

Estructura genètica mitocondrial del murri dels rosers (*Spialia rosae*) i primeres citacions de l'espècie a Catalunya (Papilionoidea: Hesperiiidae)

Joan C. Hinojosa¹, Juan Carlos Vicente², Juan Hernández-Roldán³ & Roger Vila¹

¹Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49; E-08003 Barcelona
joancarles.hinojosa@ibe.upf-csic.es; roger.vila@csic.es

²Witerico 9A, Bajo B; E-28025 Madrid

fotobichos@yahoo.es

³Departamento de Biología (Zoología), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin 2; E-28049 Madrid

hernandez.rolan@gmail.com

Abstract. Mitochondrial genetic structure of *Spialia rosae* and first records of the species in Catalonia (Papilionoidea: Hesperiiidae). *Spialia rosae* Hernández-Roldán, Dapporto, Dincă, Vicente & Vila, 2016 is an Iberian endemism found across most of the major mountain ranges and highlands of the Peninsula. However, its exact range is still unknown since it cannot be easily identified due to the morphological similarity to *Spialia sertorius*, a more widespread species. Despite this, they can be distinguished by the larval host plant and by using DNA data. In this study, we have sequenced the cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) barcode region of several *Spialia* individuals across Catalonia in order to assess the presence of *S. rosae*. We additionally included all the available *COI* sequences and analysed the mitochondrial genetic structure of this species. We show that *S. rosae* only has three distinct haplotypes separated by one mutation, as well as a low haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (π). Thus, for this genomic region, it is one of the most homogeneous butterfly species of Europe. DNA-based identification revealed the presence of two populations in Catalonia, one in El Port mountain range and another in the Pre-Pyrenees. These two populations display two distinct haplotypes separated by one mutation, which suggests that they have independent phylogeographic histories and that they are currently not connected. Overall, we encourage to maintain prospection efforts in order to assess its abundance and full distribution, a key step prior to evaluate its conservation status in Catalonia. Finally, we propose the common Catalan name of «murri dels rosers» to refer to this species.

Resum. *Spialia rosae* Hernández-Roldán, Dapporto, Dincă, Vicente & Vila, 2016 és un endemisme ibèric que es troba a la majoria dels principals sistemes muntanyosos i altiplans de la Península. Tanmateix, la seva distribució exacta encara no es coneix, ja que no es pot identificar fàcilment a causa de les seves semblances morfològiques amb *Spialia sertorius*, una espècie més estesa. No obstant això, es poden distingir segons la planta nòcrica de les erugues i usant dades d'ADN. En aquest estudi hem seqüenciat la regió del codi de barres genètic del gen citocrom c oxidasa subunitat I (*COI*) de diversos individus de d'arreu de Catalunya amb l'objectiu d'avaluar la presència de *S. rosae*. A més, hem inclòs totes les seqüències del *COI* disponibles i hem analitzat l'estructura genètica mitocondrial de l'espècie. Mostrem que només té tres haplotips diferents separats per una mutació, així com una diversitat d'haplotips (Hd) i una diversitat nucleotídica (π) baixes. En conseqüència, per a aquesta regió genòmica és una de les espècies de papallona més homogènies d'Europa. La identificació per ADN ha revelat la presència de

dues poblacions a Catalunya, una al massís del Port i una altra al Prepirineu. Aquestes dues poblacions presenten dos haplotips diferents, separats per una mutació, cosa que suggereix que tenen històries filo-geogràfiques independents i que actualment no estan connectades. Amb tot, animem a mantenir els esforços de prospecció per conèixer la seva abundància i distribució completa, un pas clau per avaluar-ne l'estatus de conservació a Catalunya. Finalment, proposem el nom comú català de «murri dels rosers» per referir-se a aquesta espècie.

Keywords: Lepidoptera, Papilionoidea, Hesperiiidae, *Spialia rosae*, Mitochondrial genetic structure, first records, Catalonia, Iberian Peninsula.

Introducció

L'any 2016 es va publicar el descobriment d'una nova espècie de papallona a la península Ibèrica, batejada com a *Spialia rosae* Hernández-Roldán, Dapporto, Dincă, Vicente & Vila, 2016. Aquesta espècie havia passat desapercebuda per les semblances morfològiques amb el murri de la pimpinella, *Spialia sertorius* (Hoffmannsegg, 1804), ja que són virtualment idèntiques en la morfologia alar i en l'aparell genitàlic (Hernández-Roldán *et al.* 2016). Tanmateix, les dues espècies tenen diferències genètiques, bioquímiques i també ecològiques: mentre que *S. sertorius* és força generalista en les preferències d'hàbitat i les seves erugues s'alimenten de *Poterium* spp., *S. rosae* prefereix hàbitats de muntanya i utilitza *Rosa* spp. com a planta nutrícia (Hernández-Roldán *et al.* 2016).

Spialia rosae es distribueix en muntanyes i altiplans de la península Ibèrica preferentment per sobre dels 1.000 m i per sota dels 2.000 (Hernández-Roldán *et al.* 2016), encara que s'ha citat des dels 469 m fins als 2.640 (Hernández-Roldán *et al.* 2018); fins ara només s'havia trobat a Espanya. Al sud peninsular s'ha citat a la Sierra de la Sagra i a Sierra Nevada; al centre i nord ocupa el Sistema Ibèric, el Sistema Central, bona part de la Submeseta Nord, serralada Cantàbrica i Prepirineu occidental (Hernández-Roldán *et al.* 2018). La seva distribució, però, continua sense ser del tot coneguda, ja que els individus de *S. rosae* només es poden identificar mitjançant la planta nutrícia de l'eruga o anàlisis genètiques.

En aquest article documentem per primer cop la presència de *S. rosae* a Catalunya. Per a la identificació dels individus s'ha seqüenciat el fragment del codi de barres genètic (DNA barcode) del gen citocrom c oxidasa subunitat I (*COI*). A més a més, s'ha usat aquesta informació per aclarir l'estructura genètica mitocondrial de l'espècie i per esbrinar amb quines poblacions estarien relacionats els exemplars catalans.

Materials i mètodes

Mostres analitzades

Un total de 17 individus del gènere *Spialia*, 16 adults i una eruga, s'han seqüenciat per ser identificats. El seu origen geogràfic està representat a la figura 1a. En aquests llocs s'han prospectat peus del gènere *Rosa* per trobar-hi ous i/o erugues. Per a les anà-

lisis genètiques de *S. rosae* s'han inclòs quatre mostres catalanes de tres localitats diferents, dues del Port i una del barranc de Miralles (terme municipal de Tremp). Setanta-cinc seqüències més s'han extret de Genbank. Les dades sobre les mostres utilitzades en les anàlisis, incloent-hi els codis de Genbank, s'especifiquen a l'annex 1.

Seqüenciació

L'ADN es va extreure mitjançant la resina Chelex 100 sodium form, 100-200 mesh (BIO-RAD). Com a teixit es va fer servir una pota que es va introduir en 100 µl de la resina Chelex diluïda al 10 % juntament amb 5 µl de Proteïnasa K (20 mg/ml). Les mostres es van incubar a 55 °C durant tota la nit. En acabat es van escalfar a 100 °C durant 15 minuts.

Per a l'amplificació del *COI* es van fer servir els encebadors LepF1 i LepR1 (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3' i 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA-ATCA-3' respectivament), d'on es va obtenir el fragment de 658pb que correspon a la regió del codi de barres genètic. Les condicions aplicades van ser: un primer pas de desnaturalització a 92 °C durant 60 s, 5 cicles compresos per una desnaturalització a 92 °C durant 15 s, un alineament a 48 °C durant 45 s i una elongació a 62 °C durant 150 s, als quals es van afegir 30 cicles més en què es va apujar la temperatura de l'alineament a 52 °C, i es va acabar amb una elongació final a 62 °C durant 7 min. Els productes de la PCR es van enviar a Macrogen Spain (Madrid, Espanya), on es van purificar i seqüenciar amb el mètode Sanger.

Anàlisis genètiques

Les seqüències es van visualitzar i alinear amb Geneious Prime 2019.03 (<https://www.geneious.com>). Es va construir una xarxa d'haplotips del fragment del codi de barres genètic del *COI* usant l'opció TCS Newtork del programa PopArt v1.7 (Leigh & Bryant 2015). Es va calcular la diversitat d'haplotips (Hd) i diversitat nucleotídica (π) amb les funcions hap.div i nuc.div, respectivament, incloses al paquet d'R pegas v1.0-1 (Paradis 2010).

Resultats

El 30.VI.2020, Joan C. Hinojosa i Roger Vila van capturar dos adults a prop del despoblat de Rafalgarí, al massís del Port (40,744272, 0,185517; 1.220 m). Dos dies després, el 2.VII.2020, es va capturar un altre adult al mateix massís, al sud-oest de la font de Bunyols (40,808319, 0,285569; 1.222 m). També cal destacar que l'1.VII.2020 es van trobar, al vessant valencià del massís (entre el Boixar i Fredes), diversos ous en un peu de *Rosa* sp. (40,68265, 0,154972; 1.163 m; fig. 2a). En aquests tres punts, l'hàbitat consistia en clars de pinedes de pi roig (*Pinus sylvestris*). Paral·lelament, el 13.VII.2020, Juan Carlos Vicente i Juan Hernández-Roldán van trobar una eruga de primer estadi sobre *Rosa agrestis* al barranc de Miralles (fig. 2b), al terme municipal de

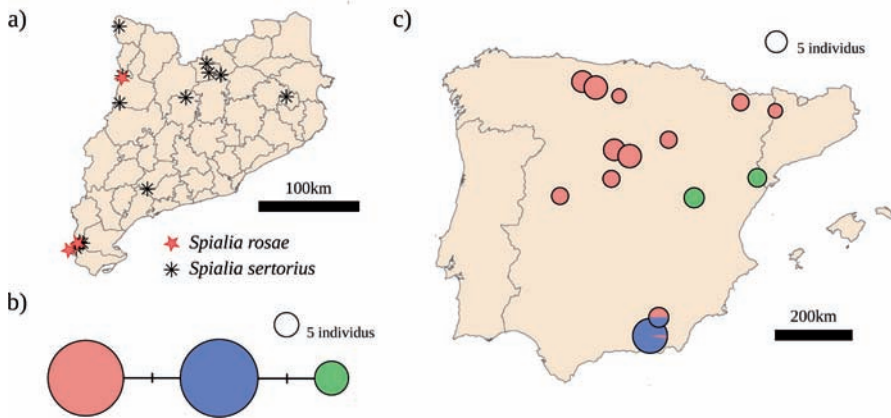


Fig. 1 Distribució: **a**, localitats on s'han trobat individus de *Spialia rosae* i *Spialia sertorius* a Catalunya. Els individus s'han identificat mitjançant el fragment del codi de barres genètic del gen *COI*; **b**, xarxa d'haplotips del fragment del codi de barres genètic del gen *COI*. La mida dels cercles és proporcional al nombre de seqüències utilitzades; **c**, distribució en l'espai dels haplotips del fragment del codi de barres genètic del gen *COI* de *Spialia rosae*. Els individus inclosos en el mateix quadrat d'1° de latitud x 1° de longitud estan agrupats en el mateix cercle. La mida dels cercles és proporcional al nombre de seqüències utilitzades.



Fig. 2 Hàbitat de *Spialia rosae*: **a**, hàbitat al vessant valencià del Port i detall d'un dels ous; **b**, hàbitat al barranc de Miralles i fotografia de l'eruga sobre *Rosa agrestis*.

Tremp (42,30255, 0,759634; 746 m). Aquí, l'hàbitat difereix considerablement del que ocupa al Port, ja que es tracta d'una àrea oberta amb vegetació arbustiva dispersa. Els individus van ser posteriorment identificats amb la seqüenciació del fragment del codi de barres del *COI*. Les localitats catalanes estan marcades a la figura 1a.

Respecte al fragment del codi de barres genètic del *COI*, la diversitat d'haplotips (H_d) va ser de 0,5839, i la diversitat nucleotídica (π), de 0,0012. De fet, de les 79 seqüències disponibles, només es van obtenir tres haplotips (fig. 1b, c). Un és present a

tota la Península tret del sud del Sistema Ibèric. A una mutació de distància se'n troba un altre d'endèmic del Sistema Bètic i, a una mutació d'aquest, n'hi ha un darrer d'endèmic del sud del Sistema Ibèric. Per tant, només dues mutacions separen els haplotips més diferenciats. Pel que fa als individus catalans, els del Port comparteixen l'haplotip del sud del sistema Ibèric. En canvi, l'haplotip de l'individu del barranc de Miralles correspon al que s'estén per tota la península Ibèrica.

Discussió

Les anàlisis genètiques van mostrar que *S. rosae* té tres haplotips diferents separats per una sola mutació (fig. 1b), cosa que es tradueix en una baixa diversitat d'haplotips ($Hd=0,5839$) i una baixa diversitat nucleotídica ($\pi=0,0012$). Això la converteix, pel que fa a la regió del codi de barres genètic del *COI*, en una de les espècies més homogènies d'Europa (Dincă *et al.* 2021). Les poblacions catalanes tenen dos d'aquests haplotips (fig. 1c): la del Port té l'haplotip endèmic del sud del sistema Ibèric i la del barranc de Miralles té l'haplotip que s'estén per tota la península llevat del sud del sistema Ibèric. Aquest fet suggereix que actualment les dues poblacions no estan connectades i que, de fet, tindrien històries filogeogràfiques diferents i haurien colonitzat Catalunya de forma independent. D'aquesta manera, la població del Port sí que estaria connectada (o hauria estat connectada fins recentment) amb les altres poblacions del sud del Sistema Ibèric, i la població del barranc de Miralles també estaria connectada (o hauria estat connectada fins recentment) amb la resta de poblacions del Prepirineu.

Les dades que oferim aquí difícilment aclareixen si *S. rosae* està amenaçada a Catalunya. Tanmateix, podem dir que no és una espècie comuna, ja que tan sols s'ha pogut trobar en tres localitats, dues de les quals molt properes. Sembla rara al Prepirineu català, on només s'ha trobat una eruga en el primer estadi sobre *Rosa agrestis*, malgrat haver-se revisat nombrosos peus de *Rosa* sp. i haver-se seqüenciat adults de *Spialia* de diverses localitats. L'espècie podria ser més comuna al massís del Port, on es van identificar tant adults, tres sobre el total de set *Spialia* seqüenciades, com ous, al vessant valencià del massís.

Amb aquest estudi també animem els lepidopteròlegs a fer una recerca més exhaustiva de l'espècie a Catalunya. Tenint en compte que prefereix hàbitats situats a més de 1.000 m (Hernández-Roldán *et al.* 2016) i, fins on sabem, només hi ha una citació per sota dels 700 (Hernández-Roldán *et al.* 2018; Monasterio León *et al.* 2017), no creiem que, a Catalunya, la població del Port estigui estesa més enllà del mateix massís. Així, doncs, suggerim centrar els esforços al Pirineu, Prepirineu i muntanyes i altiplans directament connectats amb aquestes muntanyes. Només amb més esforç de prospecció, sobretot centrat en la presència d'ous i erugues sobre *Rosa* sp., es podrà determinar la seva abundància i extensió real al territori, dades imprescindibles per avaluar-ne l'estat de conservació.

Finalment, atès que *S. rosae* no disposa de nom comú en català, creiem convenient fer una proposta en aquest sentit. A causa de la seva alimentació exclusiva sobre *Rosa*

spp. durant l'etapa d'eruga i en contraposició al murri de la pimpinella (*S. sertorius*), proposem anomenar-la «murri dels rosers».

Agraïments

Agraïm a Llorenç Sáez la seva ajuda en la determinació de les plantes. El suport financer per a l'elaboració d'aquest article s'ha obtingut dels projectes PID2019-107078-GB-I00, finançat per MCIN/AEI/10.13039/501100011033, i 2017-SGR-991, finançat per la Generalitat de Catalunya, atorgats a Roger Vila, i del contracte BES-2017-080641, finançat per MCIN/AEI/10.13039/501100011033 i «FSE inverteix en el teu futur», atorgat a Joan C. Hinojosa.

Referències bibliogràfiques

- Dincă, V., Dapporto, L., Somervuo, P., Vodă, R., Cuvelier, S., Gascoigne-Pees, M., Huemer, P., Mutanen, M., Hebert, P. D. N. & Vila, R. 2021. High resolution DNA barcode library for European butterflies reveals continental patterns of mitochondrial genetic diversity. *Communs Biol.*, 4(1): 1-11.
- Hernández-Roldán, J. L., Dapporto, L., Dincă, V., Vicente, J. C., Hornett, E. A., Šichová, J., Lukhtanov, V., Talavera, G. & Vila, R. 2016. Integrative analyses unveil speciation linked to host plant shift in *Spialia* butterflies. *Molec. Ecol.*, 25(17): 4267-4284.
- Hernández-Roldán, J. L., Vicente, J. C., Vila, R., & Munguira, M. L. 2018. Natural history and immature stage morphology of *Spialia* Swinhoe, 1912 in the Iberian Peninsula (Lepidoptera, Hesperidae). *Nota lepid.*, 41: 1.
- Leigh, J. W. & Bryant, D. 2015. Popart: full feature software for haplotype network construction. *Meth. Ecol. Evol.*, 6(9): 1110-1116.
- Monasterio León, Y., Lertxundi Manterola, D. & Escobés Jiménez, R. 2017. Nuevos registros de lepidópteros de actividad diurna (Lepidoptera: Papilionoidea, Zygaenoidea) en Euskadi, Navarra y áreas limítrofes. *Arquives ent.*, 17: 27-42.
- Paradis, E. 2010. Pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3): 419-420.

Data de recepció: 20 de setembre de 2021

Data d'acceptació: 18 d'octubre de 2021

Annex 1 Mostres de *Spialia rosae* utilitzades per a les anàlisis genètiques.

GenBank ID	IBE ID	Localitat	Altitud (m)
KU905376	RVcoll06A280	Barranco de los Lagartos, Cádiar, Granada	860
KU905447	RVcoll09V468	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905465	RVcoll09V471	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
GU676128	RVcoll09V519	Carretera cap a Veleta, Sierra Nevada, Granada	2.640
KU905525	RVcoll09V936	Sierra de la Sagra, Granada	~1.700
KU905408	RVcoll09X678	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905577	RVcoll10A098	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905510	RVcoll10A099	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905423	RVcoll11G117	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905425	RVcoll11G118	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905503	RVcoll11G119	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905440	RVcoll11G120	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905454	RVcoll11G121	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905349	RVcoll11G122	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905541	RVcoll11G123	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905461	RVcoll11G124	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905513	RVcoll11G125	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905519	RVcoll11G126	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905419	RVcoll11G127	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905372	RVcoll11G128	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905439	RVcoll11G129	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905546	RVcoll11G131	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905396	RVcoll11G132	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905559	RVcoll11G133	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905450	RVcoll11G134	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905486	RVcoll11G135	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905357	RVcoll11G136	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905538	RVcoll11G137	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905501	RVcoll11G138	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905420	RVcoll11G139	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905498	RVcoll11G140	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905521	RVcoll11G141	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905497	RVcoll11G144	Lagunilla Seca, Sierra Nevada, Granada	2.295
KU905449	RVcoll11G145	Lagunilla Seca, Sierra Nevada, Granada	2.295
KU905520	RVcoll11G146	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905572	RVcoll12L063	Puerto del Cubillo, Tragacete, Cuenca	1.629
KU905411	RVcoll12L065	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905456	RVcoll12L068	Puerto del Cubillo, Tragacete, Cuenca	1.629
KU905560	RVcoll12L069	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905495	RVcoll12L086	Riaño, León	1.610
KU905558	RVcoll12L088	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	2.090
KU905446	RVcoll12L091	El Vallecillo, Teruel	1.530
KU905529	RVcoll12Q460	Estalaya, Palencia	1.145
KU905568	RVcoll12Q461	Grado del Pico, Segovia	1.260
KU905575	RVcoll13S881	Besande, León	1.275
KU905462	RVcoll13S883	Besande, León	1.275

GenBank ID	IBE ID	Localitat	Altitud (m)
KU905475	RVcoll13S893	Talamillo del Tozo, Burgos	1.010
KU905531	RVcoll13S894	Humada, Burgos	1.040
KU905491	RVcoll14A013	Besande, León	1.275
KU905455	RVcoll14A018	Velilla de Tarilonte, Sierra del Brezo, Palencia	1.195
KU905470	RVcoll14A019	Pico Yordas, Riaño, León	~1.700
KU905410	RVcoll14A020	Pico Yordas, Riaño, León	~1.700
KU905427	RVcoll14A024	Aguilafuente, Segovia	873
KU905458	RVcoll14A025	Pico Yordas, Riaño, León	~1.700
KU905566	RVcoll14A027	Pico Yordas, Riaño, León	~1.700
KU905432	RVcoll14A034	Castrosema de Arriba, Segovia	1.050
KU905573	RVcoll14B686	Pradales, Segovia	1.250
KU905389	RVcoll14B687	Pradales, Segovia	1.250
KU905442	RVcoll14D318	Besande, León	1.275
KU905477	RVcoll14D320	Puerto de la Ragua, Sierra Nevada, Granada	1.465
KU905507	RVcoll14D744	Plataforma de Candelario, Salamanca	1.765
KU905418	RVcoll14N293	Lastras de Cuellar, Segovia	873
KU905557	RVcoll14N313	Torrelapaja, Zaragoza	1.015
KU905494	RVcoll14N314	Castrillo de Duero, Valladolid	860
KU905407	RVcoll14N316	Castrillo de Duero, Valladolid	860
KU905341	RVcoll14N317	Sierra de Cabrejas, Soria	1.125
KU905369	RVcoll14N318	La Acebeda, Sierra de Guadarrama	1.870
KU905417	RVcoll14N319	Rábano, Valladolid	900
KU905567	RVcoll14N321	Rascafría, Sierra de Guadarrama	1.940
KU905534	RVcoll14N322	Sabiñánigo, Huesca	895
KU905526	RVcoll14N323	Asín de Broto, Huesca	1.045
KU905516	RVcoll14V493	Sierra de Pradales, Segovia	1.185
KU905428	RVcoll14V495	El Espinar, Segovia	1.278
KU905514	RVcoll14V497	Arcones, Segovia	1.285
KU905377	RVcoll14V918	Plataforma de Candelario, Salamanca	1.765
OK205889	RVcoll19E229	Rafalgarí, massís dels Ports, Tarragona	1.220
OK205890	RVcoll19E237	Rafalgarí, massís dels Ports, Tarragona	1.220
OK205891	RVcoll19E392	Barranc de Miralles, Tremp, Lleida	746
OK205892	RVcoll19K152	Font de Bunyols, massís dels Ports, Tarragona	1.222