenir excrements de *P. pygmaeus* que hagi menjat, amb tota seguretat, *C. suppressalis* (això es pot fer mantenint un animal en captivitat en un ambient ple papallona).

Malgrat són dades totalment especulatives i donada la dificultat d'extrapolar la quantitat de papallones de l'arròs que poden depredar les poblacions de *P. pygmaeus* del delta de l'Ebre s'ha mirat de relacionar el pes mig d'una papallona amb els requeriments de menjar (en pes) dels

quiròpters. S'estima que donada l'elevada despesa energètica que implica volar i al seu ràpid metabolisme, un quiròpter és capaç de menjar insectes per l'equivalent a un terç del seu propi pes cada nit (Ober, 2008). En el cas de *P. pygmaeus* serien 2 grams d'aliment per nit. Si es considera que un individu de *C. suppressalis* pesa 0,2 gr. (taula 4) es podria considerar que en períodes d'elevada activitat de papallona un individu de *P. pygmaeus* podria depredar 88 papallones per nit. Així, per exemple els 4391 *P. pygmaeus* presents en les caixes-refugi col·locades a l'illa de Buda depredarien un total de 387.043 papallones de l'arròs per nit. En el pitjor dels casos, si *C. suppressalis* només representés el 5% de la dieta de *P. pygmaeus*, els quiròpters presents a les caixes de Buda igualment depredarien 19.352 papallones per nit.

Cal tenir en compte que hi ha estudis (p. ex. Cleveland et al. 2006 i Ober 2008) que donen valors econòmics a la presència d'aquests quiròpters i, per exemple, consideren que els productors de cotó del sud de Texas s'estalvien fins a 741.000 dòlars l'any gràcies a la presència dels quiròpters. A aquestes dades econòmiques caldria sumar-hi l'avantatge mèdica i social que implica la reducció d'insecticides en zones de conreus extensius.

Després de dos anys d'investigació utilitzant 3 metodologies d'estudi: 1) mesura d'activitat de cacera de quiròpters amb detectors d'ultrasons, 2) anàlisi de dieta de quiròpters i 3) radioseguiment; es pot afirmar que *P. pygmaeus* està exercint un control sobre la població de *C. suppressalis*. A partir d'aquesta premissa caldrà treballar per tal de saber fins a quin punt els quiròpters poden ser un control biològic de la plaga. En aquest sentit és interessant observar que la davallada de població de quiròpters dels arrossars de l'illa de Buda, causada per la reposició de caixes del 2008, s'ha vist reflexada en un increment de la població de papallona a Buda que ha implicat necessitat de tractament amb insecticides (dades de l'ADV de les Terres de l'Ebre). Aquest seria un primer indici de l'interès que pot tenir la col·locació de caixes per afavorir les poblacions de quiròpters i reduir el nivell de plaga de *C. suppressalis*.

De cara a properes campanyes caldria culminar la fase de radioseguiment i ús d'hàbitat de *P. pygmaeus* i penjar caixes en noves zones on s'hagi detectat elevada activitat de papallona. La penjada de caixes hauria d'anar coordinada amb els agricultors que mostrin més interès pel projecte.

Després de veure el comportament dels quiròpters resseguint les línies d'arbres de l'illa de Buda i d'acord amb bibliografia especialitzada (Bach i Limpens 2002) seria de gran interès incrementar la

mobilitat dels quiròpters pels arrossars plantant línies d'arbres o arbusts (mín. 2m) en alguns marges de pistes i carreteres. Aquesta tasca es podria coordinar amb el Parc Natural del Delta de l'Ebre.



**Figura 7.-** Els puntes de fletxa en blanc intens marquen les vies de pas dels quiròpters seguint arbres i arbusts plantats al marge de pistes i carreteres.

## 6. Bibliografia de consulta

- Bach, L i Limpens, H. (2002). *Bats and landscape planning in Germany*. European Bat Research Conference, Le Havre, France (August 2002). Irish bat Conference, Navan, Ireland (May 2003) c/o Lothar Bach, Freilandforschung, zool. Gutachten, Bremen, Germany.
- Barrientos J. A. (1988). *Bases para un curso práctico de entomología*. Asociación Española de Entomología, Barcelona: 3-75.
- Campbell B.C., Steffen-Campbell J.D., Werren J.H. (1993) *Insect Mol. Biol.* 2: 237-255.
- Chinery M. (1977). *Guía de campo de los insectos de España y de Europa*. Omega, Barcelona: 5-402.
- Cleveland, C. J., M. Betke, P. Frederico, et al. (2006). Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in south-central Texas. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4:238-243.
- Flaquer, C. i R. Ruíz-Jarillo. 2003. Primers passos en l'estudi de presència i utilització de l'habitat per part dels quiròpters al Parc natural del Delta de l'Ebre. *Soldó*: 20 pàg. 9.
- Flaquer C., R. Jarillo, i A. Arrizabalaga. (2004). Aportación de nuevas citas a la fauna quiropterológica de Cataluña. *Galemys* 16(2): 39-55
- Flaquer C., I. Torre and R. Ruíz-Jarillo. (2006). The value of bat boxes in the conservation of *Pipistrellus pygmaeus* in wetland rice paddys. *Biol. Conserv.*128: 223-230.
- Flaquer, C., Torre, I., and Arrizabalaga, A. (2007a). Comparison of sampling methods for inventory of bat communities. *Journal of Mammalogy*. 88 (2): 526-533.
- Flaquer C., Torre, I., Arrizabalaga, A. (2007b). Selección de refugios, gestión forestal y conservación de los quirópteros forestales. En: Camprodon, J., Plana, E. (Eds.), *Conservación de la biodiversidad y gestión forestal: su aplicación en la fauna vertebrada*, Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Flaquer C., Ràfols R. G., Puig X., i A. Arrizabalaga (2007c). Proposta per a l'estudi de la ratapinyada nana (*P. pygmaeus*) com a control de la plaga de la papallona de l'arròs (*C. suppressalis*) al delta de l'Ebre. Encàrrec del Departament d'Agricultura Alimentació i Acció Rural, i de l'Agrupació de defensa Vegetal de l'Arròs i altres cultius del delta de l'Ebre. Pp. 22.
- Flaquer, C., Puig-Montserrat, X., Burgas A., i D. Russo (2008). Habitat selection by Geoffroy's bats (*Myotis emarginatus*) in a rural Mediterranean landscape: implications for conservation. *Acta Chiropterologica* 10 (1) 61-67.

- Goiti U., P. Vecin., I. Garin., M. Saloña i J. R. Aihartza. 2003 .Diet and prey selection in kuhl's pipistrelle *Pipistrellus kuhlii* (Chiroptera: Vespertilionidae) in south-western Europe. *Acta Chiropterologica*: 48(4) 457-468.
- Hill, D. A. and F. Greenaway (2005). "Effectiveness of an acoustic lure for surveying bats in British woodlands." *Mammal Review* **35**(1): 116-122.
- McAney C., Shiel C., Sullivan C. and Fairley J. (1991). The analysis of bat droppings. *Mammal Society, London*, pp. 48
- Ober H. K. (2008). Insect Pest Management Services Provided by Bats. Document WEC245, Wildlife Ecology and Conservation Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Palomo, L. J., J.G. Gisbert i J. Blanco. (2007). *Atlas de los Mamíferos Terrestres de España*. Madrid. Pp. 564.
- Puig, X (2008). *Propuesta de protocolos para el monitoreo de murciélagos en España*. Ministerio de Medio ambiente i Sociedad Española para la Conservación y Estudio de los Mamíferos (SECEM). Inédito. Pp. 72
- Rozen S., Skaletsky H.J. (2000) In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Simon C., Frati F., Bechenbach A., Crespi B., Liu H., Flok P. (1994) *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Vickerman D.B., Hoddle M.S., Triapitsyn S., Stothamer R. (2004). *Biological Control* 31:338-345.
- White, G. C., and R. A., Garrot. 1990. *Analysis of wildlife radio-tracking data*. London. Academic Press.