

Genètica i distribució de la bruna de secà, *Hyponephele lupina* (Costa, 1836), a Catalunya (Lepidoptera: Nymphalidae)

Joan Carles Hinojosa¹, Xavier Mérit² & Roger Vila¹

¹ Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49; E-08003 Barcelona

² 51, rue Galliéni; F-91120 Palaiseau, França

Abstract. Genetics and distribution of the Oriental Meadow Brown *Hyponephele lupina* (Costa, 1836) in Catalonia (Lepidoptera: Nymphalidae). The Oriental Meadow Brown (*Hyponephele lupina* (Costa, 1836)) is a scarce species in Catalonia and only five records –all from the last century– have ever been confirmed. In this study, we present two new records, both from July 2017, that prove that this species is present in Catalonia. One record seems to correspond to a hitherto unknown population in La Cerdanya in the eastern Pyrenees. We sequenced part of the mitochondrial gene *cytochrome oxidase subunit I* of one Catalan sample, which had a haplotype that can be included in the same clade as other Iberian samples, as indicated by its Bayesian phylogeny. This phylogeny also revealed a division of *H. lupina* into at least two deeply diverged lineages with a minimum distance of 3.3 %, one present in Iberia and the other in Asia, that split ca. 3.0 (± 1.3) million years ago.

Resum. La bruna de secà (*Hyponephele lupina* (Costa, 1836)) és una espècie escassa a Catalunya, on només se n'han confirmat cinc citacions, totes del segle passat. En aquest estudi ratifiquem la presència de l'espècie i hi afegim dues citacions més, totes dues del juliol del 2017. La de la Cerdanya correspon a una població allunyada de la resta i mai no registrada anteriorment. Vam seqüenciar una part del gen *citocrom c oxidasa subunitat I* d'una mostra catalana, que va mostrar un haplotip inclòs en el mateix clade que la resta de mostres ibèriques, tal com la filogènia bayesiana va indicar. Aquesta filogènia també va revelar la divisió d'*H. lupina* en almenys dos llinatges ben definits amb una distància mínima del 3,3 %, un present a la península Ibèrica i l'altre a l'Àsia, que es van separar fa uns 3,0 ($\pm 1,3$) milions d'anys.

Key words: *Hyponephele*, Catalonia, phylogeny, bioinformatics, DNA barcoding.

Introducció

La bruna de secà (*Hyponephele lupina*) es distribueix pel nord d'Àfrica, l'Europa mediterrània i Turquia fins a l'Altai (García-Barros *et al.* 2013). A la península Ibèrica és representada per la subespècie *mauritanica* (Oberthür, 1881) i es troba principalment a la Submeseta Nord, sud del País Basc i de Navarra, sud dels Pirineus aragonesos, sistemes Central i Ibèric, est de Càceres i Montes de Toledo, indrets del sud de Portugal, sud-oest de Badajoz, Sierra Morena i serralades Subbètica i Penibètica (García-Barros *et al.* 2013). En general, habita altituds inferiors a les de la bruna de muntanya (*Hyponephele lycaon* (Kühn, 1774)) –espècie amb la qual es pot confondre fàcilment– i

l'altitud mitjana de les citacions ibèriques és de poc més de 700 m (García-Barros *et al.* 2013). Prefereix boscos oberts i llocs herbosos o rocosos (Tshikolovets 2011) moderadament xeròfils (García-Barros *et al.* 2013). Presenta una generació a l'any i els adults volen principalment durant l'estiu, encara que s'han trobat individus des del maig fins a l'octubre (García-Barros *et al.* 2013; Tolman & Lewington 2011).

A Catalunya és una espècie aparentment molt escassa: només cinc citacions (Pérez De-Gregorio 1999) han estat confirmades gràcies a cinc individus capturats, i la citació més nova fins ara és del 1999 (Taula 1; Fig. 1). Totes cinc corresponen a àrees més o menys muntanyoses i circumdants al pla de Lleida, a una altitud d'entre 570 i 950 m. A hores d'ara tampoc no s'ha trobat mai en cap recorregut del CBMS.

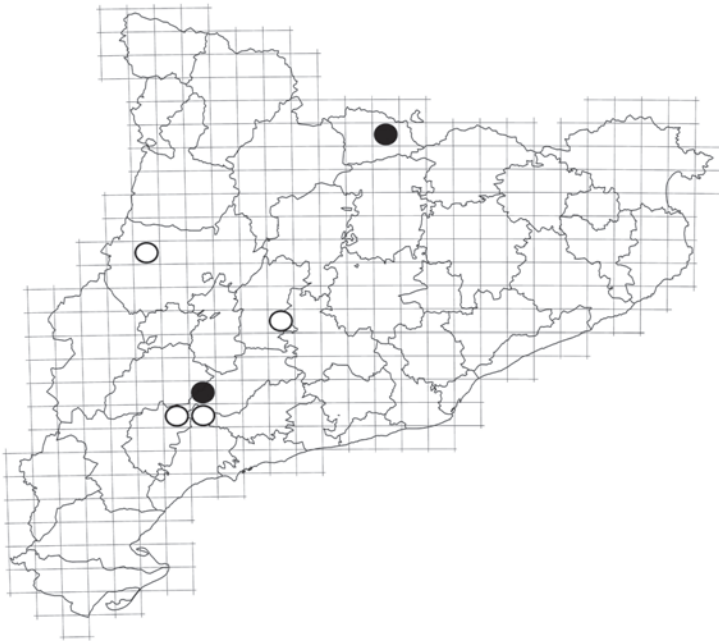


Fig. 1 Distribució de la bruna de seca (*H. lupina*) a Catalunya. Les citacions anteriors al segle XXI es representen amb cercles blancs sobre una quadrícula UTM 10 × 10. Les noves citacions s'indiquen amb cercles negres.

A causa de la manca de noves citacions fiables, la seva presència a Catalunya es podia posar en dubte. Tot i això, es donen esporàdicament possibles albiraments de l'espècie a través de fotografies, però confirmar-ne la identitat només amb fotografies, en la majoria de les quals apareixen en posició de repòs, és una tasca gairebé impossible a causa de la gran similitud que té amb *H. lycaon* i *Maniola jurtina* (Linnaeus, 1758).

Taula 1 Citacions confirmades d'*H. lupina* a Catalunya. Totes deriven d'individus recollectats.

Localitat	Altitud (m)	UTM (10 × 10 km)	Data de recollecció	Sexe	Collecció
—	—	—	29.VI.1926	Mascle	Sagarra
Sant Guim de Freixenet, Segarra	740	31TCG61	VII.1952	Femella	Domènech
Les Avellanes, Noguera	570	31TCG14	14.VI.1970	Femella	Domènech
Ulldemolins, Priorat	650	31TCF27	6.VIII.1971	Mascle	Domènech
Prades, Baix Camp	950	31TCF37	10.VIII.1999	Mascle	Pérez De-Gregorio
Fulleda, Garrigues (nova)	655	31TCF38	2.VII.2017	Femella	Roger Vila
Meranges, Cerdanya (nova)	1500	31TDG09	22.VII.2017	Mascle	Xavier Mérit

En aquest article s'afegeixen dues noves citacions de l'espècie a Catalunya, les dues úniques que es poden confirmar del segle actual, que amplien el coneixement que es tenia sobre la seva distribució. A més a més, s'ha seqüenciat el fragment del codi de barres genètic (DNA barcode) del gen citocrom c oxidasa subunitat I (COI) d'un dels individus amb l'objectiu d'establir amb quines altres poblacions estaria relacionada.

Material i mètodes

Mostres

Per a l'anàlisi genètica es va fer servir la mostra de Fulleda (Garrigues) d'*H. lupina* i dinou mostres de la mateixa espècie descarregades de Genbank, la totalitat de seqüències de l'espècie presents a la base de dades. A més a més, s'hi van afegir tres mostres d'*H. lycaon* i una de *M. jurtina* com a grup extern. Les dades sobre cada mostra utilitzada per a les anàlisis genètiques, incloent-hi els codis de Genbank, són a la taula 2.

Seqüenciació

L'ADN es va extreure mitjançant la resina Chelex 100, 100-200 mesh, en forma de sodi (BIO-RAD). Com a teixit es va utilitzar 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). La mostra es va incubar a 55 °C durant tota la nit. En acabat, es va escalfar a 100 °C durant 15 minuts.

Per a l'amplificació del COI es van fer servir els encebadors LepF1 i LepR1 (5'-ATCAACCAATCATAAAGATATTGG-3' i 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA-ATCA-3', respectivament) per obtenir el fragment de 658 pb que correspon a la regió de l'anomenat «codi de barres genètic». Les condicions utilitzades 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 se'n van afegir 30 més en què es va apujar la temperatura de l'alineament a 52 °C, i una elongació final a 62 °C durant 7 min. Els productes de la PCR es van enviar a Macrogen Inc. Europe (Amsterdam, Països Baixos), on es van purificar i es van seqüenciar amb el mètode Sanger.

Taula 2 Dades dels individus utilitzats per a l'anàlisi genètica.

Codi de Genbank	Espècie	Localitat	País
HQ004549	<i>Hyponephele lycaon</i>	Breaza, Prahova	Romania
KP870978	<i>Hyponephele lycaon</i>	Válor, Granada	Espanya
KT864702	<i>Hyponephele lycaon</i>	-	Israel
KP871143	<i>Hyponephele lupina</i>	Sotuélamos, Albacete	Espanya
KP870843	<i>Hyponephele lupina</i>	Sotuélamos, Albacete	Espanya
KP870656	<i>Hyponephele lupina</i>	Cumbres Verdes, Granada	Espanya
KP870552	<i>Hyponephele lupina</i>	Cumbres Verdes, Granada	Espanya
-	<i>Hyponephele lupina</i>	Fulleda, Garrigues	Catalunya
FJ663646	<i>Hyponephele lupina</i>	-	Uzbekistan
FJ663647	<i>Hyponephele lupina</i>	-	Kazakhstan
KT864688	<i>Hyponephele lupina</i>	-	Israel
KT864689	<i>Hyponephele lupina</i>	-	Israel
FJ663648	<i>Hyponephele lupina</i>	-	Kazakhstan
GU676180	<i>Hyponephele lupina</i>	San Martín de la Vega, Madrid	Espanya
JN278862	<i>Hyponephele lupina</i>	Olocau del Rei, Castelló de la P.	Espanya
JN278875	<i>Hyponephele lupina</i>	Vistabella del Maestrat, Castelló de la P.	Espanya
HM901411	<i>Hyponephele lupina</i>	Sierra de Alfacar, Granada	Espanya
HM901294	<i>Hyponephele lupina</i>	Escamilla, Guadalajara	Espanya
HM901309	<i>Hyponephele lupina</i>	Gualda, Guadalajara	Espanya
HM901310	<i>Hyponephele lupina</i>	Budia, Guadalajara	Espanya
JN278877	<i>Hyponephele lupina</i>	Escamilla, Guadalajara	Espanya
GU676166	<i>Hyponephele lupina</i>	Gualda, Guadalajara	Espanya
GU676948	<i>Hyponephele lupina</i>	Cortes de Pallars, València	Espanya
KM020882	<i>Maniola jurtina</i>	Illa de Pianosa, Liorna	Itàlia

Anàlisi filogenètica

Les seqüències es van alinear amb Geneious v6.1.8 (<https://www.geneious.com>), des d'on també es van calcular les distàncies genètiques. La filogènia es va construir amb BEAST v2.5.0 (Bouckaert *et al.* 2014). Un arbre generat aleatòriament es va fer servir com a arbre inicial. Es va seleccionar una freqüència de les bases empírica i el model GTR amb sis categories gamma. Per calibrar el rellotge molecular es va seleccionar un rellotge estricta amb una distribució normal de la taxa de substitució centrada en 1,9 % per milió d'anys i una desviació estàndard configurada perquè els extrems de l'interval de confiança al 95 % coincideixin amb les taxes de substitució de l'1,5 % i el 2,3 %, que s'aproximen a les taxes mínima i màxima més habituals per a artròpodes (Brower 1994; Quek *et al.* 2004). Els paràmetres s'han estimat usant dues corregudes independents de 20 milions de generacions cadascuna i la convergència s'ha revisat amb TRACER 1.6 (Rambaut *et al.* 2018).

Resultats

El 2 de juliol de 2017, un dels autors, Joan Carles Hinojosa, va capturar una ♀ a la localitat de Fullella (Garrigues), a la serra de Vilobí (655 m, coordenades: 41.442307, 1.045627). La captura es va fer en un marge de camí envoltat de camps abandonats i de bosc típicament mediterrani, on predominava el pi blanc, però també destacava la presència de roures i alzines. Es va identificar visualment en primera instància i posteriorment es va confirmar la pertinença a l'espècie mitjançant la seqüenciació del COI.

El 22 de juliol de 2017, Xavier Mérit va recollir un individu ♂ a les cotes baixes de Meranges (Cerdanya, 1.500 m, coordenades: 42.439416, 1.795235). Hi havia una població en un pendent rocallós just per sobre de la carretera i es van observar aproximadament cinc individus. L'individu capturat s'ha pogut identificar gràcies a la morfologia de la genitàlia i de les androcònies (Fig. 2). En aquest cas, l'hàbitat difereix del de la resta de citacions, ja que és un lloc comparativament més fred i humit, tot i tractar-se d'un pendent al solell.



Fig. 2 Fotografies de l'individu ♂ de Meranges (Cerdanya) capturat el 22.VII.2017. Esquerra: anvers. Dreta: genitèlia.

La mostra garriguenca comparteix haplotip amb un individu de Castelló de la Plana i un de Guadalajara. Així, doncs, s'agrupa amb la resta de mostres ibèriques i forma un grup monofilètic ben suportat amb una probabilitat posterior d'1 (Fig. 3). Les mostres asiàtiques també formen un grup monofilètic amb $PP = 1$. El grup ibèric té una divergència destacable respecte de l'asiàtic: un 3,3 % de distància mínima, la diferència entre l'haplotip garriguenc i la mostra FJ663648 del Kazakhstan. Aquests dos grups es van separar fa aproximadament 2,97 ($\pm 1,24$) milions d'anys.

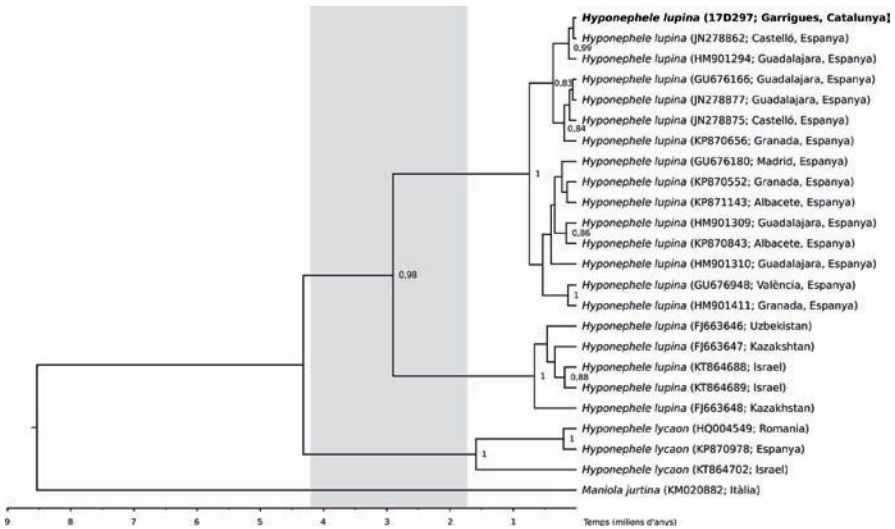


Fig. 3 Arbre filogenètic basat en el gen mitocondrial COI obtingut mitjançant inferència bayesiana amb les probabilitats posteriors ($> 0,7$) indicades als nodes. En gris està representat l'interval de confiança al 95% del temps de separació entre els dos llinatges d'*H. lupina* detectats.

Discussió

La troballa d'un individu al bell mig dels Pirineus catalans indica que l'àrea de distribució de l'espècie a Catalunya és molt més àmplia del que s'havia cregut—llocs més o menys elevats al voltant del pla d'Urgell— i podria incloure, com a mínim, un territori que aniria des de Prades fins als Pirineus, on probablement està restringida a l'entorn de les valls. Tanmateix, no seria estrany que es trobés més al sud, en zones muntanyoses de certa elevació, com la serra de Llaberia o el massís del Port. Les dues citacions descrites en aquest article també es recullen en la guia de Vila *et al.* (2018); en aquesta obra valoren l'estat de conservació segons els criteris de l'IUCN i la classifiquen com «en perill» (EN) al territori català a causa de la seva escassetat. Amb tot, s'encoratja el lector a fer una cerca activa de l'espècie per determinar-ne amb més exactitud la distribució i l'abundància.

Genèticament, el COI de l'exemplar català seqüenciat és idèntic al d'altres individus ibèrics: un de Castelló de la Plana i un altre de Guadalajara. L'individu forma part d'un llinatge molt ben definit —ja exposat a Dincă *et al.* (2015)— i que està separat de l'asiàtic des de fa milions d'anys. La distància entre els dos llinatges podria correspondre a la que trobem entre dues espècies diferents (Ashfaq *et al.* 2013; Huemer *et al.* 2014). Malauradament, el mostreig és insuficient per conèixer l'abast d'aquests llinatges i no

és descartable la presència d'altres llinatges intermedis o més divergents, cosa que impedeix extreure en aquest treball conclusions fiables sobre el seu estatus taxonòmic.

Conclusions

Les dades aportades en aquest article sobre *H. lupina* fan palès que: 1) l'espècie encara és present a Catalunya i, tot i ser rara, mantindria poblacions en àrees muntanyoses de Prades i a la Cerdanya; 2) l'individu català seqüenciat és genèticament idèntic en el COI a altres individus ibèrics i aquests conformen un llinatge que abasta, com a mínim, la península Ibèrica.

Agraïments

El suport financer per a aquest article s'ha obtingut del projecte CGL2016-76322-P (AEI/FEDER, UE) i del contracte predoctoral BES-2017-080641.

Referències bibliogràfiques

- Ashfaq, M., Akhtar, S., Khan, A.M., Adamowicz, S.J. & Hebert, P.D.N. 2013. DNA barcode analysis of butterfly species from Pakistan points towards regional endemism. *Mol. Ecol. Resour.*, 13: 832-843.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. & Drummond, A.J. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput. Biol.*, 10: e1003537.
- Brower, A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6491-6495.
- Dincă, V., Montagud, S., Talavera, G., Hernández-Roldán, J., Munguira, M. L., García-Barros, E., Hebert, P.D.N. & Vila, R. 2015. DNA barcode reference library for Iberian butterflies enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. *Sci. Rep.*, 5: 12395.
- García-Barros, E., López Munguira, M., Stefanescu, C. & Vives Moreno, A. 2013. *Lepidoptera Papiilionoidea*. In: *Fauna Ibérica* (Ramos, M. A. et al. Eds), 37: 1–1.213. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Huemer, P., Mutanen, M., Sefc, K.M. & Hebert, P.D.N. 2014. Testing DNA barcode performance in 1000 species of European Lepidoptera: Large geographic distances have small genetic impacts. *PLoS ONE*, 9: 1-21.
- Quek, S.P., Davies, S.J., Itino, T. & Pierce, N.E. 2004. Codiversification in an ant-plant mutualism: stem texture and the evolution of host use in *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicinae) inhabitants of *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution*, 58: 554-570.
- Pérez De-Gregorio, J.J. 1999. Noves localitats catalanes d'*Hyponephele lupina* (O. Costa, [1836]) (Lepidoptera: Nymphalidae, Satyrinae). *Butll. Soc. Cat. Lep.*, 84: 31-43.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M.A. 2018. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.*, syy032.
- Tolman, T. & Lewington, R. 2011. *Mariposas de España y Europa*. 304 pp. Lynx Edicions, Bellaterra (Catalunya).

- Tshikolovets, V.V. 2011. *Butterflies of Europe and Mediterranean area*. 344-345 pp. Pemberley Natural History Books, Iver (RU).
- Vila, R., Stefanescu, C. & Sesma, J.M. 2018. *Guia de les papallones diürnes de Catalunya*. 509 pp. Lynx edicions, Bellaterra (Catalunya).

Data de recepció: 14 de setembre de 2018
Data d'acceptació: 5 de novembre de 2018