

Genética de poblaciones del insecto protegido *Graellsia isabellae*
(Lepidoptera: Saturniidae)

Xenética de poboacións do insecto protexido *Graellsia isabellae*
(Lepidoptera: Saturniidae)

Population genetics of the protected insect *Graellsia isabellae*
(Lepidoptera: Saturniidae)



Trabajo de Fin de Grado presentado por

Jorge González López

Directoras

Dra. Marta Vila Taboada

Dra. Neus Marí Mena

Fecha de defensa: 29 de junio de 2015

Marta Vila Taboada y Neus Marí Mena autorizan la defensa del presente Trabajo de Fin de Grado realizado por Jorge González López ante el tribunal calificador que le corresponda.

A Coruña, 18 de junio de 2015.

Marta Vila Taboada

Neus Marí Mena

ÍNDICE

Resumen/Summary

Introducción	1
Especie objeto de estudio	1
Cómo abordar el estatus de una población (si es introducida o no)	3
Filogeografía de <i>Graellsia isabellae</i> : antecedentes	4
Objetivos	6
Material y métodos	7
Material de estudio y extracción de ADN	7
Análisis del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (<i>COI</i>)	8
Análisis de fragmentos: <i>loci</i> microsatélite	8
Resultados	10
ADN genómico	10
Análisis del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (<i>COI</i>)	11
Análisis de fragmentos: <i>loci</i> microsatélite	14
Discusión	21
Conclusiones/Conclusions	24
Agradecimientos	24
Bibliografía	25

RESUMEN/SUMMARY

Graellsia isabellae (Lepidoptera: Saturniidae) es un insecto de hábitos nocturnos que se encuentra en pinares de montaña de España (Pirineos occidentales y orientales, Sistema Central, Montañas Béticas y Sistema Ibérico), Francia (Alpes y vertiente francesa de los Pirineos) y Alpes suizos. Este Trabajo de Fin de Grado evalúa el origen introducido o autóctono de la población de *G. isabellae* localizada en Sousillon (Canton du Valais, Suiza) utilizando para ello información mitocondrial (gen *COI*) y nuclear (ocho *loci* microsátélites) y comparando su acervo genético con el de una población constatatadamente introducida (Schallberg, Suiza), la única localidad conocida en la vertiente norte de los Pirineos (Custoja, Francia) y datos de otras poblaciones tomados de la bibliografía. Se comprobó que la población de Custoja es de origen natural, compartiendo características mitocondriales y nucleares con las demás poblaciones de los Pirineos orientales. La presencia de un único haplotipo ibérico pero componente nuclear francesa en Sousillon se debe a su origen introducido a partir de ejemplares de Schallberg, procedentes en su mayoría de los Alpes franceses con una contribución ibérica minoritaria.

Graellsia isabellae (Lepidoptera: Saturniidae) is a nocturnal insect found in pinetree forests of Spain (western and eastern Pyrenees, Central Iberian System, Betic Mountains and Eastern Iberian System), France (Alps and northern slope at the Eastern Pyrenees) and Swiss Alps. The present work evaluates the origin (natural vs introduced) of the Swiss population of Sousillon (Canton du Valais). For this I have used mitochondrial (*COI* gene) and nuclear (eight microsatellite loci) information and compared Sousillon with a truly introduced population (Schallberg, Switzerland), the only known locality in the northern slope of the Pyrenees (Custoja, France) as well as other already published populations. The natural population of Custoja shared mitochondrial and nuclear features with the other populations from the eastern Pyrenees. The finding of a single Iberian haplotype in Sousillon, despite a nuclear affinity with the French Alps, is due to an introduction from Schallberg. In fact, our data confirm that Schallberg is the result of an introduction mainly from the French Alps, with a minor Iberian contribution.

INTRODUCCIÓN

Especie objeto de estudio

Según Mari-Mena (2013) y Romo *et al.* (2012), la isabelina *Graellsia isabellae* (Graells 1849) (Lepidoptera: Saturniidae) es una especie anual y univoltina que habita en pinares de montaña de la mitad oriental ibérica (Pirineos, Sistema Central, Sistema Ibérico, Montañas Béticas) y Alpes franco/suizos. De hábitos nocturnos, los adultos vuelan entre marzo y julio, según la altitud y climatología de cada año y región.

La envergadura alar del adulto es de 8-9 cm. El cuerpo es grueso, de color marrón. Las alas presentan una coloración verde, surcadas por venas marrones a ocre rojizo y un característico ocelo en cada una. Las alas posteriores se alargan formando una cola en los machos. Los machos, además, presentan antenas plumosas; simples y finas en las hembras. Las larvas presentan tonos verdosos con manchas blancas y marrones y largos apéndices pilosos.

En la época reproductora la hembra atrae al macho mediante la secreción de feromonas sexuales que éste detecta mediante sus antenas plumosas. Tras la cópula, la hembra deposita la puesta, de media entre 100 y 150 huevos, sobre las ramas y acículas de los pinos y tras 18-30 días eclosionan las orugas. Los cinco estadios larvarios, sedentarios y no gregarios, se alimentan de las acículas y se pueden encontrar desde mediados de mayo hasta finales de julio, cuando bajan al suelo y tejen un capullo con las acículas donde se transforman en crisálida. El estado de pupa durará hasta la primavera siguiente, cuando se metamorfoseará en adulto. Los imagos no suelen superar los 8 días de vida y durante esta etapa no se alimentan.

La especie vive en los pisos montano y montano-submediterráneo entre los 100 y los 1.700 metros de altitud, en bosques de *Pinus sylvestris* y *P. nigra*, habiéndose localizado una población que vuela en un bosque mixto de *P. halepensis* y *P. pinaster* en Sierra María (Almería) (Figura 1).

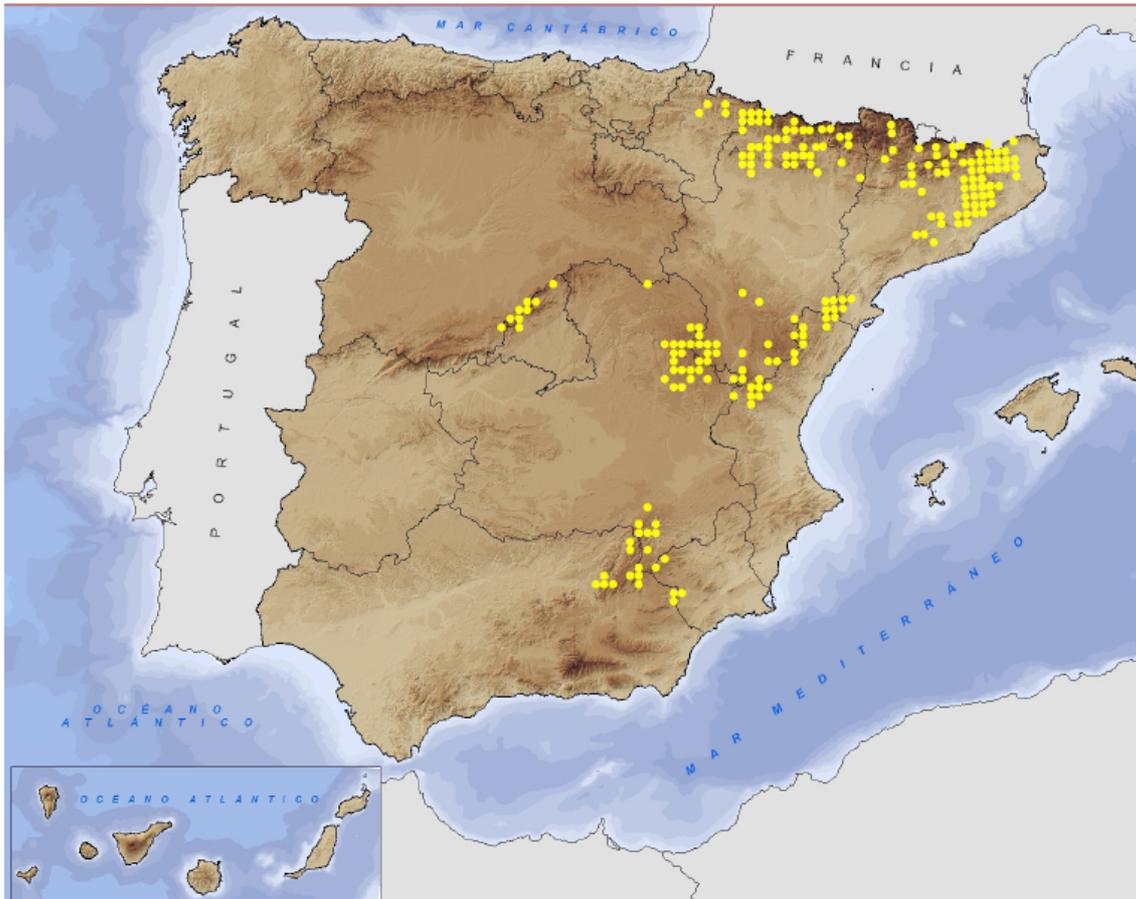


Figura 1. Área de distribución ibérica de *Graellsia isabellae*. Tomada de Romo *et al.* (2012).

Graellsia isabellae está recogida en Catálogo Español de Especies Amenazadas como especie “de interés especial”, al estar incluida en el Convenio de Berna II, en CITES y en la directiva 92/43/CEE (Directiva Hábitats de la Unión Europea). Aparece bajo el epígrafe “datos insuficientes” en la Lista Roja de la IUCN. Romo *et al.* (2012) indican que “actualmente, la especie no se encuentra en peligro, si bien se trata de una especie vulnerable”, para añadir a continuación “se desconoce el estado de conservación del área de distribución para las regiones biogeográficas de la especie (...) la escasez de datos existente y la grave carencia de estudios poblaciones (...) no permiten establecer (...) una información adecuada y fiable sobre su estado de conservación”. Dicha falta de información hace paradójica la distinta clasificación de esta especie en los catálogos de fauna amenazada de las diversas comunidades autónomas: mientras que en Cataluña o Valencia se encuentra como no catalogada, en Aragón y Madrid es una especie de “interés especial” y en Andalucía de “preocupación menor”. La principal amenaza para este insecto es la acción humana, que provoca pérdida de hábitats a través de la deforestación o los incendios. También se ve afectada por la captura ilegal para coleccionismo y el uso de productos fitosanitarios en los bosques.

En Francia, *G. isabellae* aparece en bosques de *Pinus sylvestris* del Sureste del país, concretamente en dos departamentos alpinos (Alpes-de-Haute-Provence y Hautes-Alpes) y uno pirenaico (Pyrénées-Orientales). La categoría de conservación aplicada en el país galo es “Vulnerable” (Morichon *et al.*, 2014).

En el Canton du Valais (Suiza) se halla una población introducida de *Graellsia isabellae* (Pro Natura, 2005): Schallberg. Sin embargo, la administración suiza desconoce si los individuos presentes en el bosque de Soussillon (aproximadamente a 44 km) son de origen antrópico o autóctono. Contar con poblaciones naturales de una especie incluida en la directiva Hábitats es sumamente relevante para la administración suiza y constituye la motivación del presente Trabajo de Fin de Grado.

Cómo abordar el estatus de una población (si es introducida o no)

Tal como recogen Beebe y Rowe (2004), durante años los humanos han introducido especies en zonas en las que no eran autóctonas (de manera accidental o no). Este es el caso por ejemplo del jabalí (*Sus scrofa*), el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) o la cabra (*Capra aegagrus*), especies que el ser humano introdujo en las islas del Pacífico por su interés para dar alimento en las expediciones marítimas. Sin embargo, en estas mismas expediciones, también se introdujeron en las islas, de manera accidental, ratas (*Rattus rattus*) y ratones domésticos (*Mus musculus*). Muchas de estas introducciones han tenido un gran impacto en las poblaciones nativas, hasta el punto de causar extinciones. Este es el caso, por ejemplo, de la introducción del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en Australia, que en pocos años se convirtió en una plaga, desplazando a especies autóctonas, especialmente de marsupiales (Fenner, 2010).

En ciertos casos, el estatus de “introducida” está claro porque se tiene constancia de las actividades humanas o porque hay información acerca de la propia introducción; sin embargo, en otros casos, el estatus de la población se desconoce. Una primera aproximación para abordar el origen de las poblaciones es comprobar su presencia en el registro fósil de la zona. Sin embargo, su ausencia no siempre es informativa, por ejemplo en animales de cuerpo blando o cuando el lugar estudiado está cerca del rango de distribución natural de la especie. El desarrollo de diversas herramientas moleculares y su aplicación en el campo de la filogeografía posibilitan en la actualidad una mayor resolución a este tipo de pregunta.

La filogeografía busca determinar las causas por las que las distintas variantes genéticas presentes en las poblaciones/especies no se distribuyen aleatoriamente en el espacio. Es, por tanto, una valiosa herramienta que permite decidir entre especie nativa o introducida, una distinción vital para abordar políticas de conservación. Sin embargo la filogeografía es inferencial y en muchas ocasiones puede estar abierta a diferentes interpretaciones, por lo que debe estar acompañada de análisis estadísticos que la respalden. Se considera que la filogeografía es multidisciplinar ya que, además de la información molecular, es necesario tener el máximo conocimiento posible sobre la historia vital (*life-history*) de la especie. Comparar las variables moleculares y ecológicas en la zona de estudio y el resto del área de distribución deberá proporcionar indicios sobre la condición de introducida o autóctona.

Desde el punto de vista molecular, se espera que una población introducida presente menor diversidad genética (debida al efecto fundador) y que, además, comparta alelos con la población fuente. Por este motivo, en un estudio de este tipo se necesita tener un conocimiento previo de la diversidad y estructura genética de la especie.

Son diversas las herramientas moleculares que se pueden utilizar: alozimas, polimorfismos en la longitud del fragmento analizado (AFLPs) o polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Sin embargo, las más usadas son el ADN mitocondrial (ADNmt) y los marcadores nucleares de tipo microsatélite, idealmente, la combinación de ambos tipos.

El ADNmt constituye un genoma haploide, se transmite en la mayor parte de los metazoos a través de la línea materna y no suele mostrar recombinación. De esta forma, todo el genoma se comporta como un único *locus* cuyas distintas variantes se denominan haplotipos. El hecho de que el ADNmt constituya $\frac{1}{4}$ de la contribución genética del genoma nuclear (en organismos diploides) a la siguiente generación hace que sea más susceptible a los efectos de la deriva (pérdida de diversidad genética intrapoblacional y aumento de la diferenciación interpoblacional). Por otro lado, las presiones selectivas en sus distintas regiones suelen ser menores que en el genoma nuclear y ello, unido a una menor eficiencia de la maquinaria de reparación del ADN, provoca una mayor tasa de sustitución que en el genoma nuclear (Beebe y Rowe, 2004).

Los microsatélites son regiones formadas por 5-40 repeticiones en tándem de 2-6 nucleótidos que se encuentran a alta frecuencia a lo largo del genoma nuclear de la mayoría de las especies (Selkoe y Toonen, 2006). Los microsatélites, en principio regiones que evolucionan bajo un modelo neutral, presentan una tasa de mutación muy superior a la del ADN de copia única (Ellegren, 2000), pero a su vez, sus regiones flanqueantes suelen ser muy conservadas, por lo que es fácil amplificarlos con cebadores específicos de especie.

Filogeografía de *Graellsia isabellae*: antecedentes

Marí-Mena (2013) determinó la diversidad y estructura genéticas de este insecto en 23 localidades españolas y cinco de los Alpes franceses. La combinación de secuencias mitocondriales y microsatélites nucleares reveló seis grupos genéticos correspondientes con seis sistemas montañosos: Montañas Béticas (SI), Sistema Central (CI), Sistema Ibérico (EI), Pirineos Occidentales (WP) y Orientales (EP) y Alpes Franceses (FA). El mayor grado de diversidad mitocondrial y nuclear se encuentra en las localidades del Sistema Ibérico. Por el contrario, son las poblaciones del Sistema Central y los Alpes Franceses las que presentan menor diversidad genética. Se apunta un origen natural para estas últimas.

Determinar el estatus de la localidad suiza de Soussillon cuenta pues con un buen punto de partida. Con todo, sería deseable (1) analizar alguna muestra que se sepa introducida con el fin de comparar patrones genéticos entre poblaciones de distinto origen y (2) ampliar el muestreo a otras localidades próximas, particularmente de la vertiente francesa de los Pirineos, para aumentar la fiabilidad de los análisis. Afortunadamente, se han podido cumplir ambas condiciones, ya que en el presente Trabajo de Fin de Grado se analizan una población introducida en Suiza (Schallberg), así como la primera localidad descubierta en los Pirineos franceses (Custoja) (Morichon *et al.* 2014).

Es una comunicación personal por parte del entomólogo amateur Uwe Kauz la que aporta la única información disponible sobre el proceso de introducción de *Graellsia* en Schallberg:

En el año 1980 comienza la cría en cautividad de individuos de *Graellsia isabellae galliaegloria* (subespecie distribuida en los Alpes Franceses), concretamente procedentes de Guillestre. Las hembras resultantes se llevaban a aparear con machos silvestres de Guillestre y se liberaban posteriormente en Schallberg. Este proceso continuó hasta 1989. De hecho, este entomólogo especifica haber liberado en Schallberg 400 individuos entre 1987 y 1988. En 1994 se captura un primer macho silvestre de *Graellsia* en Schallberg, atraído por trampa de luz. Sin embargo, en 1995 diversos entomólogos intentan constatar, sin éxito, la presencia de *Graellsia* en Schallberg.

En 1996 se traen dos hembras en estado de pupa procedentes de España y, tras su eclosión, se observa que atraen a varios machos silvestres de Schallberg. Se les permite aparear y se reanuda la cría en cautividad. En 1997 se confirma que las hembras procedentes de la cría en cautividad atraen a machos silvestres, sin embargo no se liberan nuevos adultos al medio. Este proceso se repite en el periodo 1998-2000. En el año 2001 se liberan en otras localidades del Canton du Valais varios machos y hembras procedentes de la cría en cautividad realizada con individuos de Schallberg. Estas sueltas continúan hasta el año 2008, cuando -por primera vez- varios machos silvestres de Soussillon y Cordona se ven atraídos por la trampa lumínica.

OBJETIVOS

1. Calcular el grado de polimorfismo mitocondrial y nuclear de tres poblaciones del lepidóptero protegido *Graellsia isabellae* procedentes de Pirineos franceses y Alpes suizos.
2. Establecer el grado de estructura poblacional entre dichas localidades y el resto del área de distribución de la especie.
3. Determinar si la población suiza de Soussillon es natural o introducida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Jorge González López obtuvo los datos moleculares de los 43 individuos procedentes de Custoja y Soussillon, i.e. extracción de ADN genómico, obtención de secuencia mitocondrial (n = 22 y 11, respectivamente), genotipos multilocus microsatélite (n = 32 y 11, respectivamente), análisis bioinformático de los mismos. Asimismo, con el fin de abordar los objetivos del presente Trabajo de Fin de Grado, utilizó los datos mitocondriales y nucleares obtenidos por Marí-Mena 2013 (493 secuencias mitocondriales y 786 genotipos nucleares) y los aún no publicados procedentes de la localidad suiza de Schallberg (20 secuencias mitocondriales y 32 genotipos nucleares).

Material de estudio y extracción de ADN

Las muestras analizadas consistieron en tejido de una pata de machos adultos de *Graellsia isabellae* muestreados mediante una técnica invasiva, pero no letal, tras ser atraídos con feromona femenina sintética (Millar *et al.* 2010).

Las muestras fueron recogidas en la localidad francesa de Custoja (32 individuos) y en la localidad suiza de Soussillon (11 individuos). Además, se incluyeron en este estudio muestras de la localidad suiza de Schallberg (32 individuos).

Las muestras fueron enviadas por correo en sobres de celulosa independientes y sin refrigeración.

Las muestras de Soussillon fueron recogidas por el Dr. Nadir Álvarez (Université de Lausanne) el 28 de mayo de 2014 en Soussillon (46° 15' 40.95"N, 7° 34' 08.95"E, 1185 m).

Las muestras de Custoja fueron colectadas por el Dr. Carlos López Vaamonde (Institut National de la Recherche Agronomique, Orléans, Francia) el 4 de mayo de 2011 en Custoja (42° 21' 43.4" N, 2° 38' 41.2" E, 832 m)

Las muestras de Schallberg fueron tomadas por la Dra. Marta Vila Taboada (Universidade da Coruña) el 27 y 28 de mayo de 2009 en Schallberg, Canton du Valais (46° 29' 35.6"N, 8° 02' 34.9"E, 1364 m).

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

La cuantificación del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro NANODROP ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

Finalmente, se prepararon alícuotas del ADN extraído a una concentración estándar de 10 ng/μL, empleando para ello agua destilada estéril.

Análisis del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI)

Se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la segunda mitad del gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa I (COI, 832 bp) en 22 individuos de Custoja y los 11 individuos de Sousillon.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µL que contenía 1X PCR Buffer (5 PRIME), 1,5 mM MgCl₂, 1U TaqDNA Polymerasa (5 PRIME), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* C1-J-1751(5'-CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG-3') y C2-N-3661 (5'-CCA CAA ATT TCT GAA CAT TGA CCA-3') (Simon *et al.*, 1994) y 5 ng de DNA. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 90 seg a 57°C y 90 seg a 68°C, seguidos de una extensión final de 7 min a 68°C.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis (90 V durante 50 minutos) en gel de agarosa (2% en 1xTAE [Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM]) teñido con RedSafe™ 20.000X (1,5 µL de tinción por cada 30 mL de gel). Se incluyó un marcador comercial GeneRuler™ 50 bp DNA ladder 0,1 µg/µL (Fermentas Life Sciences) con el fin de estimar si el tamaño de los fragmentos amplificados era el correcto. Los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta.

Los productos de PCR con resultado positivo se enviaron a los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña para su procesamiento posterior: purificación mediante ExoSAP-IT® (Affymetrix) y secuenciación bidireccional utilizando los *primers* ISAF (5'-GGT GAC CCA ATT CTT TAC CAA C-3', Marí-Mena, 2013) y LepLeur (5'-CCA TTA CWT ATA RTC TGC CAT ATT-3', Vila y Björklund, 2004). Esta última fase incluye reacción de *cycle sequencing* y secuenciación en el analizador ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems).

La inspección de los electroferogramas y los alineamientos fueron realizados con el programa CODONCODES 3.7.1.1 (CodonCode, USA, www.codoncode.com). Tras finalizar la inspección, los extremos de las secuencias se cortaron para dejar el tamaño final de éstas en 832 pb, con el fin de poder trabajar con las secuencias de Marí-Mena (2013), de este tamaño.

Las secuencias de Sousillon y Custoja obtenidas en el presente Trabajo de Fin de Grado, junto con las disponibles para la localidad suiza de Schallberg se añadieron a las 493 ya obtenidas por Marí-Mena (2013) con el fin de construir sus relaciones genealógicas. Para ello se construyó una red de haplotipos utilizando el algoritmo de *95% Statistical Parsimony* implementado en el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000).

Análisis de fragmentos: *loci* microsatélite

Se genotiparon los 43 individuos procedentes de Custoja y Sousillon para nueve de los diez *loci* caracterizados por Vila *et al.* (2010), siguiendo su protocolo de reacciones *multiplex*. Se excluyó el *locus* GRAISA03 debido a la compleja lectura de sus alelos en determinadas poblaciones (Marí-Mena, 2013).

Las PCR *mutiplex* se realizaron utilizando el kit comercial Type-it® Microsatellite PCR kit (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El programa de termociclador fue el mismo que para las PCR del gen COI.

Los productos de PCR se enviaron a los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña, donde se mezclaron (1,5 µL) con 16 µL de formamida que contiene un estándar de tamaño GENESCAN-500 (ROX) (Applied Biosystems, ABI). El tamaño de los alelos fue determinado por un analizador ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems), salvo en el caso de Sousillon, en el que se utilizó un 3730 (Applied Biosystems).

La inspección de los electroferogramas y asignación de alelos (*allele calling*) fueron realizadas con el programa GENEIOUS 8.1 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012).

La hoja de cálculo donde se registraron los alelos obtenidos se transformó en los formatos de fichero necesarios para otros programas utilizando el programa CONVERT 1.31 (Glaubitz, 2004).

Tanto las frecuencias alélicas, como los descriptores de diversidad genética (heterocigosidad observada (H_o), esperada (H_e) en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), riqueza alélica y coeficiente de endogamia (F_{is})) y las pruebas de ajuste a Hardy-Weinberg (*exact test*) se calcularon utilizando el software GENEPOP-ON-THE-WEB (Rousset, 2008) con los valores por defecto indicados en cada opción. En los tests estadísticos múltiples los p-valores se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni.

Para obtener la estructura poblacional se utilizó el método bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Los datos generados en el presente Trabajo de Fin de Grado se adicionaron a los genotipos de Schallberg y a los recogidos por Marí-Mena (2013), indicando al programa que calculase la agrupación de individuos más probable para 2-10 grupos (K). Se calcularon 10 réplicas independientes por cada valor de K , utilizándose un modelo *admixture model*, con frecuencias alélicas correlacionadas. Para las cadenas de Markov Monte Carlo se estableció un *burn-in* de 50.000, seguido de 1.000.000 de iteraciones.

Los resultados se procesaron con el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt, 2012). Para determinar el valor de K más probable se utilizó el logaritmo de la probabilidad de los datos (Pritchard *et al.*, 2000) y el estadístico ΔK (Evanno *et al.*, 2005).

Para obtener la matriz promedio de los coeficientes de pertenencia individual de las 10 réplicas para el valor estimado de K se utilizó el programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007). Posteriormente dichas matrices se procesaron con el programa DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004), con el que se obtuvo un gráfico de barras en el que se representa cada individuo con los coeficientes estimados de pertenencia a cada uno de los K grupos.

La representación gráfica de las frecuencias alélicas se realizó utilizando una hoja de cálculo, comparando las tres localidades analizadas para el presente Trabajo de Fin de Grado con la localidad más diversa de cada uno de los K grupos obtenidos en el análisis anterior (datos de Marí-Mena, 2013).

RESULTADOS

ADN genómico

Las extracciones realizadas rindieron concentraciones y calidades de ADN óptimas (Tabla 1), considerándose como calidades apropiadas aquellas que presentan una ratio de absorbancia 260/280 de en torno a 1,8 y de 1,8 a 2,2 para la ratio 260/320.

Código	Identificación	Concentración ADN (ng/μl)	260/280	260/320
SOU1	Sousillon 1	20,51	1,95	1,02
SOU2	Sousillon 2	56,58	1,76	1,13
SOU3	Sousillon 3	36,98	1,83	1,27
SOU4	Sousillon 4	27,13	1,8	0,89
SOU5	Sousillon 5	24,61	1,84	0,75
SOU6	Sousillon 6	17,32	1,91	0,96
SOU7	Sousillon 7	38,16	1,57	0,99
SOU8	Sousillon 8	22,31	1,96	1,36
SOU9	Sousillon 9	31,39	1,69	1,12
SOU10	Sousillon 10	61,1	1,68	1,06
SOU11	Sousillon 11	17,17	2,33	3,38
CUS1	Custoja 1	104,42	1,99	1,81
CUS2	Custoja 2	261,96	1,79	1,22
CUS3	Custoja 3	55,32	1,95	1,74
CUS4	Custoja 4	64,23	1,77	1,24
CUS5	Custoja 5	35,3	1,89	1,36
CUS6	Custoja 6	61,03	2,03	2,23
CUS7	Custoja 7	45,05	2,02	1,96
CUS8	Custoja 8	36,93	1,93	1,6
CUS9	Custoja 9	97,3	1,66	1
CUS10	Custoja 10	71,86	2,07	2,07
CUS11	Custoja 11	86,41	2,07	2,22
CUS12	Custoja 12	127,35	1,75	1
CUS13	Custoja 13	53,57	1,93	1,84
CUS14	Custoja 14	73,65	1,87	1,43
CUS15	Custoja 15	60,16	1,9	1,49
CUS16	Custoja 16	49,49	2	1,95
Cus17	Custoja 17	86,67	1,72	1,01
Cus18	Custoja 18	81,36	1,77	1,21
CUS19	Custoja 19	122,61	1,74	1,1
CUS20	Custoja 20	75,41	1,81	1,18
CUS21	Custoja 21	45,32	1,91	1,87
CUS22	Custoja 22	68,88	1,85	1,45
CUS23	Custoja 23	73,37	2,08	2,23
CUS24	Custoja 24	93,84	1,75	1,28
CUS25	Custoja 25	104,65	1,66	0,92
CUS26	Custoja 26	64,21	1,77	1,34
CUS27	Custoja 27	104,91	1,67	0,93
CUS28	Custoja 28	55,5	1,96	2,01
CUS29	Custoja 29	93,13	2,02	2,12
CUS30	Custoja 30	50,53	1,94	1,99
CUS31	Custoja 31	48,66	1,87	1,8
CUS32	Custoja 32	134,08	1,99	1,75

Tabla 1. Concentraciones de ADN y ratios de absorbancia de las muestras extraídas.

Análisis del gen mitocondrial Citocromo oxidasa I (COI)

Tras realizar los análisis de secuencias, se encontraron dos individuos heteroplásmicos en las localidades de Schallberg y Custoja (especímenes SCH1 y CUS1). Se repitió el protocolo de laboratorio, i.e. PCR y secuenciación y los resultados fueron los mismos (Figura 2). La imposibilidad de discernir entre uno u otro haplotipo obligó a descartar estos individuos en análisis posteriores.

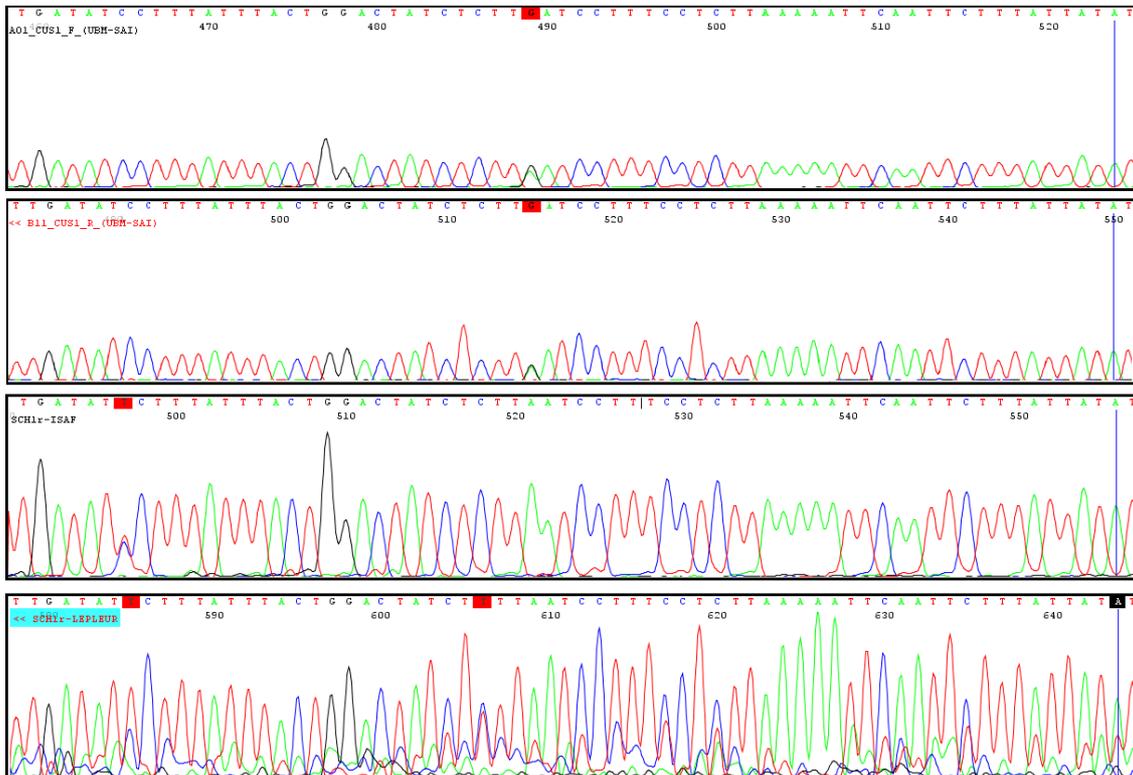


Figura 2. Posiciones heteroplásmicas en los individuos CUS1 (primero y segundo electroferogramas) y SCH1 (tercer y cuarto electroferogramas).

Los tres haplotipos resultantes de las secuencias obtenidas en el presente Trabajo de Fin de Grado ya habían sido detectados por Marí-Mena (2013):

Los 21 individuos no heteroplásmicos de Custoja presentaron un mismo haplotipo (EP.1), ya secuenciado en las localidades del clúster EP (L5-L9) además de en una del EI (L4). Los 11 especímenes secuenciados en Sousillon compartieron el mismo haplotipo (EI.17), ya secuenciado en las otras localidades del Sistema Ibérico (EI: L1-L3). De los 19 machos no heteroplásmicos procedentes de Schallberg se obtuvieron dos haplotipos. Dieciocho de ellos compartieron haplotipo con los Alpes Franceses (FA.1, localidades L16-L20), presentando el macho SCH32 el haplotipo EI.17 también presente en Soussillon (Figuras 3 y 4).

Estos tres haplotipos vienen definidos por tres transiciones (Tabla 2) en tercera posición de codón, por lo tanto se trata de sustituciones de tipo sinónimo (351: GGA = Gly; 474: GGG = Gly; 555: TTT = Phe). Las posiciones heteroplásmicas corresponden ambas a primeras posiciones de codón (490: CCN = Pro; 514: AAY = Asn), suponiendo en ambos casos cambio aminoacídico.

POSICIÓN \ HAPLOTIPO	351	474	490	514	555
EP.1	A	G	C	A	C
EI.17	G	G	C	A	T
FA.1	G	A	C	A	C
Cus1	A	G	C	R	C
Sch1	G	A	Y	A	C

Tabla 2. Nucleótidos presentes en las posiciones variables del alineamiento en los tres haplotipos y los dos individuos heteroplásmicos.

Se descarta que la heteroplasmia se deba a una contaminación de las muestras de ADN debido a que la posición 514 no es variable en el resto de haplotipos analizados y la posición 490 solo presenta T en el haplotipo SI.7 De haberse contaminado con ADN de dicha muestra, se esperaría coincidencias en las posiciones 351, 474 y 555. No es este el caso ya que para dichas posiciones SI.7 presenta A, A, C, respectivamente.

Al no haberse hallado ningún haplotipo nuevo, la red de haplotipos calculada por máxima parsimonia sólo difiere de la calculada por Marí-Mena (2013) en el tamaño (frecuencia absoluta) y proporción de los sectores (frecuencia relativa según localidad) de los círculos correspondientes a las variantes EI.17, EP.1 y FA.1 (Figura 3). En dicha red se separan dos grupos de haplotipos: el formado por los clústers *Southern Iberia* (SI) y *Central Iberia* (CI), y el formado por *Western and Eastern Pyrenees* (WP, EP, respectivamente) y *French Alps* (FA). Entre ellos existe una diferenciación debida a tres pasos mutacionales. Cabe destacar la característica forma de estrella (i.e. haplotipo mayoritario central del que surgen una serie de variantes minoritarias con una única sustitución nucleotídica de diferencia) de las muestras andaluzas (SI) y de los Pirineos occidentales (WP). Dicha forma de estrella suele indicar expansiones poblacionales. Asimismo, es de señalar la ausencia de variabilidad en el Sistema Central (CI) y Alpes Franceses (FA) y el elevado grado de reticulación (i.e. presencia de bucles) entre los clústers EI, EP, WP y FA.

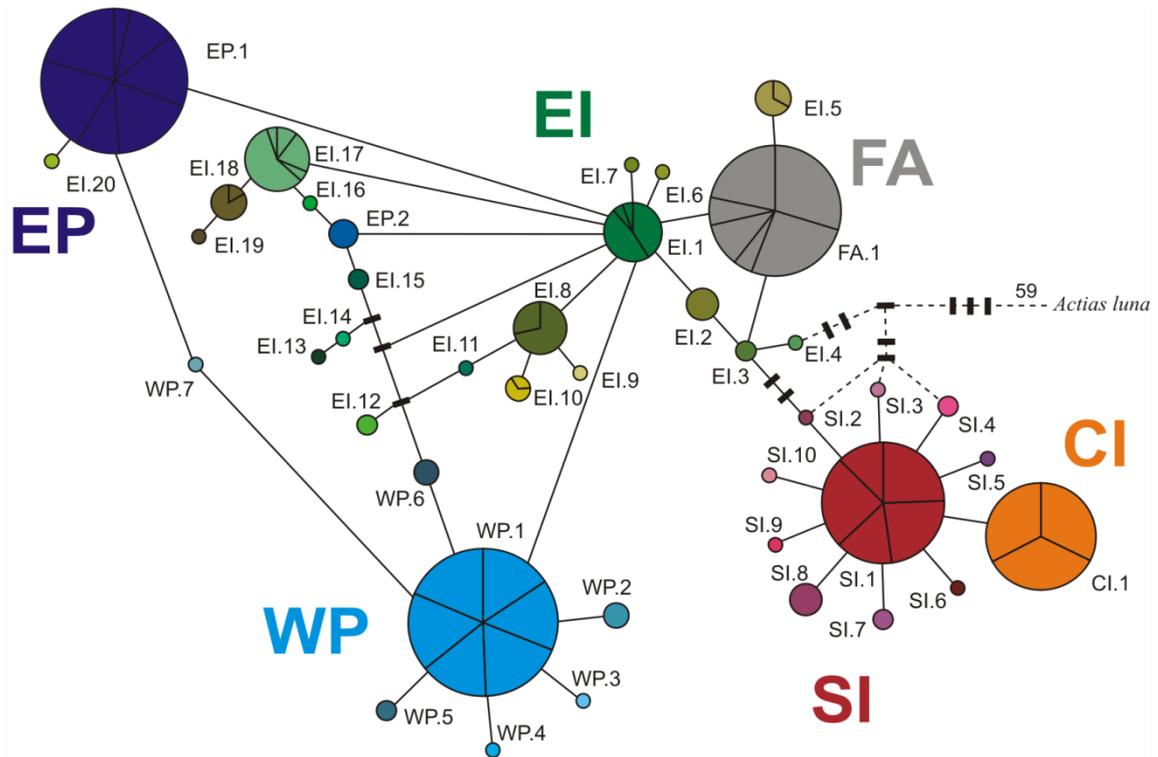


Figura 3. Red de parsimonia estadística calculada para los haplotipos del gen *COI* obtenidos. Los haplotipos se representan con colores (véase Resultados) y los sectores de los gráficos son proporcionales al número de individuos en cada localidad.

Por tanto, el presente Trabajo de Fin de Grado amplía el mapa de distribución de haplotipos con tres nuevas localidades (*L29-L31*) (Figura 4).

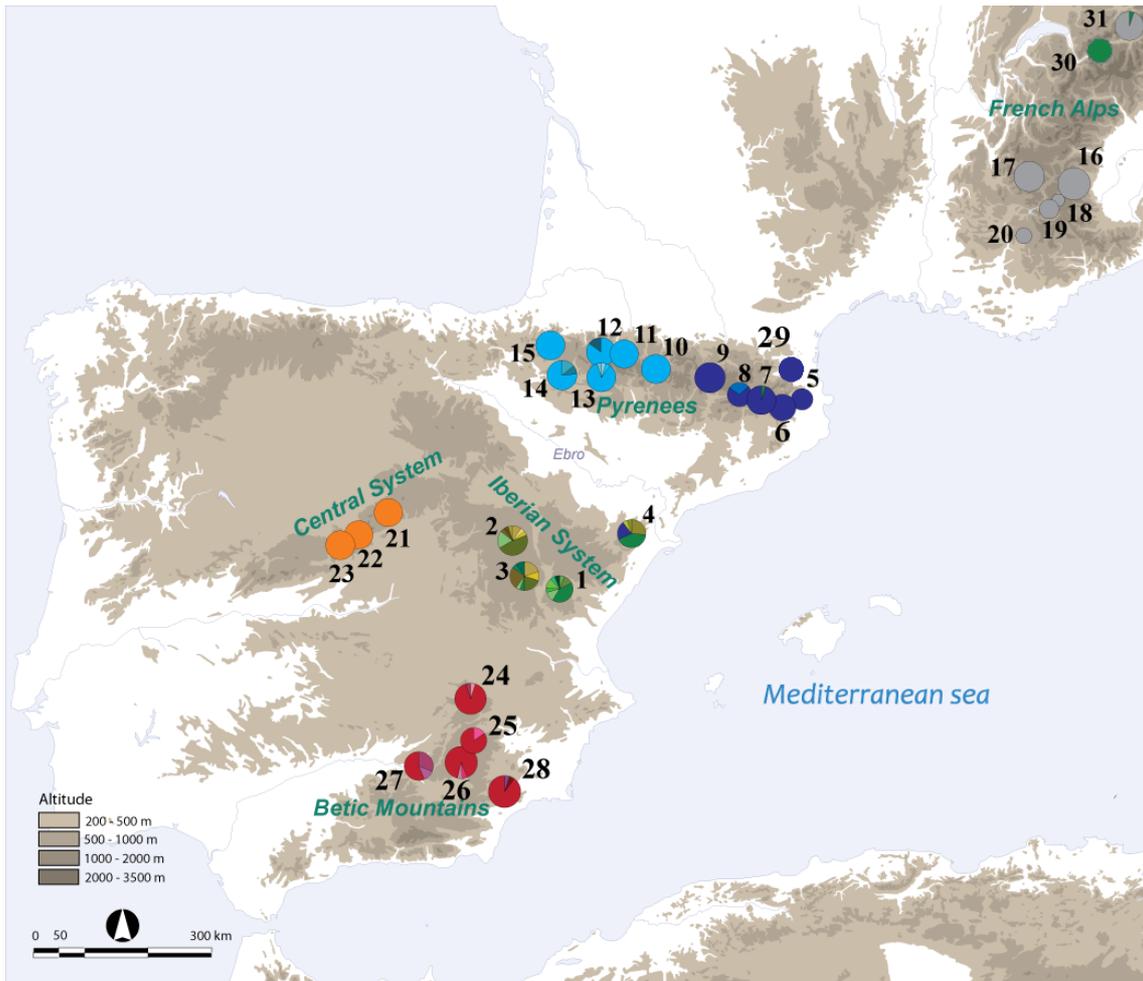


Figura 4. Distribución de los 41 haplotipos del gen *COI* en las 31 localidades de estudio. Los haplotipos se representan con colores (Figura 3) y los sectores de los gráficos son proporcionales a las frecuencias haplotípicas. Los códigos de localidad *L1* a *L28* se definen en Marí-Mena (2013). *L29*: Custoja; *L30*: Sousillon y *L31*: Schallberg.

Análisis de fragmentos: *loci* microsatélite

Mediante las tres PCRs multiplex que amplifican conjuntamente nueve *loci* microsatélite se genotiparon un total de 43 individuos de las localidades de Custoja y Sousillon (32 y 11, respectivamente) a los que se sumaron los 32 genotipos multilocus de Schallberg ya disponibles.

La localidad de Custoja presentó una gran cantidad de *missing data*. El *locus* G123 no amplificó en 11 individuos (34%). Asimismo, el *locus* G18 también falló en 11 individuos. Nótese que el espécimen CUS30 fue el único en el que no se obtuvo producto para ninguno de estos marcadores. De hecho, este individuo también carece del genotipo para el *locus* G17. Por este motivo se repitieron las PCRs multiplex disminuyendo la temperatura de anillamiento 2°C, obteniéndose así el genotipo de esos individuos.

La localidad de Sousillon presentó un problema adicional. La lectura de sus productos de PCR fue realizada en un analizador 3730 (Applied Biosystems), mientras que el resto de los datos fueron obtenidos en un 3130xl (Applied Biosystems). Pese a repetir en este último los genotipos de tres individuos de Sousillon, ha sido imposible adaptar el marcador de tamaño de utilizado para revelar el *locus* GI18. En estas condiciones, la imposibilidad de discernir correctamente sus alelos obligó a descartarlo en los análisis finales. Por lo tanto, los resultados que se muestran a continuación corresponden a 75 individuos, de tres localidades y para 8 *loci*.

La Tabla 3 muestra las estimas de diversidad genética de las localidades analizadas. La única población que se aparta del equilibrio Hardy-Weinberg es Custoja; la causa más probable parece ser un exceso de homocigotos, tal y como indica su valor de F_{is} positivo (Tabla 3). De las 13 comparaciones *locus*-localidad, únicamente se apartan del equilibrio los *loci* GI23 y GI11 en la localidad de Custoja.

	N	AR	H_e	H_o	F_{is}
Sou	11	2,00	0,144	0,136	0,051
Cus	32	2,9	0,409*	0,301	0,262
Sch	32	1,46	0,078	0,078	-0,003

Tabla 3. Diversidad genética y coeficiente de endogamia de las localidades en ocho marcadores microsatélite. *N*: número de individuos; *AR*: riqueza alélica promedio de los ocho *loci* basada en un tamaño de muestra de 11 individuos; *H_e*: heterocigosidad esperada; *H_o*: heterocigosidad observada; *F_{is}*: coeficiente de endogamia. El asterisco (*) indica que el valor es altamente significativo.

El análisis bayesiano reveló la existencia de estructura genética. Al utilizar los genotipos de los 9 *loci* iniciales (con una proporción considerable de *missing data*), ambos estadísticos utilizados (logaritmo de la probabilidad de los datos y delta *K*) mostraron una estructura más probable de 7 grupos (Figura 5).

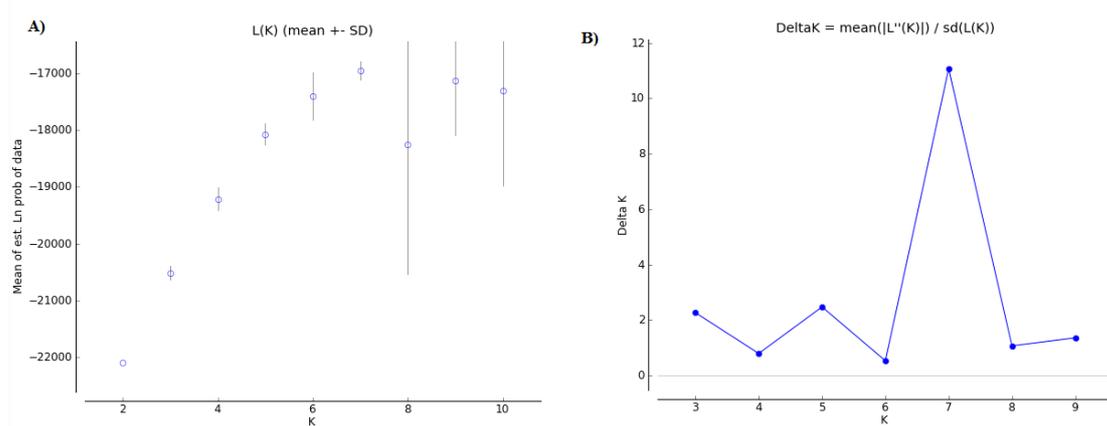


Figura 5. Resultados del programa STRUCTURE HARVESTER mostrando la *k* más probable para 9 *loci*. (A) Resultado utilizando el logaritmo de la probabilidad de los datos. (B) Resultado obtenido utilizando el estadístico ΔK .

Los siete grupos se corresponden con los seis encontrados por Marí-Mena (2013), incluyendo a la localidad suiza de Schallberg en el clúster de las localidades francesas y un grupo nuevo formado por las localidades de Custoja y Sousillon (Figura 6).

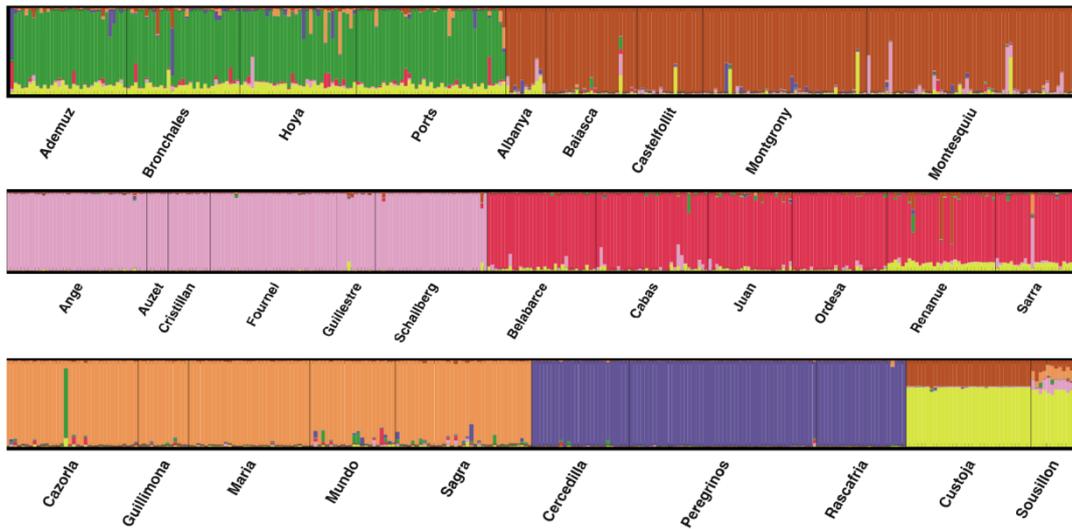


Figura 6. Análisis bayesiano de agrupación a partir del primer conjunto de datos (9 *loci* microsatélite incluyendo *missing data*).

Sin embargo, tras repetir el análisis con 8 *loci* sin *missing data*, el análisis bayesiano reveló de nuevo estructura genética, pero con una agrupación más probable en 6 clústers (Figura 7).

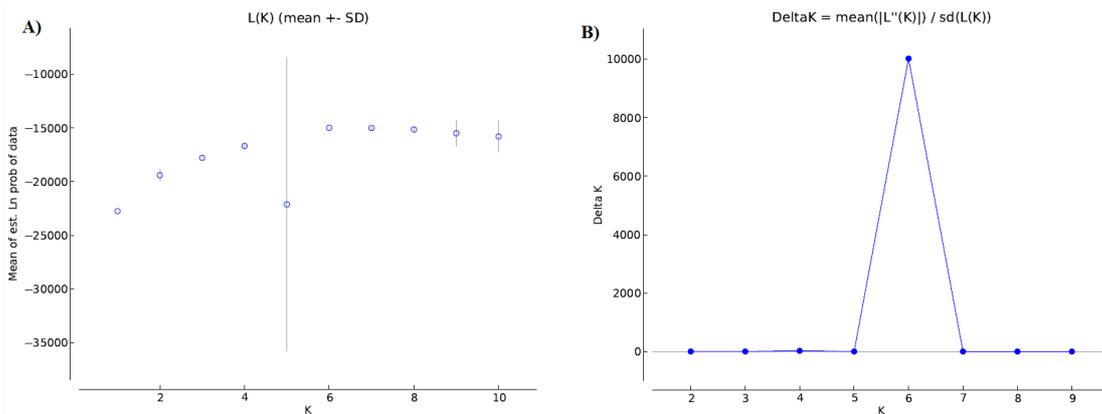


Figura 7. Resultados del programa STRUCTURE HARVESTER mostrando la *K* más probable para 8 *loci* y sin *missing data*. (A) Resultado utilizando el logaritmo de la probabilidad de los datos. (B) Resultado obtenido utilizando el estadístico ΔK .

En este caso el análisis bayesiano muestra los seis grupos encontrados por Marí-Mena (2013), en los que se incluyen las localidades de Custoja en el clúster de las localidades de los Pirineos Orientales; y Sousillon y Schallberg en el clúster de las localidades francesas (Figura 8).

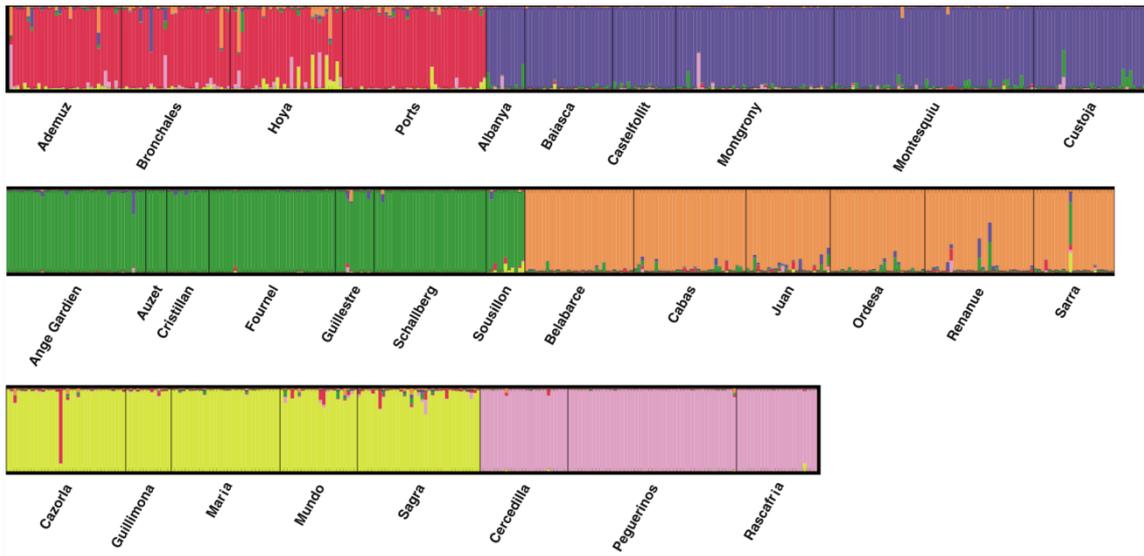
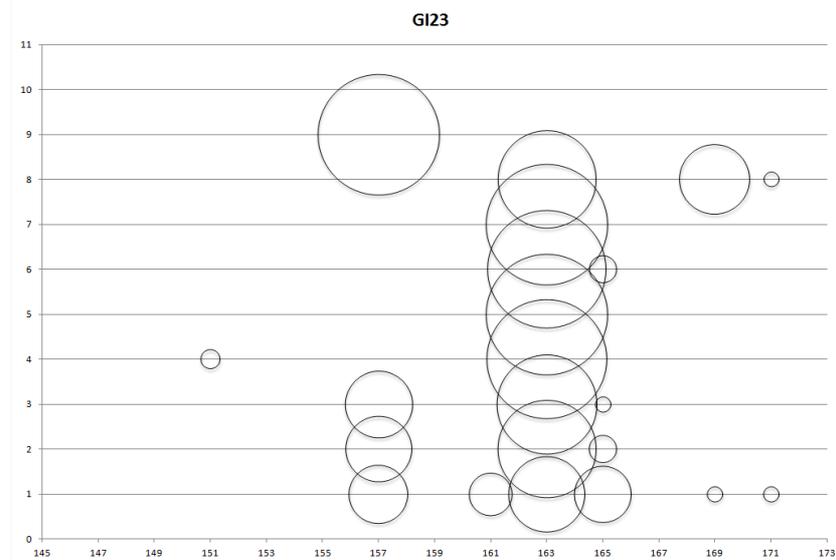
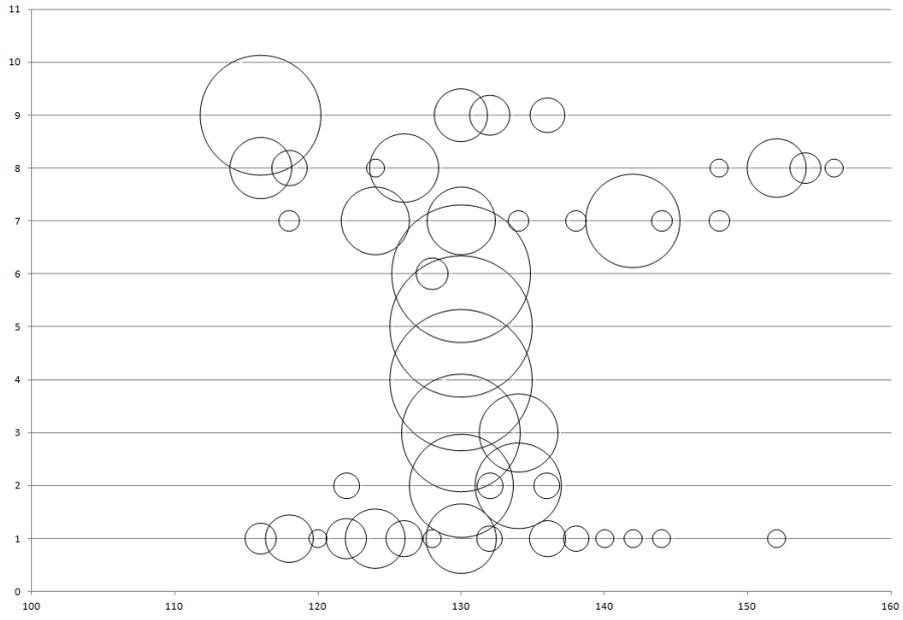


Figura 8. Análisis bayesiano de agrupación a partir de 8 *loci* microsatélite y sin *missing data*.

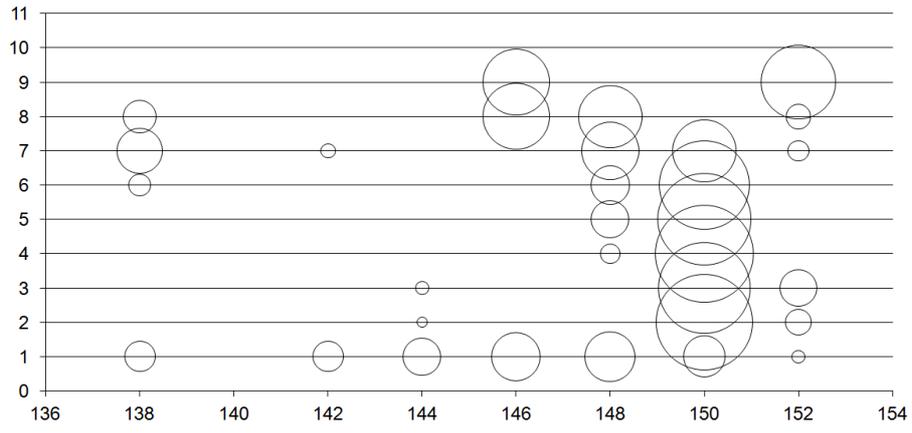
Se construyeron gráficos de frecuencias alélicas para ilustrar la variación genética intra e interpoblacional en las localidades estudiadas en este Trabajo de Fin de Grado, así como otras localidades relevantes por presentar un acervo genético similar (Figura 9).



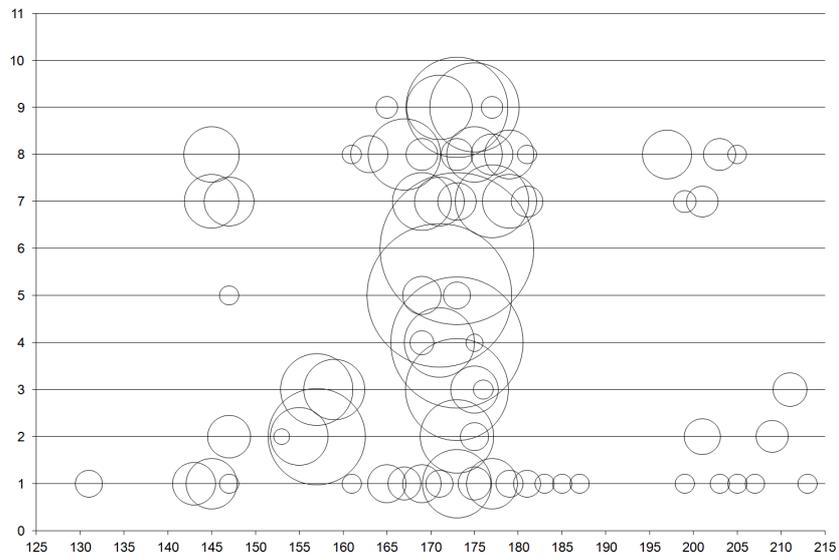
GI6



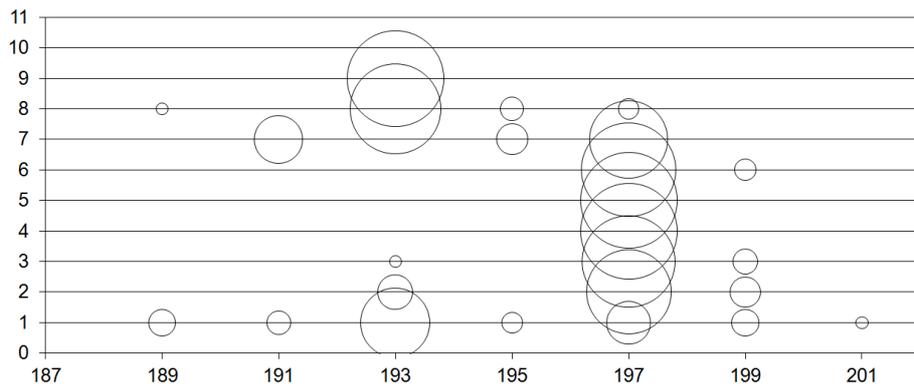
GI17



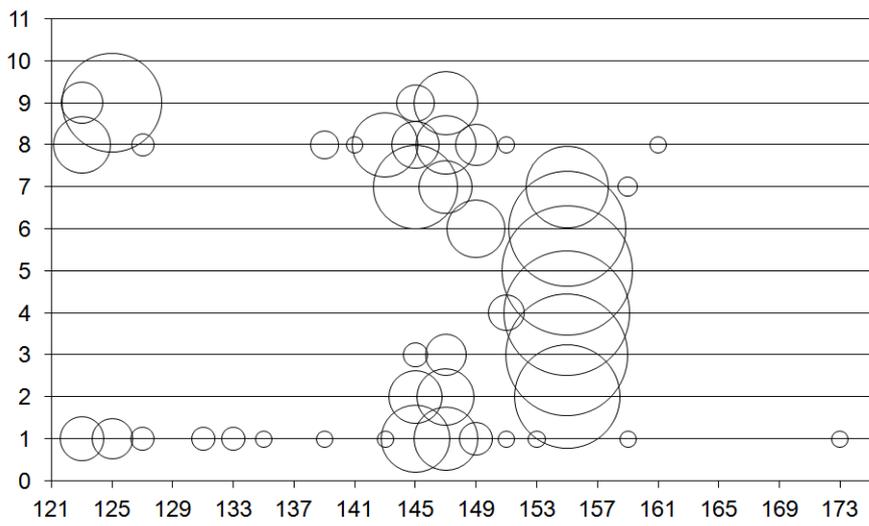
GI11



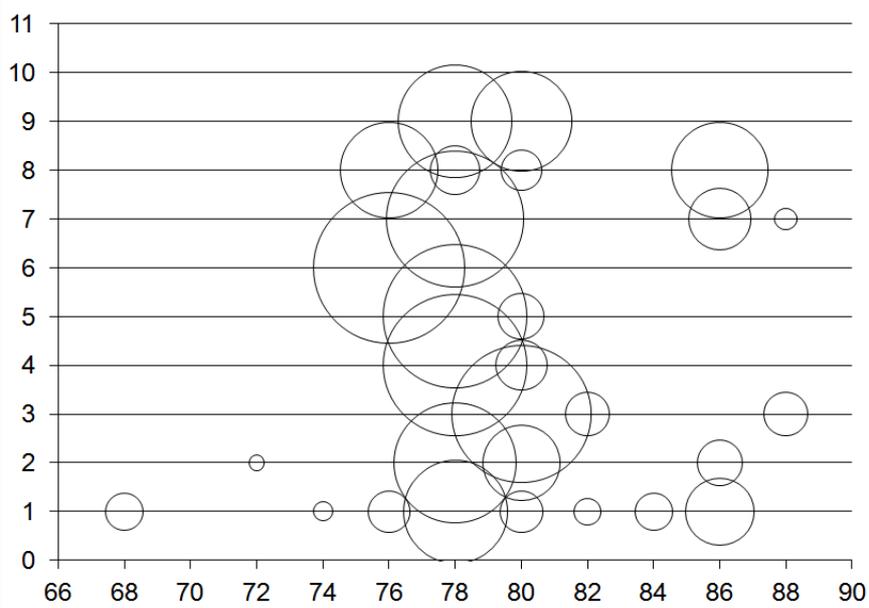
GI15



GI21



GI25



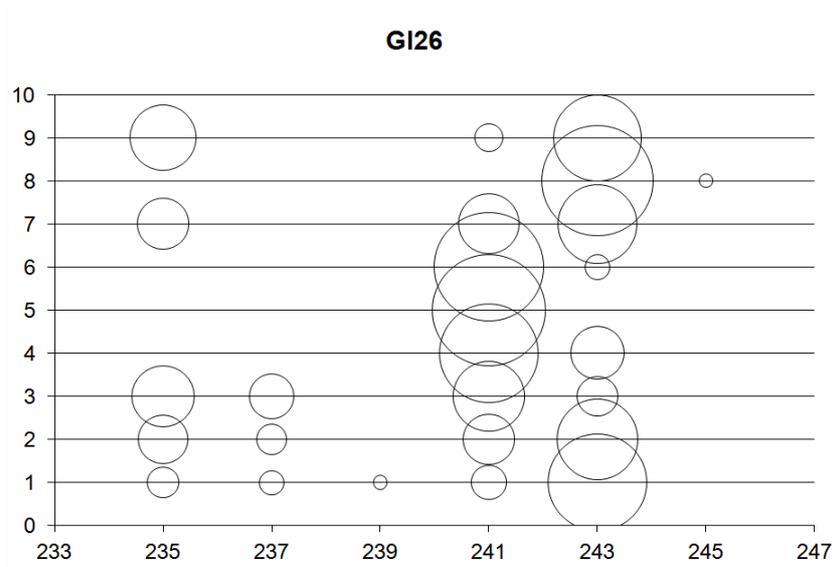


Figura 9. Frecuencias alélicas de los 8 *loci* utilizados en el present trabajo en las localidades de 1: Hoya (*L3*; clúster EI); 2: Montgrony (*L8*; clúster EP); 3: Custoja (*L29*); 4: Ange Gardien (*L16*; clúster FA); 5: Schallberg; 6: Sousillon; 7: Juan (*L14*; clúster WP); 8: Cazorla (*L26*; clúster SI) y 9: Cercedilla (*L22*; clúster CI).

DISCUSIÓN

En los análisis de ADN mitocondrial se han encontrado dos individuos que presentan heteroplasmia, hecho a menudo común pero raramente encontrado en la bibliografía. Se presentan tres explicaciones a dicho fenómeno:

- Heteroplasmia real. La existencia dentro del mismo individuo de dos variantes del ADN mitocondrial que impliquen cambio en la secuencia aminoacídica, puede deberse a: (1) que el haplotipo mutante se mantenga por no suponer una disminución de la *fitness* del individuo, (2) que el haplotipo mutante se mantenga por no presentar una frecuencia suficiente para causar disminución de la *fitness*, o (3) que dicho haplotipo mutante no haya tenido tiempo suficiente para ser fijado o perdido por selección.

- Amplificación simultánea de la copia mitocondrial y una copia nuclear (NUMT: *nuclear insertions of mitochondrial sequences*). Típicamente los NUMTs presentan codones de stop o modificaciones de la pauta de lectura debido a las distintas presiones selectivas de ese fragmento en núcleo y mitocondria. Sin embargo, esto no siempre es así y las mutaciones encontradas (primera posición del codón) son compatibles con la hipótesis de NUMT.

- Pese a que la herencia del ADN mitocondrial es esencialmente materna en animales, en algunos casos se pueden transmitir biparentalmente o incluso algunas copias esporádicamente por vía paterna (*paternal leakage*). Se asume que *Graellsia* transmite las mitocondrias vía materna, pero sí se han detectado casos de transferencia esporádica de mitocondrias también por parte del padre en algunos insectos (revisado por Magnacca & Brown 2010) y por tanto esta posibilidad no puede ser excluida.

La localidad pirenaica de Custoja presenta un único haplotipo coincidente con el mayoritario en el clúster EP. En ambos clústeres pirenaicos (tanto en WP como en EP) las localidades más occidental y meridional son monomórficas, mientras que las centrales presentan mayor diversidad haplotípica, observación que parece indicar un proceso de “efecto borde”. Custoja es congruente con este posible efecto borde al constituir el límite pirenaico norte de la distribución de *Graellsia* (población descubierta en 2013, Mochiron *et al.* 2014).

El presente Trabajo de Fin de Grado contribuye a rechazar la hipótesis de introducción deliberada de *Graellsia isabellae* en Francia a principios del siglo XX, tal como postulan diversas fuentes españolas. La definición de subespecie *Graellsia isabellae galliaegloria* por Oberthür en 1922 ha generado un fuerte debate sobre su autenticidad. Por una parte, la red de haplotipos mitocondriales rechaza el supuesto origen de dicha introducción desde el Sistema Central, siendo altamente improbable que la translocación se realizase a partir de localidades del Sistema Ibérico o los Pirineos (en aquel momento se desconocía la mayor parte del área de distribución de *Graellsia*). Por otra parte, al analizar con un tamaño muestral apropiado una población (Schallberg) cuyo origen introducido está confirmado, se detectan los haplotipos de sus fundadores (mayoritariamente franceses, pero con contribución esporádica de dos hembras españolas). Al no encontrarse el haplotipo francés en ninguna localidad Ibérica, la hipótesis de introducción deliberada en los Alpes franceses no se ve sustentada.

A nivel nuclear, el mayor grado de diversidad genética se encuentra en Custoja, siendo la localidad de Schallberg la que presenta menor polimorfismo, según ambos estimadores (heterocigosidad esperada y riqueza alélica, Tabla 3).

Custoja se aparta de HWE por causa de los *loci* GI23 y GI11. GI23 es uno de los dos marcadores para los que se repitieron las amplificaciones utilizando 2°C menos de temperatura de anillamiento, por presentar al principio una elevada cantidad de *missing data*. Se obtuvieron los genotipos ausentes, pero con todo, existe un desvío causado por exceso de homocigotos tanto en GI23 como en GI11.

Es de señalar que una población situada a 10 km al Sureste de Custoja, Albanyá (L5), no se aparta de HWE para ninguno de los 9 *loci* genotipados, como tampoco lo hace Baiasca (L9). Sin embargo, las otras localidades del clúster EP (L6-L8: Castellfolit, Montesquiú y Montgrony) sí se desvían de HWE y siempre por exceso de homocigotos, concretamente en el *locus* GI23 (nótese que Castellfolit también lo hace para el *locus* GI26).

Las fuerzas evolutivas que podrían explicar esta falta de ajuste a HWE serían:

La aparición de nuevas mutaciones, un fenómeno despreciable dentro de la escala temporal de este trabajo, ya que las tasas de mutación de *loci* microsatélites oscilan entre 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por alelo por generación (revisado por Marí-Mena, 2013).

Tanto la migración (flujo génico con otras localidades) como el bajo tamaño de población, causante del proceso de deriva génica y muchas veces asociado al fenómeno de endogamia, deberían verse reflejados como desvíos de HWE en varios marcadores, al ser procesos que deberían afectar a todo el genoma.

Sin embargo, la selección natural (no tanto sobre la región microsatélite, como sobre algún *locus* íntimamente ligado) y la presencia de alelos nulos (lectura errónea de un homocigoto por fallo en la amplificación de un alelo de un heterocigoto real) sí pueden ser causa de desvío de HWE en regiones concretas del genoma.

Teniendo en cuenta que los desvíos se deben casi exclusivamente al *locus* GI23 (que ya hubo que reamplificar por *missing data*), las explicaciones más probables son las dos últimas: selección sobre un *locus* adyacente que favorezca determinados homocigotos y/o presencia de alelos nulos que aumenten falsamente la proporción de homocigotos observados.

No contamos con datos/observaciones que sustenten una distinta presión selectiva sobre las localidades de Custoja, Castellfolit, Montesquiú y Montgrony que pueda explicar ese exceso de homocigotos del *locus* GI23. La presencia de alelos nulos sí es frecuente en microsatélites de lepidópteros (revisado por Marí-Mena, 2013).

La comparación entre las Figuras 6 y 8 ilustra la importancia de contar con genotipos multilocus sin *missing data*. Tal y como menciona el propio manual del programa STRUCTURE, la ausencia sistemática de datos para algún marcador, provoca agrupaciones espúreas. En nuestro caso, en la Figura 6 se incluye un séptimo clúster formado por Custoja y Sousillon que, sin una inspección cuidadosa de los datos, podría ser atribuido erróneamente a un proceso de hibridación entre el clúster EP (Pirineos orientales) y un hipotético nuevo grupo (amarillo).

Tras completar el conjunto de datos y habiendo eliminado el *locus* G118, los resultados de STRUCTURE indican que la población de Schallberg se enmarcaría en el mismo grupo de las localidades francesas. Dicha localidad suiza es bastante homogénea y solamente un individuo muestra un cierto grado de adscripción con las localidades de los Pirineos orientales y occidentales.

Atendiendo a las frecuencias alélicas (Figura 9), se observa que Schallberg presenta los mismos alelos que las localidades francesas (en dicho gráfico representadas por Ange Gardien, L16) y en frecuencias similares; si bien en el caso del *locus* G111, Schallberg presenta un alelo en muy baja frecuencia compartido con las localidades de Hoya del Marquesado (L3, Sistema Ibérico), Montgrony (L8, Pirineos orientales) y San Juan de la Peña (L14, Pirineos occidentales). Este resultado es congruente con el origen francés de la localidad de Schallberg ya que, como se puede observar en la Figura 3, las poblaciones francesas presentan afinidad mitocondrial con las poblaciones pirenaicas y del Sistema Ibérico.

La población suiza de Sousillon se incluye en el mismo clúster que las poblaciones francesas y Schallberg, aunque sus individuos presentan una mayor variabilidad que los de ésta. Aproximadamente la mitad de los individuos de Sousillon presentan cierta afinidad nuclear con los clústers del Sistema Ibérico (EI, rojo) y de las Montañas Béticas (SI, amarillo). La diversidad alélica de los marcadores microsatélites es mayor en Sousillon que en Schallberg. En la Figura 9 se observa como la primera comparte alelos, no solo con las localidades francesas, sino con poblaciones del Sistema Ibérico (*locus* G117) y con las Montañas Béticas (*loci* G117 y G126). En resumen, las muestras suizas de Sousillon presentan un genoma mitocondrial ibérico pero un acervo genético nuclear mayoritariamente francés, ilustrando perfectamente el resultado de:

- Una translocación en 1996 de dos hembras ibéricas a Schallberg, donde se aparearon con machos descendientes de la población francesa de Guillestre.
- El efecto de la deriva génica, provocando que el haplotipo ibérico (minoritario en Schallberg) sea el único presente en Sousillon. Esto es debido a la translocación de un bajo número de hembras (casualmente con haplotipo ibérico) desde Schallberg a Sousillon.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Las conclusiones del presente Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

- La población francesa de Custoja, autóctona, comparte su único haplotipo con el mayoritario de las poblaciones próximas de los Pirineos orientales. Custoja no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, probablemente debido a un exceso de homocigotos en dos de los marcadores empleados.
- Se constata el origen introducido de la población suiza de Schallberg a partir de individuos franceses y minoritariamente de hembras ibéricas.
- Se demuestra el origen introducido de la población suiza de Sousillon a partir de ejemplares procedentes de Schallberg que, a su vez, presentan componente francesa e ibérica. El hecho de que Sousillon presente únicamente un haplotipo ibérico ilustra el efecto de la deriva génica.

The conclusions of this work are the following:

- The natural French population of Custoja shares its only haplotype with the most frequent one at the nearby populations of eastern Pyrenees. Custoja is not at Hardy-Weinberg equilibrium, probably due to a homozygote excess in two of the microsatellites.
- The genetic results confirmed the introduced origin of the Swiss population of Schallberg, mainly from French individuals but with a minor contribution from Iberian females.
- I demonstrated the introduced origin of the Swiss population of Sousillon from specimens from Schallberg, which have both French and Iberian component. The fact that Sousillon has a single Iberian haplotype shows the effect of genetic drift.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a mis tutoras, Marta Vila Taboada y Neus Marí Mena, por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, por todo lo que me han enseñado y por todo el tiempo que han dedicado a que este Trabajo de Fin de Grado salga lo mejor posible.

A la Dra. M^a Fernanda Rodríguez Fariña y Miriam Rega López, por acogerme en la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo á Investigación da Universidade da Coruña durante una breve estancia, para observar cómo se han llevado a cabo las tareas post-PCR del presente Trabajo de Fin de Grado (purificación y secuenciación de ADNmt y genotipado de los marcadores microsatélites).

Al Dr. Nadir Álvarez y Dr. Carlos López-Vaamonde por cederme las muestras de Sousillon y Custoja, respectivamente.

Marion Baake tradujo amablemente la comunicación personal de Uwe Kauz.

BIBLIOGRAFÍA

Beebe T & Rowe G (2004) Phylogeography. In: *An introduction to molecular ecology*. pp 165-197. Oxford University Press, New York.

Clement M, Posada D & Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.

Earl DA & vonHoldt B M (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.

Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* 16: 551-558.

Evanno G, Regnaut S & Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2 611-2620.

Fenner F (2010) Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, into Australia. *Scientific and Technical Review* 29: 103-111.

Glaubitz JC (2004) CONVERT: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* 4: 309-310.

Jakobsson M & Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P & Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.

Magnacca K & Brown M (2010) Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesoprotopis*) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evolutionary Biology* 10:174.

Marí-Mena N (2013) Conservation Genetics of the protected moth *Graellsia isabellae* (Lepidoptera: Saturniidae). PhD thesis. Universidade da Coruña.

Millar JG, McElfresh JS, Romero C, Vila M, Marí-Mena N & López-Vaamonde C (2010) Identification of the sex pheromone of a protected species, the Spanish Moon Moth *Graellsia isabellae*. *Journal of Chemical Ecology* 36: 923-932.

Morichon D, Alexis B, Céline Q & López-Vaamonde C (2014) Recherche de l'Isabelle, *Graellsia isabellae* (Graëlls, 1849), en Pyrénées-Orientales et dans les réserves naturelles catalanes. Fédération des réserves naturelles catalane (Prades) & Inra d'Orléans, unité de recherche Zoologie forestière. 12 pp.

Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959

Pro Natura (2005) *Les papillons et leurs biotopes: espèces, dangers qui les menacent, protection*. Volume 3. (eds. Bâle), pp. 392-395. Ligue suisse pour la protection de la nature, Switzerland.

Romo H, García-Barros E, Martín Cano J, Ylla J & López M (2012) *Graellsia isabelae*. En: VV.AA., *Bases ecológicas preliminares para la conservación de las especies de interés comunitario en España: Invertebrados*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. 53 pp.

Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137-138.

Rousset F 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106

Selkoe K & Toonen R (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H & Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.

Vila M & Björklund M (2004) The utility of the neglected mitochondrial control region for evolutionary studies in Lepidoptera (Insecta). *Journal of Molecular Evolution* 58: 280-290.

Vila M, Marí-Mena N, Yen S-H & López-Vaamonde C (2010) Characterization of ten polymorphic microsatellite markers for the protected Spanish Moon Moth *Graellsia isabelae* (Lepidoptera: Saturniidae). *Conservation Genetics* 11: 1151-1154.