



**MINISTÈRE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE
MONTPELLIER SUPAGRO**

THÈSE

présentée à Montpellier SupAgro pour obtenir le diplôme de Doctorat

Discipline : Évolution, Écologie, Ressources génétiques, Paléontologie

École doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences,
Environnement

Laboratoire d'accueil : Unité Mixte de Recherche Centre de Biologie et de Gestion des
Populations 1062, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex

**Congruence entre différenciation morphologique et moléculaire
(Barcode moléculaire) pour sept espèces de la famille des
Phytoseiidae (Acari : Mesostigmata).**

Présentée et soutenue publiquement par

Mireille Huguette Okassa Oyieyi

le 10 décembre 2010

Membres du JURY

| | | |
|-----------------------|---|------------------------|
| Marie-Claude Bon | Chercheur USDA, Montpellier | Examinatrice |
| Emmanuel Douzery | Professeur, Université Montpellier II | Représentant de l'ED |
| Francisco Ferragut | Professeur, Université de Valencia, Espagne | Rapporteur |
| Serge Kreiter | Professeur, Montpellier SupAgro | Co-directeur de thèse |
| Sarah Samadi | Maître de conférences, Université Paris 6 | Rapporteur |
| Marie-Stéphane Tixier | Maître de conférences, Montpellier SupAgro | Co-directrice de thèse |

RESUME

Congruence entre différenciation morphologique et moléculaire (Barcode moléculaire) pour sept espèces de la famille des Phytoseiidae (Acari : Mesostigmata)

La famille des Phytoseiidae comprend des espèces d'intérêt agronomique dont certaines sont utilisées pour lutter contre des acariens ravageurs appartenant principalement aux familles des Tetranychidae et Eriophyidae. L'identification et la description des espèces de Phytoseiidae sont essentiellement basées sur des caractères morphologiques. Cependant, plusieurs problèmes d'identification sont rencontrés du fait : (1) de leur petite taille (faible nombre de caractères observables), (2) du manque de recul sur la valeur diagnostique de certains caractères dits discriminants, (3) et enfin du diagnostic fiable uniquement au stade femelle. Dans ce contexte, ce travail de thèse a pour objectif de déterminer dans quelle mesure l'approche moléculaire peut assister le diagnostic traditionnel. Pour cela, nous avons étudié l'étendue des variations intra- et interspécifiques (moléculaires et morphologiques) de sept espèces de Phytoseiidae d'intérêt agronomique, ceci pour comparer la capacité discriminante de quatre marqueurs moléculaires (12S ARNr, Cytb, COI et ITS). Dans ce travail, nous mettons en évidence l'utilité de ces marqueurs pour le diagnostic de tous les stades de développement et montrons l'importance de la forme du calyx de la spermathèque pour différencier deux espèces du genre *Euseius*, ce qui nous a permis de décrire une nouvelle espèce. Nous montrons également que les marqueurs mitochondriaux et nucléaires peuvent différencier des espèces morphologiquement proches. Cependant, il faut rester prudent quand aux conclusions tirées (espèces différentes ou populations différentes au sein d'une même espèce) sur la base des résultats obtenus avec les marqueurs mitochondriaux. Enfin, nous montrons que les règles de décision (valeurs seuils) sont difficiles à (1) établir avec ces mêmes marqueurs et (2) surtout à généraliser pour la différenciation des espèces appartenant aux deux sous-familles étudiées. Pour conclure, ce travail met en évidence de façon claire la nécessité d'une approche taxonomique intégrative, incluant un va-et-vient entre données moléculaires, morphologiques et écologiques, pour la garantie d'un diagnostic fiable des espèces de Phytoseiidae.

Mots clés. Phytoseiidae, lutte biologique, diagnostic spécifique, barcode moléculaire, morphologie.

ABSTRACT

Congruence between morphological and molecular differentiation (barcoding) for seven species of the family Phytoseiidae (Acari : Mesostigmata).

The family Phytoseiidae includes numerous species of huge interest for biological control of mite pests, essentially belonging to the families Tetranychidae and Eriophyidae. Identification and description of Phytoseiidae species are mainly based on morphological characters. However, taxonomists have to face several problems for species diagnostic because of : (1) their small size (low number of visible characters), (2) little information on the diagnostic value of some characters considered as discriminant, and at last (3) diagnostic only reliable at female stage. In this context, the present works aims to determine how molecular approaches can assist traditional diagnostic. For this, we studied the intra- and interspecific variations (morphological and molecular) of seven agronomic important species, in order to compare the ability of four molecular markers (12S rRNA, Cytb mtDNA, COI mtDNA et ITS) to discriminate between species. We first show that molecular markers could be of great help for differentiating species at all life stages. Moreover, we show the importance of the spermatheca calyx shape for separating two species of the genus *Euseius*, and a new species was then described. We also emphasize that both mitochondrial and nuclear markers differentiate morphological close species. However, some cautions have to be paid on the conclusions developed (different species or different populations within a same species) when only mitochondrial markers are used. At last, we underline that decision rules (threshold cut-off values) are difficult (1) to establish with these latter markers and also (2) to generalise for the accurate differentiation of the Phytoseiidae species belonging to the two sub-families considered. To conclude, this work clearly emphasizes the importance of integrative taxonomy, including an « up-and-down » analysis of molecular, morphological and ecological data, to secure the specific diagnostic among the family Phytoseiidae.

Key-words. Phytoseiidae, biological control, specific diagnostic, barcoding, morphology.

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'a pu se réaliser que grâce au soutien sans faille de mes deux co-encadrants, Marie-Stéphane Tixier et Serge Kreiter, envers qui j'exprime ma profonde gratitude pour l'encadrement scientifique dont j'ai bénéficié pendant ces trois années.

Je suis également reconnaissante à Brigitte, Jean-François, Marie-claude, Maxime Galan, Maxime Ferrero, Roula, Gwen, Fabio, Martial, Sandrine, Christian et Mohamad pour leurs aides scientifique et technique.

Merci particulièrement à Sabine pour son soutien quotidien lors de la rédaction de mon manuscrit.

Merci à Angham, Fabien, Guillaume, Jean-marie et Sylvie pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

Merci de tout cœur à ma famille, notamment à mon père Eugène, à ma mère Léonie, à mes frères et à ma sœur d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenue moralement et matériellement tout au long de ma formation.

Merci aussi aux familles Marie-jeanne, Makosso et Okamba pour leur assistance et leur encouragement.

Merci à Sarah Tchicou ma sœur de cœur depuis toujours et mes amis Stéphane, Virginie, Yvette et Fabien Yeloukoudila pour leur soutien.

Merci à Sabria et Nass de s'être gentiment occupés de mon fils pendant les derniers jours de la rédaction de mon manuscrit.

Merci également à Jean- Casimir, Gervilis, Elie et Goberte pour leur aide.

Mes plus grands et affectueux remerciements vont à mes deux amours mon fiancé Aymar et mon fils Isaac pour leur soutien.

Pour terminer, je tiens sincèrement à remercier les membres du jury Sarah Samadi, Marie-Claude Bon, Emmanuel Douzery et francisco Ferragut d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Chaetotaxie du bouclier dorsal des trois sous- familles : Amlyseiinae Muma (a) Phytoseiinae Berlese (b) et Typhlodrominae Scheuten (c) (Kreiter, 1991) 26
- Figure 2. Morphologie des chélicères d'*Euseius gallicus* Kreiter et Tixier de la femelle (x 50) (photo réalisée au microscope optique à contraste de phase, Okassa 2010) 27
- Figure 3. Face ventrale d'une femelle adulte d'*Euseius gallicus* Kreiter et Tixier présentant les boucliers : sternal (a) et ventrianal (b) (x 40) et les soies qu'ils portent. (photos réalisées au microscope optique à contraste de phase, Okassa 2010) 29
- Figure 4. Face ventrale d'un mâle adulte d'*Euseius gallicus* Kreiter et Tixier présentant les deux boucliers sterno-génital et ventrianal (x20) (photo réalisée au microscope optique à contraste de phase, Okassa 2010). 29
- Figure 5. Spermathèque d'une femelle adulte d'*Euseius stipulatus* Kreiter et Tixier (x 40) montrant les différentes parties la constituant (photo réalisée au microscope optique à contraste de phase, Okassa, 2010). 30
- Figure 6. Cycle de développement des Phytoseiidae (Kreiter, 1991) 32
- Figure 7. Importance de l'expertise taxonomique des Phytoseiidae dans le succès des programmes de lutte contre les espèces nuisibles des cultures. 37
- Figure 8. Liste des différents concepts d'espèces d'après Mayden (1997) 42
- Figure 9. Représentation schématique de la notion d'espèce (Samadi et Barberousse, 2005, 2006) 43
- Figure 10. Schéma représentant les fréquences des distances génétiques à l'intérieur d'une espèce (intraspécifique) et entre des espèces (interspécifiques). Ces variations peuvent être chevauchantes (absence de « gap ») ou non chevauchantes (présence de « gap »). 52
- Figure 11. Localisation des gènes de l'ADN mitochondrial au sein de la plupart des arthropodes (Simon *et al.*, 1994) 66
- Figure 12. Ensemble des étapes réalisées pour les analyses moléculaires et morphologiques sur chaque spécimen collecté 75
- Figure 13. Corrélation entre la moyenne intraspécifique et le nombre d'individus séquencés pour les marqueurs (a) 12S ARNr, (b) Cytb et (c) ITS. 226

Figure 14. Corrélation entre l'écart-type et le nombre d'individus séquencés pour les marqueurs (a) 12S ARNr, (b) Cytb et (c) ITS

227

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau I. Position taxonomique de la famille des Phytoseiidae au sein du règne animal (Lindquist <i>et al.</i> , 2009) | 24 |
| Tableau II. Liste des populations de chaque espèce modèle et des espèces morphologiquement proches. | 62 |
| Tableau III. Nombre d'individus mesurés et nombre de séquences obtenues en fonction de l'objectif de chaque étude par espèce | 64 |
| Tableau IV. Distances intra- et interspécifiques obtenues avec le modèle d'évolution K2P (Kimura 2-parameter) pour les quatre espèces du genre <i>Euseius</i> étudiées avec deux marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb) et un marqueur nucléaire (ITS) | 219 |
| Tableau V. Distances interspécifiques entre <i>I. degenerans</i> et quatre espèces du genre <i>Euseius</i> avec deux marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb) et un marqueur nucléaire (ITS) | 222 |
| Tableau VI. Nombre d'individus étudiés et distances intraspécifiques (moyenne \pm Ecart-type) observées au sein de chacune des espèces étudiées avec les marqueurs 12S ARNr, Cytb, COI et ITS | 224 |
| Tableau VII. Récapitulatif des séquences par espèce et par marqueur (croix) obtenu pendant ce travail de thèse (en bleu), présentes sur notre base (en blanc) et sur Genbank (en vert) | 243 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|--|------------|
| ANNEXE 1. Cycles PCR pour les différentes amorces utilisées | 293 |
| ANNEXE 2. Protocoles d'extractions | 294 |
| ANNEXE 3 . Arbre de consensus majoritaire à 50% obtenu en analyse en parcimonie en utilisant le marqueur nucléaire ITS pour les quatre espèces du genre <i>Phytoseiulus</i> et une espèce « outgroup » : <i>Neoseiulus californicus</i>. Les numéros des nœuds correspondent aux valeurs de Boostrap. | 296 |
| ANNEXE 4. Poster présenté au congrès international d'Acarologie, Recife, Brésil, Aout 2010. | 297 |

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 17 |
| Liste des publications présentée dans ce travail de thèse | 21 |
| Chapitre I. Généralités sur la famille Phytoseiidae (Acari : Mesostigmata) | 24 |
| I.1. Position taxonomique | 24 |
| I.2. Les caractéristiques morphologiques des trois sous-familles. | 25 |
| I.2.1. La sous-famille des Amblyseiinae Muma | 25 |
| I.2.2. La sous-famille des Phytoseiinae Berlese | 25 |
| I.2.3. La sous-famille des Typhlodrominae Scheuten | 25 |
| I.3. La morphologie externe et interne des espèces de la famille des Phytoseiidae | 26 |
| I.3.1. Le gnathosoma | 27 |
| I.3.2. L'idiosoma | 28 |
| I.4. Le cycle de développement | 31 |
| I.5. La Sex Ratio | 32 |
| I.6. Le mode de reproduction | 32 |
| I.7. Le régime alimentaire | 33 |
| I.8. Les relations entre les Phytoseiidae et la plante substrat | 34 |
| I.9. Les capacités de dispersion des Phytoseiidae | 35 |
| I.10. Importance de l'expertise taxonomique pour la famille des Phytoseiidae | 36 |
| I.10.1. La lutte biologique par conservation de la biodiversité | 38 |
| I.10.2. La lutte biologique par acclimatation | 38 |
| I.10.3. La lutte biologique par augmentation | 39 |
| Chapitre II. Le diagnostic spécifique chez les Phytoseiidae | 42 |
| Partie A - Généralités sur le concept d'espèce et exemple d'application chez les Phytoseiidae | 42 |
| II.A.1. Le concept d'espèce | 42 |
| II.A.1.1 Le concept morphologique de l'espèce | 44 |
| II.A.1.1.1. Définition | 44 |

| | |
|---|-----------|
| II.A.1.1.2. Le cas des Phytoseiidae | 45 |
| II.A.2.1. Le concept biologique de l'espèce | 46 |
| II.A.2.1.1. Définition | 46 |
| II.A.2.1.2. Le cas des Phytoseiidae | 47 |
| II.A.3.1. Le concept phylogénétique de l'espèce | 47 |
| II.A.3.1.1. Définition | 47 |
| II.A.3.1.2. Le cas des Phytoseiidae | 48 |
| II.A.2. Le barcode moléculaire : nouvel outil d'identification taxonomique ? | 48 |
| II.A.2.1. Définition et historique | 48 |
| II.A.2.2 Pourquoi utiliser le barcoding en Taxonomie ? | 49 |
| II.A.3. Le choix du marqueur moléculaire | 50 |
| II.A.4 Comment décider si deux individus appartiennent ou pas à une même espèce sur la base du barcoding ? | 51 |
| II.A.4.1. La notion de seuil | 51 |
| II.A.4.2. Les analyses phylogénétiques | 53 |
| II.A.4.3. Les méthodes basées sur la théorie de la coalescence | 55 |
| II.A.4.4. Les autres méthodes | 56 |
| II.A.5. Avantages et limites de l'approche barcode : chez les Arthropodes en général | 56 |
| II.A.6. Le Barcoding moléculaire et le diagnostic au sein de la famille des Phytoseiidae | 60 |
| Chapitre II. Le diagnostic spécifique au sein de la famille des Phytoseiidae | 61 |
| Partie B. Matériel et méthodes | 61 |
| II.B.1. Echantillonnage | 61 |
| II.B.1.1. Liste des taxons étudiés | 61 |
| II.B.1.2. Lieux de collecte et méthodes de prélèvement des échantillons | 61 |
| II.B.2. Analyses moléculaires | 65 |
| II.B.2.1. Extraction de l'ADN | 65 |
| II.B.2.2. Evaluation de la quantité d'ADN extrait | 65 |
| II.B.2.3. Gènes utilisés et protocoles d'amplification de l'ADN | 65 |
| II.B.2.3.1. Les gènes mitochondriaux | 66 |
| II.B.2.3.2. Le gène nucléaire ITS | 68 |
| II.B.2.4. Les protocoles d'amplifications | 68 |

| | |
|--|-----------|
| II.B.2.5. Les difficultés rencontrées | 69 |
| II.B.2.6. Obtention des séquences | 71 |
| II.B.6.1. Le séquençage | 71 |
| II.B.6.2. La correction des séquences | 71 |
| II.B.6.3. Le contrôle de la qualité de la séquence amplifiée | 72 |
| II.B.2.7. Analyse des séquences | 72 |
| II.B.3. Analyses morphologiques | 73 |
| II.B.3.1. Montage des acariens | 73 |
| II.B.3.2. Les observations microscopiques | 73 |
| II.B.3.3. Les analyses statistiques | 73 |
| II.B.4. La mise en collection des échantillons | 74 |
| II.B.4.1. Les spécimens montés entre lame et lamelle | 74 |
| II.B.4.2. Les extraits d'ADN | 74 |
| II.B.4.3. Les séquences d'ADN | 74 |
| II.B.5. Conclusion | 75 |
| CHAPITRE III. Le diagnostic aux stades immatures et adultes mâles | 77 |
| III.1. Objectifs de l'étude | 77 |
| III.2. Position taxonomique de <i>Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus</i> Ragusa | 78 |
| III.3. Quelques caractéristiques biologiques de <i>Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus</i> | 78 |
| III.3.1. Type de prédation | 78 |
| III.3.2. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio | 78 |
| III.4. Importance de cette espèce en lutte biologique | 79 |
| III.5. Distribution géographique | 79 |
| III.6. Populations et espèces étudiées | 80 |
| III.7. Article 1. Okassa M., Tixier M.-S., Kreiter S. 2010. Molecular identification of all life stages of a mite species (Mesostigmata: Phytoseiidae): <i>Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus</i>. En cours de soumission. | 80 |
| CHAPITRE IV. Partie A. La distinction de deux espèces proches et la découverte d'une nouvelle espèce | 98 |
| IV.A.1. Objectifs de l'étude | 98 |
| IV.A.2. Position taxonomique de <i>Euseius stipulatus</i> (Athias-Henriot) | 99 |

| | |
|--|------------|
| IV.A.3. Quelques caractéristiques biologiques d'<i>Euseius stipulatus</i> | 99 |
| IV.A.3.1. Type de prédation | 99 |
| IV.A.3.2. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio | 100 |
| IV.A.4. Importance de cette espèce en lutte biologique | 101 |
| IV.A.5. Distribution géographique | 101 |
| IV.A.6. Populations et espèces étudiées | 101 |
| IV.A.7. Article 2. Okassa M., Tixier M.-S., Kreiter S. 2009. Molecular and morphological evidence for a new species status within the genus <i>Euseius</i> (Acari: Phytoseiidae). Canadian Journal of Zoology 87, 689-698. | 102 |
| IV.A.8. Article 3. Tixier M.-S., Kreiter S., Okassa M., Cheval B. 2009. A new species of the genus <i>Euseius</i> Wainstein (Acari: Phytoseiidae) from France. Journal of Natural History 44, 241-254. | 121 |
| CHAPITRE IV. Partie B. Taxonomie intégrative et espèces morphologiquement proches : exemple de <i>Phytoseiulus persimilis</i> Athias-Henriot et <i>Phytoseiulus macropilis</i> (Banks). | 137 |
| IV.B.1. Présentation et objectifs de l'étude | 137 |
| IV.B.2. Position taxonomique de <i>Phytoseiulus persimilis</i> et <i>P. macropilis</i> | 139 |
| IV.B.3. Quelques caractéristiques biologiques de <i>Phytoseiulus persimilis</i> et <i>P. macropilis</i> | 139 |
| IV.B.3.1. Caractéristiques prédatrices | 139 |
| IV.B.3.2. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio de <i>Phytoseiulus persimilis</i> | 139 |
| IV.B.3.1. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio de <i>Phytoseiulus macropilis</i> | 141 |
| IV.B.4. Importance de ces deux espèces en lutte biologique | 141 |
| IV.B.5. La distribution géographique des deux espèces | 142 |
| IV.B.6. Populations et espèces étudiées | 143 |
| IV.B.7. Article 4. Okassa M., Tixier M.-S., Kreiter S. 2010. Morphological and molecular diagnostic of <i>Phytoseiulus persimilis</i> Athias-Henriot and <i>Phytoseiulus macropilis</i> (Banks) (Acari : Phytoseiidae). Experimental and Applied Acarology 59: 291-303. | 144 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE IV. Partie C. LA TAXONOMIE INTEGRATIVE POUR ETUDIER L'ETENDUE DE LA VARIATION INTRASPECIFIQUE ET SES LIMITES AVEC LA VARIATION INTERSPECIFIQUE POUR FIABILISER LE DIAGNOSTIC SPECIFIQUE | 163 |
| IV.C.1. Le cas de l'espèce <i>Neoseiulus californicus</i> | 164 |
| IV.C.1.1. Position taxonomique de <i>Neoseiulus californicus</i> (McGregor) | 164 |
| IV.C.1.2. <i>Neoseiulus californicus</i> et les synonymies. | 165 |
| IV.C.1.3. Quelques caractéristiques biologiques de <i>Neoseiulus californicus</i> | 166 |
| IV.C.1.3.1. Caractéristiques prédatrices | 166 |
| IV.C.1.3.2. Durée de développement, taux de fécondité et sex ratio | 166 |
| IV.C.1.4. Importance de cette espèce en lutte biologique | 167 |
| IV.C.1.5. Distribution géographique | 167 |
| IV.C.1.7. Populations et espèces étudiées | 167 |
| IV.C. 1.8. Article 5. Okassa M., Tixier M.-S., Guichou S., Kreiter S. Molecular and morphological variations within the species <i>Neoseiulus californicus</i> McGregor (Acari: Phytoseiidae) : consequences for diagnostic and biological control. En cours de soumission. | 168 |
| IV.C.2. Le cas de l'espèce <i>Typhlodromus (Typhlodromus) pyri</i> Scheuten | 168 |
| IV.C.2.1. Objectif de l'étude | 186 |
| IV.C.2.2. Position taxonomique de <i>Typhlodromus (Typhlodromus) pyri</i> | 187 |
| IV.C.2.3. <i>Typhlodromus (Typhlodromus) pyri</i> et les synonymies | 187 |
| IV.C.2.4. Quelques caractéristiques biologiques de <i>Typhlodromus (Typhlodromus) pyri</i> | 188 |
| IV.C.2.4.1. Type de prédation | 188 |
| IV.C.2.4.1.2. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio | 188 |
| IV.C.2.5. Importance de cette espèce en lutte biologique | 189 |
| IV.C.2.6. Distribution géographique | 189 |
| IV.C.2.7. Populations et espèces étudiées | 189 |
| IV.C.2.8. Article 6. Okassa M., Kreiter S. Tixier M.-S.. An integrative taxonomical approach for specific diagnostic : the case of <i>Typhlodromus (Typhlodromus) pyri</i> (Scheuten) (Acari: Phytoseiidae). En cours de soumission. | 190 |
| CHAPITRE IV. Partie D. Autres espèces d'intérêts agronomiques et résultats préliminaires | 224 |
| IV.D.1. Délimiter deux espèces du même genre : exemple de <i>Kampimodromus aberrans</i> (Oudemans) et <i>Kampimodromus corylosus</i> Kolodochka | 212 |

| | |
|---|------------|
| IV.D.1.1. Position taxonomique et caractères morphologiques utilisés pour différencier ces deux espèces. | 212 |
| IV.D.1.2. Distribution géographique | 213 |
| IV.D.1.3. Importance de ces espèces en lutte biologique | 213 |
| IV.D.1.4. Etudes réalisées | 214 |
| IV.D.1.4.1. Matériel et méthodes | 214 |
| IV.D.1.4.2. Résultats et discussion | 214 |
| IV.D.2. Délimiter deux espèces du même genre : exemple de <i>Amblyseius swirskii</i> Athias- Henriot et <i>Amblyseius andersoni</i> (Chant) | 215 |
| IV.D.2.1. Position taxonomique et caractères morphologiques utilisés pour identifier ces deux espèces | 215 |
| IV.D.2.2. Distribution géographique | 215 |
| IV.D.2.3. Importance de ces espèces en lutte biologique | 215 |
| IV.D.2.4. Etudes réalisées | 216 |
| IV.D.2.4.1. Matériel et méthodes | 216 |
| IV.D.2.4.2. Résultats et discussion | 216 |
| IV.D.3. Délimiter quatre espèces du même genre : <i>E. stipulatus</i>, <i>E. gallicus</i>, <i>E. finlandicus</i> et <i>Euseius ovalis</i> (Evans) | 217 |
| IV.D.3.1. Position taxonomique de <i>E. ovalis</i> et <i>E. finlandicus</i> et caractères morphologiques utilisés pour identifier les quatre espèces du genre <i>Euseius</i> étudiées | 217 |
| IV.D.3.2. Distribution géographique | 217 |
| IV.D.3.3. Importance de ces espèces en lutte biologique | 218 |
| IV.D.3.4. Etudes réalisées | 218 |
| IV.D.3.4.1. Matériel et méthodes | 218 |
| IV.D.3.4.2. Résultats et discussion | 218 |
| IV.D.4. Etude de la variation intraspécifique de <i>Iphiseius degenerans</i> (Berlese) | 220 |
| IV.D.4.1. Position taxonomique de <i>I. degenerans</i> | 220 |
| IV.D.4.2. Importance de cette espèce en lutte biologique | 220 |
| IV.D.4.2. 1. Etudes réalisées | 220 |
| IV.D.4.2.1.1. Matériel et méthodes | 220 |
| IV.D.4.2.1.2. Résultats et discussion | 221 |
| IV.D.5. Variations interspécifiques exemple de <i>I. degenerans</i> et d'autres espèces proches du genre <i>Euseius</i> | 221 |
| IV.D.6. Discussion générale | 223 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE V. Discussion generale et perspectives | 229 |
| V.1. Rappel des objectifs de ce travail de thèse | 229 |
| V.2. Les principales conclusions et perspectives | 230 |
| V.2.1. Le diagnostic à tous les stades de développement | 230 |
| V.2.2. Etude de l'étendue des variations intra- et interspécifiques morphologiques et moléculaires | 231 |
| V.2.2.1. La découverte d'une nouvelle espèce | 231 |
| V.2.2.2. La délimitation des espèces morphologiquement proches : exemple de <i>P. persimilis</i> et <i>P. macropilis</i> | 232 |
| V.2.3. Mise en évidence d'espèces cryptiques au sein de la famille des Phytoseiidae et pertinence des différents marqueurs moléculaires pour différencier ces entités | 233 |
| CHAPITRE VI. Conclusion générale | 237 |
| VI.1. Quel est le marqueur moléculaire le plus pertinent pour différencier de façon fiable les espèces de Phytoseiidae étudiées ? | 237 |
| VI.2. Quelles sont les limites des variations intra- et interspécifiques moléculaires des espèces étudiées? | 238 |
| VI.3. Est-il possible d'établir un seuil unique de décision pour délimiter les espèces au sein de la famille des Phytoseiidae ? | 239 |
| VI.4. Est-ce que les approches moléculaires ont réellement permis d'améliorer le diagnostic morphologique ? | 239 |
| VI.5. Le développement des bases de données pour le diagnostic des Phytoseiidae : état des lieux et développements à venir. | 241 |
| Références bibliographiques | 245 |

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Ce travail de thèse porte sur la famille des Phytoseiidae (Acari : Mesostigmata), elle comprend de nombreuses espèces prédatrices, d'intérêt agronomique (McMurtry et Croft, 1997). C'est au début des années 60 que les travaux sur les espèces de cette famille se sont considérablement développés, du fait des capacités de plusieurs d'entre elles à contrôler les pullulations d'espèces de ravageurs des cultures, appartenant surtout aux familles des Tetranychidae, des Tenuipalpidae et des Eriophyidae (Kostiainen et Hoy, 1994 ; McMurtry et Croft, 1997).

Cette famille comporte aujourd'hui près de 2200 espèces considérées comme valides (Moraes *et al.*, 2004). L'identification spécifique de ces organismes est fondée uniquement sur des caractères morphologiques, comme la chaetotaxie du dorsum, et particulièrement les longueurs de soies qu'il porte, la chaetotaxie des pattes, la forme de la spermathèque et le nombre de dents sur les chélicères (Athias-Henriot, 1968, 1969 ; Chant et McMurtry, 1994 ; Moraes *et al.*, 2004 ; Tixier *et al.*, 2006a ; Chant et McMurtry, 2007). L'identification est cependant souvent complexe, du fait de la taille microscopique de ces acariens (faible nombre de caractères visibles et discriminants), des descriptions souvent succinctes et anciennes, de l'absence de clefs d'identification pour la majorité des genres et enfin, du manque de recul sur la fiabilité de certains caractères pour séparer ces entités spécifiques. D'une part, il a été montré que les longueurs des soies portées par le bouclier dorsal, utilisées pour différencier les espèces, pouvaient parfois varier considérablement au sein d'une même espèce (Athias-Henriot, 1962 ; Tixier *et al.*, 2003b, 2006b, 2008a,b). D'autre part, l'observation de certains caractères considérés parfois comme « discriminants » pour certains genres, comme la forme de la spermathèque, le nombre de solénostomes sur le bouclier dorsal ou le nombre de dents sur les chélicères, dépendent de la qualité du montage des spécimens. De plus, la valeur diagnostique de ces caractères dépend de l'expérience du taxonomiste et de son opinion sur les caractères morphologiques qui peuvent délimiter les espèces de cette famille. Des avis divergents sur la valeur discriminante de certains caractères se retrouvent ainsi dans la littérature (Chant et McMurtry, 1994).

Face à ces difficultés, il a semblé important, compte tenu de l'importance économique de plusieurs espèces de cette famille utilisées dans des programmes de lutte biologique, de fiabiliser le diagnostic spécifique. En 2003, Hebert et ses

collaborateurs ont proposé d'utiliser une portion du gène COI pour faciliter l'identification de l'ensemble des espèces du vivant. Depuis, la démarche qui consiste à utiliser des marqueurs moléculaires pour identifier les espèces s'est généralisée (Hebert *et al.*, 2004 a,b ; Hogg et Hebert, 2004 ; Ball *et al.*, 2005 ; Greenstone *et al.*, 2005 ; Smith *et al.*, 2005 ; Hajibabaei *et al.*, 2007a,b ; Costa *et al.*, 2007). Cette « approche » a permis une réelle avancée dans certains groupes taxonomiques pour lesquels l'identification sur la base de caractères morphologiques des spécimens examinés reste complexe (Evans *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2007) et impossible pour les stades immatures (Pegg *et al.*, 2006 ; Ahrens *et al.*, 2007 ; Randrianiaina *et al.*, 2007). Des bases de données ont été développées pour standardiser l'expertise taxonomique et faciliter son accès à des non-spécialistes (Ratnasingham et Hebert, 2007). Face aux succès de cette démarche, nous nous sommes intéressés à son application à la famille des Phytoseiidae. L'utilisation des marqueurs moléculaires pour délimiter les espèces de Phytoseiidae est relativement récente (Navajas et Fenton, 2000 ; Jeyaprakash et Hoy, 2002 ; Tixier *et al.*, 2006a,b, 2008a, 2010). Ce travail a donc pour objectif de déterminer dans quelle mesure le barcode moléculaire, et plus largement l'utilisation de marqueurs moléculaires, pourraient améliorer le diagnostic spécifique des Phytoseiidae. Pour cela, nous avons étudié l'application de cette « approche » pour **sept espèces d'intérêt agronomique**, dont certaines sont commercialisées pour être introduites dans diverses cultures à travers le monde.

Ce travail est divisé en **six** chapitres.

Le **premier chapitre** présente les généralités sur la famille des Phytoseiidae, c'est à dire sa position taxonomique, les caractéristiques morphologiques des trois sous-familles qui la compose, la morphologie externe et interne des espèces ainsi que leurs caractéristiques biologiques générales (cycle de développement, mode de reproduction, sex-ratio, régimes alimentaires...). A la fin de ce chapitre, une présentation de leur intérêt en lutte biologique sera également développée.

Le **deuxième chapitre** est consacré à la présentation du concept d'espèce chez les Arthropodes et chez les Phytoseiidae. Nous présenterons également le barcode moléculaire, ses objectifs, les divers travaux scientifiques qui ont été conduits, sur les arthropodes, et notamment les réserves que cette approche suscite.

Le **troisième** et le **quatrième chapitre**, présentent les approches expérimentales et les résultats obtenus. Au début de chacun des chapitres, une introduction sur la

biologie, la distribution géographique et l'intérêt agronomique de chacune des sept espèces étudiées sera proposée.

Dans le **troisième chapitre**, nous nous sommes intéressés au diagnostic spécifique des stades immatures de développement et adulte mâle. Actuellement, le diagnostic spécifique fiable est uniquement basé sur l'observation des spécimens femelles.

Dans le **quatrième chapitre**, nous avons présenté dans la partie A comment le barcode moléculaire a contribué à la découverte d'une nouvelle espèce. Dans les parties B, C et D, nous avons présenté l'ensemble des travaux réalisés pour déterminer dans quelle mesure les marqueurs moléculaires peuvent : **(1)** améliorer la distinction d'entités spécifiques qui sont morphologiquement proches ; **(2)** mettre en évidence des espèces morphologiquement indifférenciées (espèces cryptiques). Pour répondre à ces questions, l'étendue des variations (morphologique et moléculaire) intra- et interspécifiques des espèces modèles choisies, ainsi que des espèces du même genre, ont été étudiées. Enfin, dans la dernière partie de ce chapitre, nous présenterons trois études préliminaires réalisées sur quelques espèces d'intérêt agronomique. Ce travail a pour objectif de déterminer si l'utilisation du Barcode moléculaire peut être généralisée à d'autres espèces de Phytoseiidae que celles initialement étudiées.

Nous terminerons la présentation de ce travail de thèse par une discussion générale dans le **cinquième chapitre**, discussion dans laquelle seront présentées les principales avancées et les perspectives de recherche pour les années futures. Puis, une conclusion générale sera présentée dans le **sixième chapitre**, conclusion dans laquelle nous tenterons d'apporter des éléments de réponses aux questions suivantes :

- ❖ Quel est le marqueur moléculaire le plus pertinent pour différencier de façon fiable les espèces de Phytoseiidae étudiées ?
- ❖ Quelles sont les limites des variations moléculaires intra- et interspécifiques des espèces étudiées ?
- ❖ Est-il possible d'établir un seuil unique de décision pour délimiter les espèces au sein de la famille des Phytoseiidae ?
- ❖ Est-ce que les approches moléculaires ont réellement permis d'améliorer le diagnostic morphologique ?

L'application du barcode moléculaire (« barcoding ») est basée sur la constitution de bases de données associant les séquences d'ADN aux noms des espèces correspondantes. A la fin de ce travail, nous avons pensé qu'il était de ce fait intéressant de dresser l'état des lieux de cette base de données pour la famille des Phytoseiidae et de définir les perspectives pour les années futures.

Liste des publications présentée pendant ce travail de thèse

1. **Okassa M**, Tixier M.-S, Cheval B, Kreiter S. 2009. Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). Canadian Journal of Zoology, 87, 689-698.
2. Tixier M.-S., Kreiter S., **Okassa M.**, Cheval B 2009. A new species of the genus *Euseius* Wainstein (Acari: Phytoseiidae) from France. Journal of natural History 44,241-254.
3. **Okassa M**, Tixier M.-S, Kreiter S. 2010 A multiloci Barcoding approach for molecular identification of all life stages of *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) *exhilaratus* Ragusa (Acari: Mesostigmata). En cours de soumission.
4. **Okassa M.** Tixier M.-S, Kreiter S. 2010. Morphological and molecular diagnostics of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae). Experimental and Applied Acarology, 59: 291-303
5. **Okassa M.**, Tixier M.-S., Guichou S., Kreiter S. Molecular and morphological variations within the species *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae) : consequences for diagnostic and biological control. En cours de soumission.
6. **Okassa M.**, Tixier M.-S, Cheval B., Kreiter S. An integrative taxonomical approach for specific diagnostic:the case of *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) *pyri* (Scheuten) (Acari: Phytoseiidae). En cours de soumission.

Liste des publications auxquelles j'ai participé mais non présentées dans ce document

7. Tixier M.-S, Ferrero M., **Okassa M.**, Guichou S.,Kreiter S. 2010. Morphological and molecular analyses of four populations of *Phytoseiulus longipes* (Mesostigmata: Phytoseiidae) in accordance with their feeding behaviour, Bulletin of Entomological Research, 100 (5), 569-579.
8. Kanouh M., Tixier M.-S., **Okassa M.**, Kreiter S. 2010. Phylogenetic and biogeographic analysis of the genus *Phytoseiulus* (Acari: Phytoseiidae). Zoologica Scripta, 39 , 450-461.

9. Tixier M.-S., **Okassa M.**, Liguori M.L., Poinso A., Salerno B., Kreiter S. Voucher specimens for DNA sequences of Phytoseiid mites (Acari: Mesostigmata). Accepté dans *Acarologia*.
10. Tixier M.S., Poinso A., **Okassa M.**, Ragusa S., Kreiter S. On the synonymy between *Neoseiulus idaeus* and *N. picanus* (Acari: Phytoseiidae). En préparation.

Liste des communications dans des congrès internationaux

11. **Okassa M.**, Tixier M.-S., Kreiter S. 2008. Molecular biology for Phytoseiidae identification: preliminary results. European Congress of EURAAC, Montpellier Juillet 2008: 62-69.
12. **Okassa M.**, Tixier M.-S., Kreiter S. 2008. Des marqueurs moléculaires pour fiabiliser le diagnostic au sein de la famille des Phytoseiidae. AFPP -8^{ème} Conférence internationale sur les ravageurs en agriculture Montpellier-22 et 23 octobre 2008.
13. **Okassa M.**, Tixier M.-S., Cheval B., Kreiter S. 2010. Molecular diagnostic within a Phytoseiidae species *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus* Ragusa (Acari: Mesostigmata) at different life stages. XIII International Congress of Acarology, aout 2010. Recife, Brésil

**CHAPITRE I. GENERALITES SUR LA
FAMILLE DES PHYTOSEIIDAE (ACARI :
MESOSTIGMATA)**

CHAPITRE I. GENERALITES SUR LA FAMILLE PHYTOSEIIDAE (ACARI : MESOSTIGMATA)

I.1. Position taxonomique

Les Phytoseiidae sont une famille d'acariens appartenant à l'ordre des Mesostigmata. La position taxonomique de cette famille est illustrée dans le tableau I ci dessous.

Tableau I. Position taxonomique de la famille des Phytoseiidae au sein du règne animal (Lindquist *et al.*, 2009)

| | |
|--------------------|----------------|
| Règne | Animalia |
| Embranchement | Arthropoda |
| Sous-embranchement | Chelicerata |
| Classe | Arachnida |
| Sous-classe | Acari |
| Super-ordre | Anactinotricha |
| Ordre | Mesostigmata |
| Super-famille | Ascoidea |
| Famille | Phytoseiidae |

La première espèce de Phytoseiidae a été décrite en 1839 [*Zercon obtusus* (Koch), actuellement placée dans le genre *Amblyseius*]; seulement 21 espèces étaient décrites et signalées par Nesbitt en 1951 (Chant, 1985a) et 165 espèces en 1959 (Chant, 1959). Près de 2800 espèces dont 2200 valides sont répertoriées dans le dernier catalogue mondial (Moraes *et al.*, 2004). Chant et McMurtry (1994, 2007) répartissent les espèces de cette famille dans 3 sous-familles (Amblyseiinae Muma, Phytoseiinae Berlese et Typhlodrominae Wainstein), 15 tribus, 9 sous-tribus, 84 genres (Chant et McMurtry, 1994, 2003a,b, 2004a,b ; Moraes *et al.*, 2004 ; Chant et McMurtry, 2005a,b,c, 2006a,b, 2007).

I.2. Les caractéristiques morphologiques des trois sous-familles.

Les espèces auxquelles nous nous sommes intéressés dans ce travail appartiennent à deux sous-familles : Amblyseiinae et Typhlodrominae. Ces deux sous-familles présentent un nombre plus élevé d'espèces que la troisième sous-famille (Phytoseiinae) et consécutivement, un nombre également plus important d'espèces d'intérêt agronomique. La distinction entre ces sous-familles est basée sur la chaetotaxie du bouclier dorsal.

I.2.1. La sous-famille des Amblyseiinae Muma

Les espèces de la sous-famille des Amblyseiinae sont caractérisées par la présence de quatre paires de soies latérales (j3, z2, z4 et s4) sur la partie antérieure du bouclier dorsal (absence des soies z3 et s6) (Figure 1). Cette sous-famille comprend 1478 espèces, 61 genres et 9 tribus (Chant et McMurtry, 2007). On note une grande différence entre le nombre de genres et d'espèces incluses dans chaque tribu. Par exemple, la tribu des Neoseiulini comprend 10 genres dont le genre *Neoseiulus* qui comprend près de 354 espèces décrites, alors que la tribu des Phytoseiulini ne comporte qu'un seul genre (*Phytoseiulus*) avec 4 espèces décrites (Chant et McMurtry, 1994, 2007).

I.2.2. La sous-famille des Phytoseiinae Berlese

Les espèces de cette sous-famille se caractérisent par la présence des soies z3 et/ou s6 sur le prodorsum en plus des quatre soies latérales présentes également chez les Amblyseiinae (j3, z2, z4 et s4) et par l'absence d'au moins l'une des soies suivantes : Z1, S2, S4 et S5 sur la partie postérieure du bouclier dorsal (Figure 1). Cette sous-famille comporte 192 espèces et 3 genres (Chant et McMurtry, 1994, 2007).

I.2.3. La sous-famille des Typhlodrominae Scheuten

Les espèces de cette sous-famille se différencient de celles des deux sous-familles précédentes par la présence des soies z3 et /ou s6 sur le prodorsum et d'au moins une des soies suivantes : Z1, S2, S4 ou S5 sur l'opisthosoma (Figure 1) Cette sous-famille comprend 619 espèces, 21 genres et 6 tribus (Chant et McMurtry, 1994, 2007).

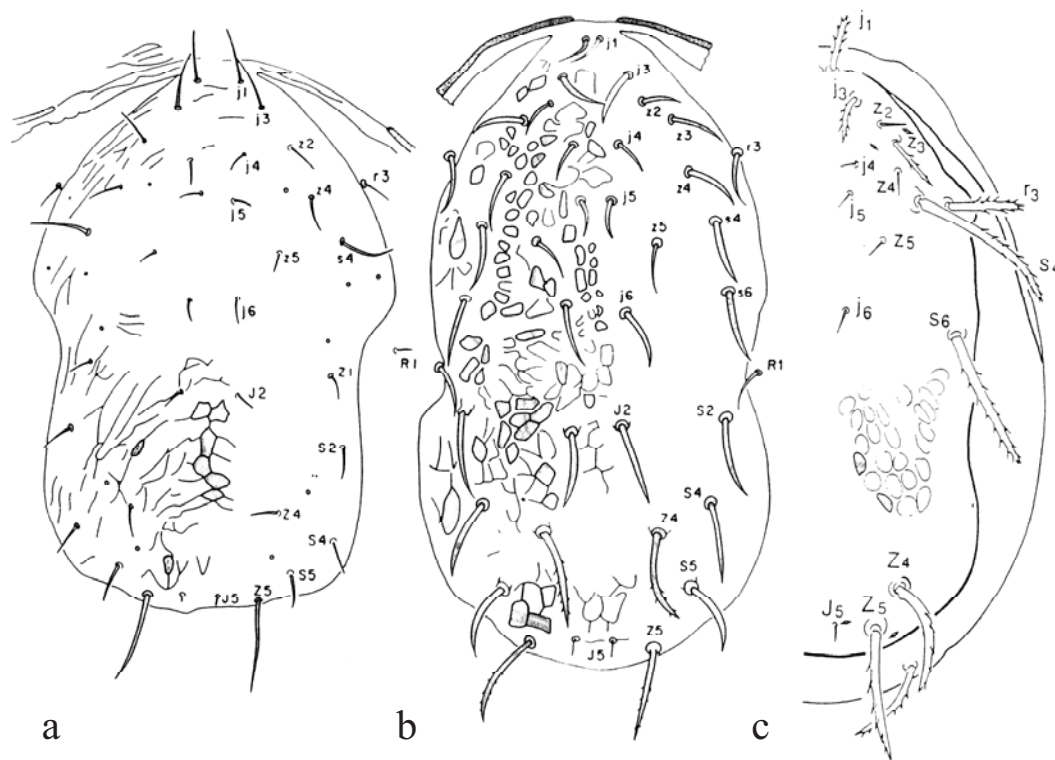


Figure 1. Chaetotaxie du bouclier dorsal des trois sous-familles : Amlyseiinae Muma (a) Phytoseiinae Berlese (b) et Typhlodrominae Scheuten (c) (Kreiter, 1991)

1.3. La morphologie externe et interne des espèces de la famille des Phytoseiidae

Les espèces de la famille Phytoseiidae possèdent un corps sclérotinisé et piriforme, de couleur blanchâtre à marron foncé (Krantz, 1978). La longueur moyenne du corps des femelles est de 300 µm, les mâles étant légèrement plus petits (Helle et Sabelis, 1985a ; Chant et McMurtry, 2007). Comme tous les acariens, leur corps est divisé en deux principales régions (Figure 1) : le gnathosoma (partie antérieure du corps qui porte les pièces buccales et les organes sensoriels associés à la bouche) et l'idiosoma (partie postérieure du corps qui porte les pattes).

I.3.1. Le gnathosoma

Cette partie du corps présente une double fonction de capture et d'ingestion des proies à laquelle sont associés les organes sensoriels du toucher, du goût et de l'odorat, située sur les pédipalpes et les pattes I (Helle et Sabelis, 1985a). Elle porte des palpes sensoriels, des chélicères et un stylophore présentant chacun une fonction bien précise :

- Les palpes sont sensoriels et permettent de détecter la nourriture.
- Les chélicères permettent de capturer et de maintenir les proies.
- Les stylets permettent de percer les téguments des proies.
- Les chélicères sont constituées d'un mors mobile et d'un mors fixe. Le premier porte quasiment toujours des dents (en nombre variable) et le second peut en être dépourvu (Figure 2). Le nombre de dents sur les chélicères de la femelle est souvent utilisé pour le diagnostic spécifique au sein de cette famille. Les chélicères du mâle portent un spermatodactyle (sur le mors mobile) qui permet le transfert du spermatophore du tractus génital mâle vers les voies génitales femelles (Amano et Chant, 1978 ; Chant, 1985b). La forme du spermatodactyle est parfois utilisée comme un caractère diagnostique.

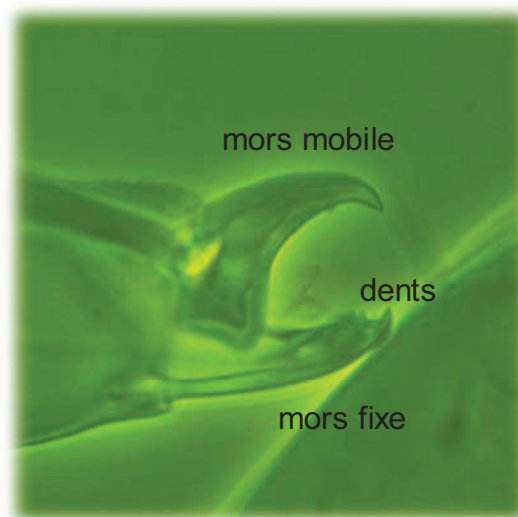


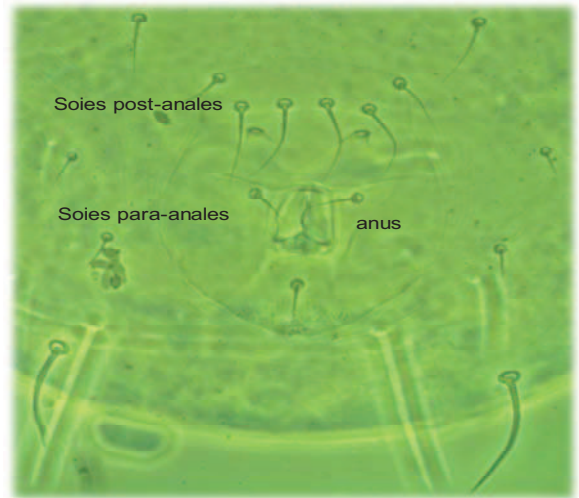
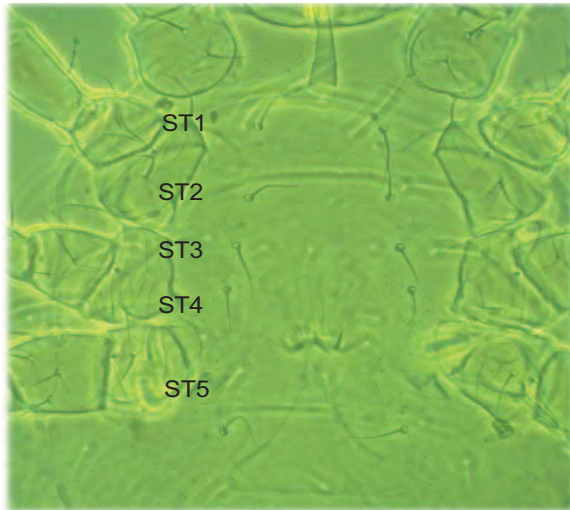
Figure 2. Morphologie des chélicères d'*Euseius gallicus* Kreiter et Tixier de la femelle (x 50) (photo réalisée au microscope optique à contraste de phase, Okassa 2010)

I.3.2. L'idiosoma

Cet organe porte les pattes, qui sont au nombre de quatre pour tous les stades mobiles, excepté pour la larve qui n'en présente que trois. Chaque patte est constituée de six segments et porte des soies et des macro-soies dont le nombre, la forme, la longueur et la position est variable. La chaetotaxie de certains segments des pattes II et III et les macrosoies, notamment celles de la patte IV a une valeur taxonomique (Evans, 1953).

Le tégument de l'idiosoma est protégé par le bouclier dorsal et plusieurs petits boucliers ventraux. Le bouclier **dorsal** (Figure 1) porte 14 à 23 paires de soies. La chaetotaxie (nombre et position des soies) de ce bouclier est l'un des éléments utilisés pour la sub-division en sous-familles et en genres (Chant et Yoshida-Shaul, 1989 ; Chant et McMurtry, 1994). Le système de nomenclature des soies le plus utilisé est celui attribué aux Gamasides par Lindquist et Evans (1965) et adapté à la famille des Phytoseiidae par Rowell *et al.* (1978). Ces soies dorsales sont rangées en quatre séries longitudinales, numérotées chacune en fonction de la métamérie des arthropodes et chacune d'entre elles est divisée en deux sous-séries. Celle du prodorsum est notée en lettre minuscule et celle de l'opisthosoma en lettre majuscule. L'idiosoma peut également présenter des solénostomes (ouvertures de glandes cuticulaires), des poroïdes (organes sensoriels) et des sigilles (traces d'insertions musculaires sur le tégument. Le nombre et la forme de l'ensemble de ces organes sont variables entre les différents genres et parfois même entre les espèces (Athias-Henriot, 1975). La face ventrale des femelles possède 3 boucliers: le bouclier sternal, le bouclier génital et le bouclier ventrianal (Figure 3a,b).

Le bouclier **sternal** présente deux ou trois paires de soies (ST1, ST2 et ST3). La quatrième paire de soies (ST4) est généralement insérée sur des petites plaques métasternales dans la partie postérieure du bouclier sternal ou est libre sur la membrane interscutale (Chant, 1985b). Le bouclier **génital** se trouve entre le bouclier sternal et ventrianal et porte une paire de soies (ST5). Le bouclier **ventrianal** est une fusion du bouclier ventral et anal, Il peut cependant être séparé pour quelques espèces.



a

b

Figure 3. Face ventrale d'une femelle adulte d'*Euseius gallicus* Kreiter et Tixier présentant les boucliers : sternal (a) et ventrianal (b) (x 40) et les soies qu'ils portent. (photos réalisées au microscope optique à contraste de phase, Okassa 2010)

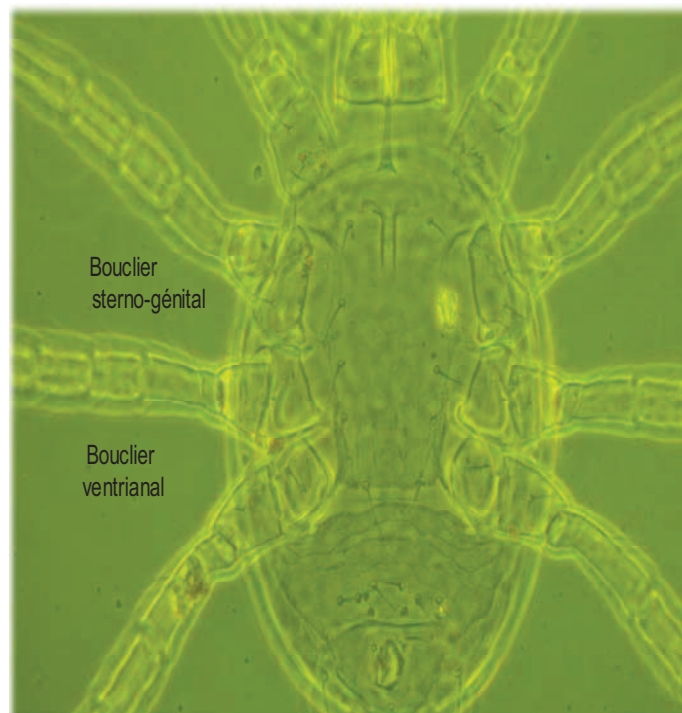


Figure 4. Face ventrale d'un mâle adulte d'*Euseius gallicus* Kreiter et Tixier présentant les deux boucliers sterno-génital et ventrianal (x20) (photo réalisée au microscope optique à contraste de phase, Okassa 2010).

Ce bouclier, parfois pourvu d'une paire de pores (poroïdes), présente des formes différentes et un nombre variable de soies préanales. Chez le mâle, les boucliers sternaux et génitaux sont fusionnés en un seul bouclier sternogénital (Figure 4). Enfin, une paire de plaques métapodales se situe sur le bord latéral au centre de la face ventrale.

Une paire de spermathèques appelée aussi appareil d'insémination femelle est située au niveau de la partie antérieure des coxae IV. La spermathèque est composée de plusieurs parties (Figure 5). La forme de cet organe peut être utilisée pour l'identification spécifique des Phytoseiidae (Athias-Henriot, 1968, 1969 ; Tixier *et al.*, 2006a).

La respiration se fait à partir de la cuticule ou par l'intermédiaire de la trachée qui possède une ouverture à la surface du corps au niveau d'une paire de stigmates respiratoires qui peuvent souvent avoir la forme de tube ou de goutte. Le système trachéen peut être positionné dorsalement, ventralement à la base antérieure des chélicères ou à la base des pattes pas chez les Phytoseiidae. La forme et la longueur du péritrème ont une valeur taxonomique.

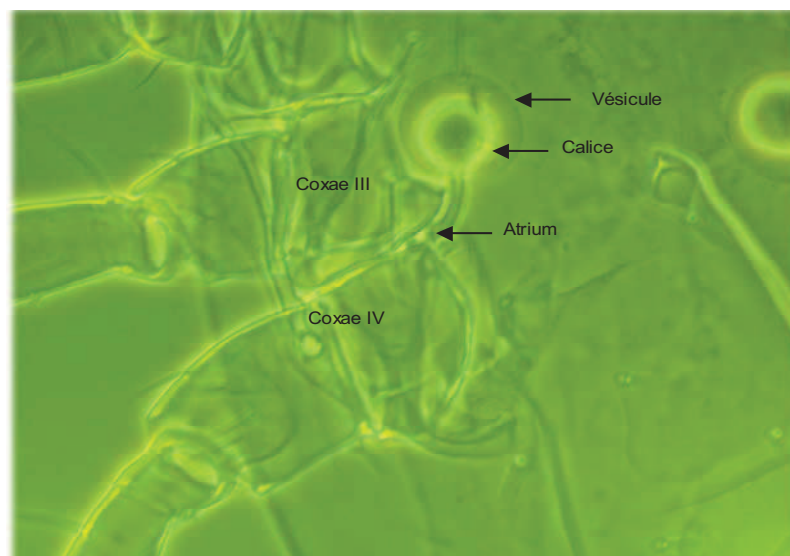


Figure 5. Spermathèque d'une femelle adulte d'*Euseius stipulatus* Kreiter et Tixier (x 40) montrant les différentes parties la constituant (photo réalisée au microscope optique à contraste de phase, Okassa, 2010).

I.4. Le cycle de développement

Les espèces de la famille des Phytoseiidae présentent quatre stades de développement avant le stade adulte (Figure 6) :

- ❖ L'œuf ovale de couleur blanche est collé par une substance adhésive à son substrat (souvent un poil de la feuille ou les fils de soies tissés par les proies) Durant le développement embryonnaire, l'œuf s'opacifie et sa coloration vire au jaunâtre puis à l'orangé. Ce stade est généralement sensible aux faibles hygrométries relatives, entre 70 et 100 % d'humidité relative sont généralement nécessaires pour permettre l'éclosion des œufs (Croft *et al.*, 1993 ; Castagnoli et Simoni, 1994).
- ❖ Au bout de quelques jours, l'œuf éclôt. Le stade larvaire hexapode apparaît. La durée de l'éclosion peut durer entre 2 et 15 minutes. Selon les espèces, les larves peuvent avoir une activité prédatrice, consommer du pollen (Takahashi et Chant, 1992) ou ne pas s'alimenter du tout (Furtado *et al.*, 2007).
- ❖ Deux stades nymphaux octopodes précèdent ensuite le stade adulte. Ils se différencient par la taille et par la couleur du tégument (la deutonymphe est généralement plus colorée que la protonymphe).

Les changements de stade s'opèrent après une mue qui dure en moyenne trente minutes, précédées dans certains cas par un stade inactif immobile de 10 heures. (Moraes et McMurtry, 1981 ; Sabelis 1985). Le temps de développement se répartit à peu près équitablement entre l'évolution embryonnaire et le développement des stades immatures et varie en fonction de la température, de l'hygrométrie et de l'alimentation. Le développement optimal de la plupart des espèces de Phytoseiidae se fait à des températures de 25°C et des humidités relativement élevées comprises entre 70 et 100 % (Ragusa, 1981).

La durée de développement peut varier entre 3 jours et 4 semaines lorsque les conditions sont défavorables. Les Phytoseiidae sont très sensibles à des humidités très élevées car les condensations peuvent entraîner leur noyade. Cependant, les œufs et les stades immatures semblent particulièrement sensibles aux faibles taux

d'hygrométrie (Sabelis, 1985 ; Moraes et McMurtry ; 1981, Badii et McMurtry, 1984). Il existe toutefois des différences très nettes entre les espèces. Dans les zones tempérées, la diapause a lieu au stade femelle fécondée ; contrairement aux zones tropicales où le développement est continu toute l'année.

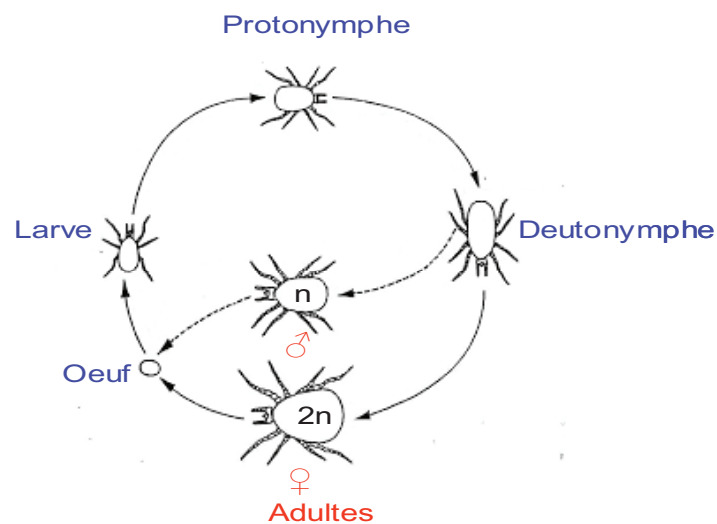


Figure 6. Cycle de développement des Phytoseiidae (Kreiter, 1991)

I.5. La Sex Ratio

Chez les espèces de la famille des Phytoseiidae, la sex-ratio est biaisé en faveur des femelles dans la plupart des cas (approximativement 1/3 de mâles et 2/3 de femelles). Cependant, chaque espèce a sa propre sex-ratio et celle-ci peut varier en fonction des conditions environnementales et des saisons (Chant, 1959 ; Helle et Sabelis, 1985).

I.6. Le mode de reproduction

Le système de reproduction est une pseudo-arrhénotoquie, par opposition à la parthénogenèse arrhénotoque stricte des tétranyques (Helle et Pijnacker, 1985b). L'accouplement est ainsi obligatoire et tous les œufs sont fécondés. L'accouplement a lieu entre des femelles diploïdes et des mâles haploïdes. L'haploïdie des mâles provient de l'inactivation des chromosomes paternels (selon un processus mal connu) (Schulten, 1985). Certaines espèces s'accouplent plusieurs fois durant la

période d'oviposition. L'accouplement s'effectue face ventrale contre face ventrale : le mâle utilise son spermatodactyle pour transférer un ou deux spermathophores dans les orifices copulateurs situés latéralement entre les coxae 3 et 4 de sa partenaire (spermathèque ou appareil d'insémination).

I.7. Le régime alimentaire

Chant et McMurtry (1997) ont classé les prédateurs en quatre catégories fonctionnelles selon leur préférence alimentaire.

Type I. Les prédateurs spécifiques du genre Tetranychus sp.

Ces espèces ne sont susceptibles de se développer qu'en consommant des proies appartenant aux espèces du genre *Tetranychus*. Elles sont caractérisées par un développement rapide et une fécondité très élevée. Elles appartiennent toutes au genre *Phytoseiulus* qui comprend quatre espèces (Chant et McMurtry, 1997). Les espèces de ce genre ont une taille relativement grande et sont caractérisées par la présence de très longues soies sur la partie centro-latérale du bouclier dorsal, leur permettant de se déplacer dans les toiles tissées par les espèces du genre *Tetranychus* sans y rester collées et mourir ainsi d'inanition (Sabelis et Bakker, 1992).

Type II. Les prédateurs spécialistes de la famille des Tetranychidae

Le développement de ces espèces est optimal lorsqu'elles consomment des proies appartenant à la famille des Tetranychidae. Elles sont caractérisées par des taux d'accroissement moyens, un développement rapide et une fécondité élevée à des niveaux cependant plus faibles de proies que les prédateurs de type I. Leur taille est généralement réduite et ils sont moins spécifiques que les prédateurs de type I. Il s'agit généralement d'espèces (une vingtaine) appartenant principalement aux genres *Galendromus* Muma et *Neoseiulus* Hughes avec quelques espèces du genre *Typhlodromus* (*Anthoseius*) Scheuten .

Type III. Les prédateurs généralistes polyphages

Ces espèces peuvent se développer en consommant différents types de proies (tétranyques, ériophydes, tydéides...) ainsi que du pollen, des insectes, du mycellium et des exsudats végétaux (Croft et McMurtry, 1997). Le taux d'accroissement de ces prédateurs varie de faible à moyen. La majorité des espèces de Phytoseiidae appartient à cette catégorie.

Type IV. Les prédateurs généralistes polliniphages

Le taux d'accroissement de ces espèces est souvent plus élevé quand elles consomment du pollen que des proies. La plupart, sinon toutes les espèces du genre *Euseius* (187 espèces décrites) , appartiennent à cette catégorie. Ceci ne signifie pas pour autant que certaines de ces espèces ne puissent pas contrôler efficacement les pullulations de certains ravageurs. C'est le cas par exemple de *Euseius finlandicus* Oudemans vis-à-vis de *Panonychus ulmi* Koch (Kostiainen et Hoy, 1994).

Pour toutes les espèces de Phytoseiidae, les tétranyques, les ériophydes et les ténuipalpides restent de façon générale les proies préférentielles. Les stades jeunes de la proie sont plus consommés que les adultes, à l'exception des mâles. Les préférences alimentaires peuvent varier en fonction de l'état de jeûne du prédateur. Enfin, la quantité de proies consommées varie beaucoup suivant l'âge du prédateur, les espèces et les conditions micro-climatiques

I.8. Les relations entre les Phytoseiidae et la plante substrat

Les Phytoseiidae appartiennent à la communauté des acariens planticoles. De nombreuses études ont montré les relations étroites entre certaines espèces de Phytoseiidae et le substrat végétal, aussi bien pour des espèces monophages comme par exemple *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot et *Phytoseiulus longipes* Evans Furtado *et al.*, 2007 que pour des espèces polyphages, comme par exemple *Kampimodromus aberrans* Oudemans (Kreiter *et al.*, 2002). Ces relations sont généralement liées à la structure foliaire directement (pilosité, présence de domaties) ou indirectement (rétention de pollen) (Kreiter *et al.*, 2002). La structure physique des feuilles influence en effet les conditions au niveau de la couche de la face inférieure des feuilles dans laquelle vivent les Phytoseiidae. Ils se rencontrent ainsi le plus souvent à proximité des nervures, notamment à l'aisselle de leurs ramifications. Ils y dissimulent leur ponte et y guettent leurs proies, y trouvent des conditions thermiques et hygrométriques favorables (Palevsky *et al.*, 2008) et une protection vis-à-vis de la compétition, de la prédation intra-gilde ou de la prédation des autres prédateurs. Ainsi, selon les préférences de développement, certaines espèces se

rencontrent sur des végétaux aux feuilles pileuses alors que d'autres se retrouvent préférentiellement sur des feuilles glabres, comme par exemple certaines espèces du genre *Euseius* ou *Amblyseius*.

Parallèlement au rôle de la structure physique des structures foliaires, certaines études ont également montré que des substances sémiochimiques pouvaient intervenir dans certains cas pour la reconnaissance de la plante hôte, infestée ou pas par les proies (Dicke, 1998 ; Kennedy, 2003 ; Simmons et Gurr, 2005).

I.9. Les capacités de dispersion des Phytoseiidae

La dispersion des Phytoseiidae peut se faire soit par voie aérienne, soit par voie ambulatoire ou soit par phorésie (transport par les animaux) (Sabelis et Dicke, 1985). Cette dispersion dépend des caractéristiques propres à chaque espèce et des conditions abiotiques (température, hygrométrie, luminosité) ou biotiques du milieu (rapport entre les ressources alimentaires disponibles et les exigences du prédateur) (Schausberger, 1998, Saha *et al.*, 2001). La dispersion par voie aérienne se fait par l'intermédiaire du vent et semble la principale voie de colonisation des agrosystèmes à partir des habitats les plus proches (Whalon et Croft, 1986 ; Tixier *et al.*, 1998, 2000a ; Jung et Croft, 2001). Hoy *et al.* (1985) ont constaté que la dispersion aérienne a lieu majoritairement entre 16 et 22 h, quand l'hygrométrie relative et la vitesse du vent sont élevées et la température est faible pour *Neoseiulus fallacis* (Garman) et *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt). De plus, certaines études ont mis en évidence qu'un manque de nourriture déclencherait une posture spécifique des femelles qui favoriserait le processus de transport de ces espèces par le vent (Auger *et al.*, 1999).

La dispersion par voie ambulatoire permet aux acariens prédateurs de se déplacer sur de faibles distances principalement au sein des parcelles cultivées. La dispersion ambulatoire peut parfois être gênée par les toiles de certaines proies ou par la pilosité des feuilles, réduisant l'efficacité de lutte biologique. Par exemple des espèces comme *Iphiseius degenerans* (Berlese) et *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans) ont des difficultés à traverser les réseaux de toiles de *T. urticae*.

I.10. Importance de l'expertise taxonomique pour la famille des Phytoseiidae

L'expertise taxonomique spécifique se définit comme l'identification, la description et la classification de spécimens au sein d'une même entité spécifique, qui est le taxon de base de la systématique. Chaque espèce présente ses propres attributs morphologiques (qui permettent le diagnostic) mais aussi bio-écologiques. Ces attributs bio-écologiques, comme la voracité, les capacités de développement, les préférences alimentaires et climatiques, déterminent l'efficacité de ces espèces dans les programmes de lutte biologique.

Dans ce paragraphe, nous nous attacherons à montrer l'importance de l'expertise taxonomique pour la lutte biologique. Une synthèse est présentée sur la figure 7. Pour cela, nous aborderons les grands principes des stratégies de lutte biologique dans lesquelles les Phytoseiidae sont utilisés.

La lutte biologique se définit comme une méthode qui utilise des auxiliaires naturels pour empêcher ou réduire les dégâts causés par les organismes nuisibles sur les cultures. Dans un contexte de préservation de l'environnement, la lutte biologique a pris une place de plus en plus importante dans les programmes de protection des cultures. Ceci explique en grande partie l'intérêt grandissant suscité pour les Phytoseiidae à partir des années 60. En effet, de nombreuses espèces de cette famille sont connues pour contrôler efficacement et biologiquement des espèces d'acariens ravageurs des cultures, appartenant principalement aux familles des Tetranychidae, Tenuipalpidae et Eriophyidae (McMurtry *et al.*, 1970 ; Kreiter et Brian, 1987 ; Chant et McMurtry, 1994 ; McMurtry et Croft, 1997).

On distingue trois types de lutte biologique (1) la « lutte biologique par conservation », qui a pour objectif de préserver les auxiliaires naturellement présents dans les agrosystèmes, (2) la lutte biologique par acclimatation, qui consiste à rechercher des auxiliaires dans les zones d'origine des ravageurs introduits non intentionnellement à partir d'un autre continent, (3) la lutte biologique par augmentation, qui consiste à réaliser des introductions répétitives (inondatives ou inoculatives) d'ennemis naturels.

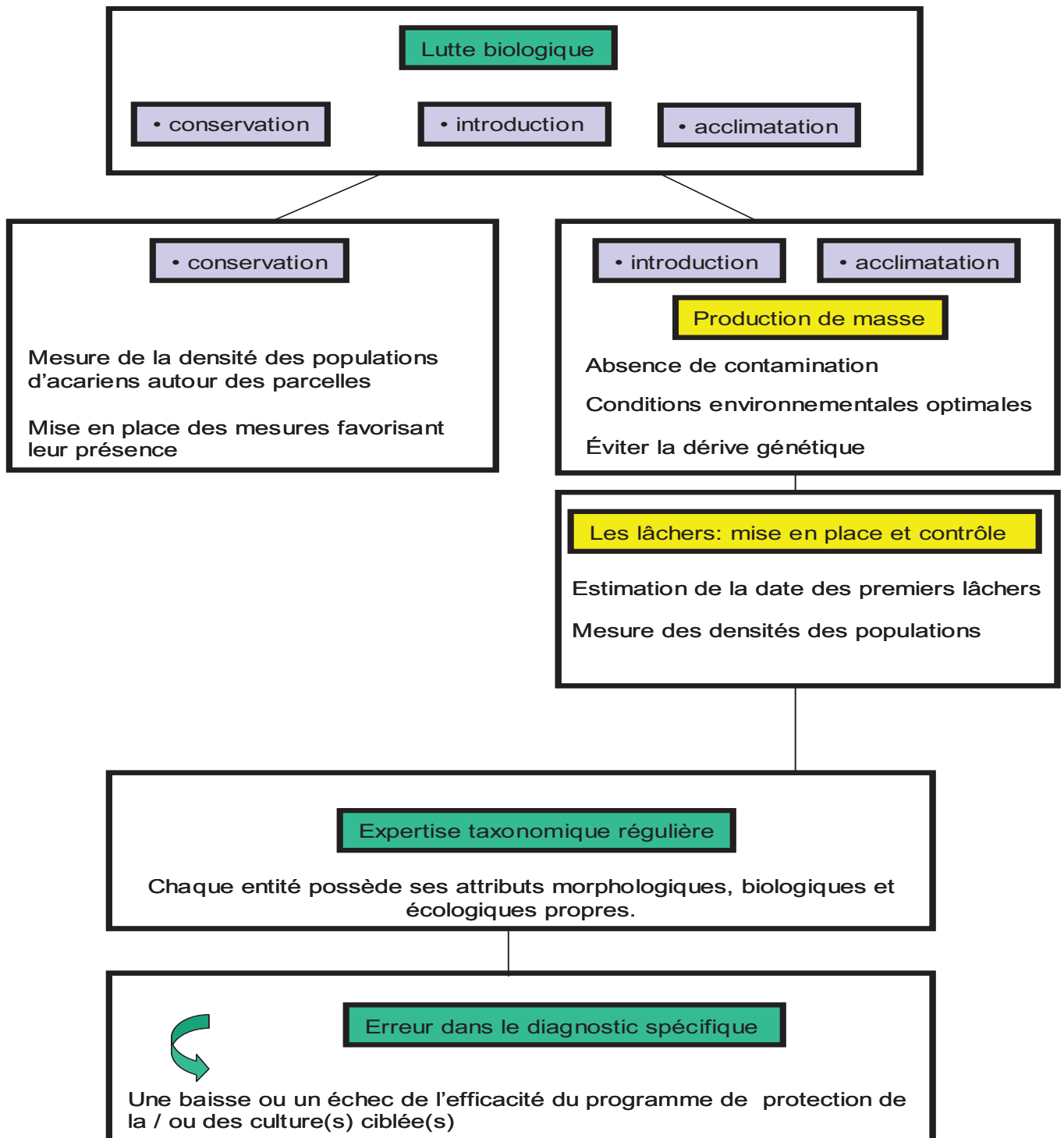


Figure 7. Importance de l'expertise taxonomique des Phytoseiidae dans le succès des programmes de lutte contre les espèces nuisibles des cultures.

I.10.1. La lutte biologique par conservation de la biodiversité

La biodiversité des zones non cultivées, adjacentes aux zones cultivées, est de plus en plus prise en considération. La présence d'auxiliaires dans les abords des parcelles peut en effet se substituer à l'utilisation des pesticides et éviter de plus les introductions artificielles d'auxiliaires, souvent coûteuses. Cependant, même s'il existe très peu de réels exemples de stratégies de lutte biologique par conservation utilisant ce type de prédateur (Croft *et al.*, 2004), plusieurs auteurs ont montré la présence des Phytoseiidae dans les zones non cultivées ainsi que l'influence de la végétation spontanée sur l'abondance et la diversité des Phytoseiidae dans les parcelles de vigne voisines (Kreiter *et al.*, 2000 ; Tixier *et al.*, 2000a,b ; Kreiter *et al.*, 2002 ; Duso *et al.*, 1993 ; Nicotina et Cioffi, 2000). Il est évident que la caractérisation de cette biodiversité est tout d'abord basée sur le diagnostic (expertise taxonomique) des espèces présentes. De plus, au-delà d'une connaissance descriptive, le diagnostic permet d'associer aux espèces rencontrées leurs attributs biologiques et d'en déduire leur importance pour le contrôle biologique des ravageurs présents dans les agrosystèmes étudiés.

Prenons l'exemple de deux espèces morphologiquement proches : *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus* Ragusa et *Typhlodromus (Typhlodromus) phialatus* Athias-Henriot, observées dans un même agrosystème, l'une dans les parcelles de vigne et l'autre dans les abords non cultivés de ces mêmes parcelles. Des croisements et des analyses moléculaires ont permis de montrer la validité de ces deux espèces, uniquement distinguables par la forme de la spermathèque (Tixier *et al.*, 2006a). Ce travail taxonomique est de première importance car une erreur dans la différenciation de ces deux espèces pourraient avoir des conséquences importantes sur le contrôle biologique, ces deux espèces ne vivant pas dans les mêmes milieux et ne présentant pas les mêmes préférences écologiques ni les mêmes performances biologiques (Meszaros *et al.*, 2007).

I.10.2. La lutte biologique par acclimatation

Cette stratégie consiste à importer des ennemis naturels de la zone d'origine du ravageur afin de lutter contre ce ravageur invasif. Ces introductions sont souvent coûteuses et l'acclimatation de ces ennemis naturels dans un nouvel écosystème

n'est pas garantie. Il existe cependant plusieurs cas où l'acclimatation d'espèces de Phytoseiidae introduites a été réussie.

L'exemple le plus significatif est celui de l'acarien vert du manioc *Mononychellus tanajoa* (Boundar), introduit accidentellement sur le continent africain dans les années 1970 à partir de l'Amérique du sud (Yaninek *et al.*, 1989). Pour limiter les dégâts causés par cette espèce nuisible, au début des années 1980, une recherche active d'ennemis naturels du ravageur a été effectuée dans son aire d'origine (Amérique du sud). La plupart des prospections ont été réalisées au Brésil et en Colombie. Une dizaine d'espèces d'acariens prédateurs a été collectée sur les plants de manioc et envoyée sur le continent africain pour une production de masse et des lâchers en pleins champs. Trois espèces prédatrices ont pu s'y établir : *Neoseiulus idaeus* Denmark et Muma au Bénin et au Kenya, *Typhlodromalus manohiti* Moraes au Bénin, au Bouroundi, au Ghana et au Niger et *Typhlodromalus aripo* De leon, qui s'est s'établi dans une vingtaine de pays et qui permet actuellement de lutter efficacement contre *M. tanajoa* (Yaninek et Hanna, 2003)

I.10.3. La lutte biologique par augmentation

Deux méthodes sont généralement utilisées dans la lutte biologique par augmentation: les lâchers inondatifs et les lâchers inoculatifs.

Dans les lâchers inondatifs, une grande quantité de prédateurs est introduite pour réguler des densités de proies importantes, alors que dans les lâchers inoculatifs, une petite quantité de prédateurs est introduite pour permettre une régulation à long terme et préventive des ravageurs. Les espèces appartenant au type I et II (McMurtry et Croft, 1997) sont utilisées dans des stratégies de lutte biologique par augmentation inondative à travers le monde notamment dans les cultures sous serre (Zhang, 2003) ou parfois en culture de plein champ comme sur fraisiers en Californie et en Floride (Croft *et al.*, 2004) pour contrôler des ravageurs tels que *T. urticae* et *Phytonemus pallidus* Banks. Au Brésil, Watanabe *et al.* (1994) ont démontré expérimentalement l'efficacité de lâchers inondatifs de deux espèces *Neoseiulus idaeus* et *Phytoseilus macropilis* Bank pour réduire les densités de *T. urticae*, dans des cultures de fraisier. Des espèces comme *N. cucumeris* et *I. degenerans* ont été également utilisées dans des stratégies de lutte biologique par augmentation inondative pour lutter contre les thrips en serre (Zhang, 2003). La réalisation de

lâchers inondatifs nécessite le développement d'un élevage de masse. Dans ce cadre, **toute contamination** pourrait altérer la qualité des élevages et/ou entraîner leur perte. La contamination des élevages peut être assez fréquente pour les Phytoseiidae, si des précautions ne sont pas prises, étant données leur petite taille et leur capacité de dispersion. Étant donné qu'il est impossible de distinguer une espèce d'une autre par une observation à la loupe binoculaire, ces contaminations sont difficiles à mettre en évidence. Or, plus les contaminations sont détectées tôt, plus il est facile de préserver les élevages. Ceci nécessite donc une vérification fréquente des espèces présentes dans les élevages, ce qui nécessite une expertise taxonomique importante.

Concernant la lutte biologique par augmentation inoculative, elle est souvent pratiquée avec les prédateurs de type III et IV (McMurtry et Croft, 1997). Ces prédateurs ont une action significative pour de faibles densités de proies et peuvent se maintenir durablement après les introductions même en absence de proies. De nombreuses études ont montré l'efficacité de différentes espèces comme *K. aberrans*, *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* Scheuten, *Euseius stipulatus* Athias-Henriot et *E. finlandicus* pour contrôler diverses espèces d'acariens phytophages dans les vergers et les vignobles (Marshall et Lester, 2001, Kreiter *et al.*, 2005 a,b).

Pour que le succès des programmes de lutte biologique utilisant des espèces de Phytoseiidae soit optimal, la connaissance de leur identité spécifique (et donc de leurs attributs biologiques et écologiques) s'avère être un préalable indispensable. Le diagnostic de ces espèces étant complexe et basé uniquement sur la taxonomie traditionnelle, nous nous attacherons dans ce travail de thèse à tenter de le fiabiliser et de déterminer dans quelle mesure il pourrait être accessible au plus grand nombre.

CHAPITRE II

A. LE DIAGNOSTIC SPECIFIQUE CHEZ LES PHYTOSEIIDAE

B. MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II. LE DIAGNOSTIC SPECIFIQUE CHEZ LES PHYTOSEIIDAE

PARTIE A - GENERALITES SUR LE CONCEPT D'ESPECE ET EXEMPLE D'APPLICATION CHEZ LES PHYTOSEIIDAE

II.A.1. Le concept d'espèce

L'espèce est l'unité fondamentale des études en systématique (Mayr, 1942). Son importance est cependant tout aussi grande dans toutes les autres disciplines de la biologie, pour lesquelles la détermination exacte de l'objet d'étude constitue un préalable indispensable à toute recherche. L'importante littérature consacrée au concept d'espèce montre toutefois que sa définition est sujette à de multiples controverses (Mayden, 1997, 1999 ; Wilson, 1999 ; Wheeler et Meier, 2000). Mayden recensait (1997) pas moins de 24 concepts différents d'espèce (Figure 8).

| Le concept d'espèce | |
|---------------------------------------|---|
| • Concept d'Agamospèce | • Concept morphologique de l'espèce |
| • Concept biologique de l'espèce | • Concept d'espèce non dimensionnel |
| • Concept cladistique de l'espèce | • Concept phénétique de l'espèce |
| • Concept d'espèce cohésive | • Concept phylogénétique de l'espèce (diagnosticable) |
| • Concept d'espèce composite | • Concept phylogénétique de l'espèce (monophylétique) |
| • Concept écologique de l'espèce | • Concept phylogénétique de l'espèce (monophylétique et diagnosticable) |
| • Unité significative évolutive | • Concept d'espèce polythétique |
| • Concept d'espèces évolutives | • Concept d'espèce de reconnaissance |
| • Concept de concordance généalogique | • Concept de compétition reproductif |
| • Concept d'espèce génétique | • Concept de succession de l'espèce |
| • Concept de cluster génotypique | • Concept taxonomique de l'espèce |
| • Concept d'espèces Hennigan | |
| • Concept intermodal de l'espèce | |

Mayden (1997)

Figure 8. Liste des différents concepts d'espèces d'après Mayden (1997)

Les problèmes liés à la définition de la notion d'espèce résultent de la difficulté à définir **les critères** qui caractérisent ces entités (De Queiroz, 1998). D'après Samadi et Barberousse (2005, 2006), la grande majorité des définitions du concept d'espèce est basée sur des critères se rattachant aux trois catégories suivantes :

- Les critères phénétiques.
- Les critères phylogénétiques.
- Le critère dit « biologique »

La définition de l'espèce proposée par Samadi et Barberousse (2005, 2006) utilise ces trois types de critères. Ces auteurs définissent l'espèce comme une branche du réseau généalogique, c'est à dire un fragment du réseau compris soit entre deux événements de spéciation, soit entre un événement de spéciation et un événement d'extinction (Figure 9).

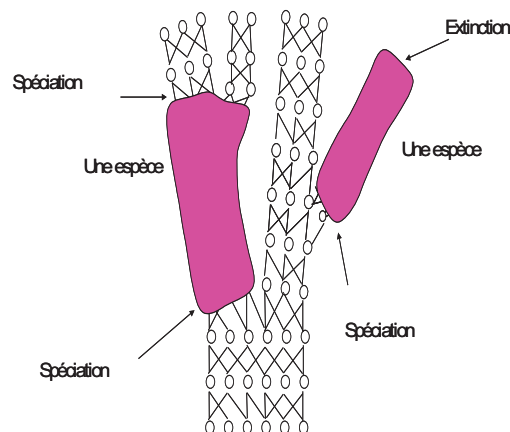



Figure 9. Représentation schématique de la notion d'espèce (Samadi et Barberousse, 2005, 2006)

Cette définition proche de celle donnée par Hennig (1966) considère que l'espèce est un ensemble d'organismes interféconds (réticulation) (Mayr, 1942) qui forment des lignées évolutives. Ces lignées sous l'effet de la dérive génétique et de la sélection naturelle accumulent des caractères particuliers induisant des différences phénétiques entre les espèces et l'acquisition **d'apomorphies** propres à chaque lignée. C'est l'accumulation de ces **caractères** au sein des lignées évolutives qui permettent de délimiter les différentes entités spécifiques. L'encadré 1 ci-dessus définit la notion de caractère associé à la distinction des entités spécifiques.


Encadré



Un **caractère**: attribut d'un organisme qui peut être décrit, représenté mesuré, pesé compté, dénombré et qui permet la communication entre biologistes s'intéressant à un même objet (Wiley, 1981).

Homologie: est la correspondance d'une partie d'un organe et d'une espèce avec une partie ou un organe d'une autre espèce correspondante mise en évidence, par la position relative et la connexion avec les autres parties du corps. Un caractère de deux ou plusieurs taxa est homologue lorsque ce caractère est rencontré dans l'ancêtre commun de ces taxons.

États de caractères



apomorphiques ou une apomorphie: états de caractère dérivés de l'ancêtre commun le plus proche.

pleisiomorphiques ou une pleisiomorphie états de caractère ancestrales (apparues anciennement).

Dans les paragraphes suivants, nous allons présenter les trois concepts les plus communément utilisés pour définir l'espèce et comment ces concepts se déclinent au sein de la famille des Phytoseiidae.

II.A.1.1 Le concept morphologique de l'espèce

II.A.1.1.1. Définition

Ce concept est le plus utilisé en systématique. Il se base sur l'utilisation des caractères morphologiques internes et externes des différents stades de développement. Les caractères morphologiques sont les attributs les plus directement et facilement observables. De ce fait, ils représentent le premier support de discrimination et de reconnaissance de formes vivantes différentes. Cain (1954) définit ainsi les morpho-espèces comme des espèces dont la description et l'identification sont essentiellement basés sur des caractères morphologiques.

La diagnose est établie sur la base de la valeur discriminante, décidée à priori, des critères morphologiques communs ou pas à plusieurs individus. Ce concept est basé sur une prédiction phénétique et ne tient pas compte de la notion **d'état primitif** ou **dérivé** d'un état de caractère. Trois grandes limites de l'application de ce concept peuvent être énoncées : (1) la difficulté de mettre en évidence des **espèces cryptiques**. (2) La difficulté de mettre en évidence des convergences évolutives car la similarité des états de caractères ne présume pas nécessairement d'une histoire évolutive commune (caractères **homoplasiques**). (3) **Le dimorphisme sexuel** qui peut conduire à des conclusions erronées.

Le concept morphologique de l'espèce implique une importante part de subjectivité. La valeur des caractères discriminants repose avant tout sur l'expérience du taxonomiste et a été que rarement éprouvée expérimentalement. La valeur de ces caractères est parfois remise en question lorsqu'une réévaluation des limites de la variation intra- et interspécifique est réalisée.

II.A.1.1.2. Le cas des Phytoseiidae

Le concept morphologique de l'espèce est le plus utilisé actuellement pour identifier et décrire les espèces de la famille des Phytoseiidae. Le diagnostic spécifique est essentiellement basé sur la chaetotaxie du dorsum et notamment sur la longueur des soies qu'il porte. Il a cependant été montré que ces longueurs varient parfois considérablement au sein d'une même espèce (Athias-Henriot, 1962 ; Tixier *et al.*, 2003b, 2006a,b, 2008a,b), et des chevauchements entre les variations intra- et interspécifiques ont été mis en évidence. De tels résultats remettent en question la valeur discriminatoire de ces caractères pour différencier les espèces de Phytoseiidae. Il a été montré par ailleurs que d'autres caractères, peu utilisés, car difficilement observables et directement dépendant de la qualité du montage des spécimens (forme de la spermathèque, nombre de dents sur les chélicères, nombre de solenostomes sur le bouclier dorsal) pouvaient avoir une valeur discriminante réelle entre deux entités spécifiques au sein de certains genres (Athias-Henriot, 1968, 1969 ; Ragusa et Tsolakis, 1994 ; Tixier *et al.*, 2006a)

II.A.2.1. Le concept biologique de l'espèce

II.A.2.1.1. Définition

Le critère d'interfécondité intra-lignée versus stérilité inter-lignée correspond au concept biologique de l'espèce défini par Mayr (1942). Dans son ouvrage «Systematics and the origin of species», Mayr (1942) définit l'espèce comme un groupe d'individus interféconds et incapables de se reproduire avec les individus d'une autre espèce.

Il existe différents mécanismes **d'isolements reproducteurs** qui empêchent les échanges génétiques entre les espèces. On distingue les mécanismes d'isolement **pré-zygotique** qui empêchent la formation de zygotes et les mécanismes d'isolement **post-zygotique** qui empêchent le fonctionnement normal des zygotes après leur formation. On peut citer trois exemples de mécanismes d'isolement prézygotique : (1) Les mécanismes qui **empêchent** la fusion des gamètes. Les gamètes mâles (spermatozoïdes) sont transférés dans les voies génitales femelles mais il n'y a pas de fécondation du fait soit d'une incompatibilité entre les gamètes (« gamete incompatibility ») (Palumbi et Metz, 1991 ; Byrne et Anderson, 1994 ; Vacquier *et al.*, 1995 ; Palumbi, 1998), soit du fait de l'incapacité des gamètes mâles à survivre dans le tractus génital d'une femelle appartenant à une autre espèce. (2) Les différences structurales des organes copulateurs (mâle ou femelle) entre les espèces provoquent un **isolement mécanique** qui empêche l'accouplement. (3) Les mécanismes **d'isolement écologique** qui font que des espèces ne se rencontrent qu'exceptionnellement (en sympatrie ou en allopatrie) (Rundle et Nosil, 2005 ; Seidel *et al.*, 2010).

Les isolements post-zygotiques peuvent être causés par des mécanismes génétiques qui vont empêcher **le développement embryonnaire normal du zygote**. Par exemple, le croisement entre une chèvre et un mouton produit habituellement des embryons qui meurent à un stade précoce de développement. Dans le cas de croisements entre une jument et un âne, ces embryons survivent donnant naissance à un animal viable (une mule) qui est, cependant, incapable de produire une descendance fertile. La formation d'hybrides non viables ou infertiles lors de croisements interspécifiques a été abordée plusieurs fois dans la littérature (Chen et Baltzer, 1975 ; McCartney *et al.*, 2000).

Le concept biologique de l'espèce fondé sur le critère de l'isolement sexuel peut être considéré comme bien supérieur au concept morphologique de l'espèce en tout cas sur le plan de l'objectivité scientifique. On notera cependant que l'hybridation accidentelle ou expérimentale altère quelque peu cette objectivité.

II.A.2.1.2. Le cas des Phytoseiidae

Ce concept a été utilisé pour valider le statut de certaines espèces de Phytoseiidae, lorsque des ambiguïtés existaient sur la validité des caractères morphologiques (Croft, 1970 ; Hoving et Croft, 1970 ; McMurtry *et al.*, 1976 ; McMurtry et Badii, 1989 ; Messing et Croft, 1991 ; Tixier *et al.*, 2006a,b, 2008a,b). Il existe cependant certaines limites à son application. Elles sont, dans un premier temps, liées au dispositif expérimental qui est long et fastidieux à mettre en œuvre, car il nécessite : (1) d'obtenir les spécimens vivants de chaque population / espèce étudiée, (2) d'élever ces populations / espèces dans un environnement contrôlé, ce qui n'est pas toujours facile du fait des contraintes liées à leurs caractéristiques biologiques (support de développement, alimentation ...).

En outre, Il arrive que les acariens soient parfois parasités par des bactéries comme celles du genre *Wolbachia* Hertig (Van Opijnen et Breeuwer, 1999 ; Gotoh *et al.*, 2005 ; Weeks *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2010), qui peuvent provoquer une incompatibilité cytoplasmique unidirectionnelle lorsque des femelles non infectées s'accouplent avec des mâles infectés (Johanowicz et Hoy, 1996). Ce type d'infection, si elle n'est pas détectée, peut conduire à des conclusions erronées sur le statut d'espèce. Les *Wolbachia* ont été détectées chez plusieurs espèces de Phytoseiidae (Schutte et Dicke, 2008). Noronha et Moraes (2004) ont suspecté les infections de *wolbachia* d'être responsables des incompatibilités partielles de reproduction entre plusieurs populations de *Euseius citrifolius* Denmark et Muma

II.A.3.1. Le concept phylogénétique de l'espèce

II.A.3.1.1. Définition

Ce concept a été développé par l'entomologiste Hennig dans les années 1960. Ce fondateur de la cladistique, considère que les seuls clades à retenir pour la classification sont les groupes monophylétiques, constitués de l'ancêtre commun le plus récent et de ses descendants. Dans ce concept, seuls les états de caractères

apomorphiques sont pris en considération (contrairement au concept morphologique de l'espèce basé sur une comparaison phénétique), c'est à dire les états de caractères nouveaux issus de l'ancêtre commun le plus proche. Le partage de ces caractères est ainsi supposé refléter l'histoire évolutive commune d'un ancêtre et de ses descendants et donc d'une espèce.

II.A.3.1.2. Le cas des Phytoseiidae

Au sein de la famille des Phytoseiidae, il existe très peu d'études phylogénétiques (Takahashi et Chant, 1993b ; Kanouh *et al.*, 2010a) et concernent des rangs taxonomiques supra-familiaux (Klompen, 2000, Klompen *et al.*, 2007). C'est une approche en plein devenir qui permettrait une définition plus objective des différents niveaux taxonomiques au sein de la famille des Phytoseiidae (espèce, genre, tribu, sous-famille).

II.A.2. Le barcode moléculaire : nouvel outil d'identification taxonomique ?

II.A.2.1. Définition et historique

Le barcode moléculaire est une méthode qui s'inspire du « Classifying Apparatus and Method ». Il a été développé par le « Universal Product Code » au début des années 1970 et standardisé en 2003 par Hebert et ses collaborateurs (Hebert *et al.*, 2003b). Il consiste en l'utilisation d'une courte séquence d'ADN pour identifier les individus au niveau spécifique comme le ferait un code barre pour identifier un produit commercialisé. Cette approche est présentée par ses défenseurs comme une méthode alternative à l'identification morphologique des espèces (Hebert et Gregory, 2005 ; Savolainen *et al.*, 2005 ; Vogler et Monaghan, 2007 ; Waugh, 2007). L'hypothèse de départ est basée sur le fait que pour un même fragment d'ADN universellement choisi au sein du vivant (un barcode moléculaire), la variation intraspécifique serait toujours inférieure à la variation interspécifique (Avisé *et al.*, 1987 ; Moore, 1995 ; Hebert *et al.*, 2003b). Pour poser les bases de ce postulat et établir le lien entre la notion d'espèce et la divergence moléculaire, Hebert *et al.* (2003b) se sont appuyés sur les travaux antérieurs conduits par Avisé et Johns (1999) et Avisé et Walker (1999).

Le paragraphe 2-4-1 sur la notion de seuil, abordera plus en détail les raisons qui ont amené Hebert *et al.* (2003a,b) à poser les bases de ce postulat.

II.A.2.2 Pourquoi utiliser le barcoding en Taxonomie ?

Le premier argument des défenseurs de cette méthode est le grand nombre de caractères moléculaires pris en compte (contrairement à la morphologie) pour aider à la délimitation des espèces. Chaque site nucléotidique présentant 4 états de caractères, l'amplification d'un fragment de 400 paires de bases (pb) permettrait d'obtenir 4^{400} combinaisons potentielles de caractères. Ceci présenterait l'avantage majeur, de mettre en évidence **des espèces cryptiques**, morphologiquement indifférenciées mais reproductivement isolées. De telles espèces sont très communes dans certains groupes taxonomiques. De plus, la grande plasticité phénotypique des caractères morphologiques à l'intérieur d'une même espèce peut parfois causer des erreurs dans l'identification des espèces (Vermeij, 1982 ; Palumbi, 1984 ; Russell, 1996 ; Fowler-Walker *et al.*, 2006 ; Leliaert *et al.*, 2009).

Le deuxième argument a trait à la possibilité d'identifier les stades immatures, qu'il est impossible de distinguer dans de nombreux groupes uniquement sur la base d'observations morphologiques. Pour les espèces de Phytoseiidae par exemple, l'identification spécifique est impossible aux stades œuf, larve et protonympe, et peu fiable, aux stades deutonympe et adulte mâle. Le barcode moléculaire présente l'avantage d'assigner un individu à une espèce donnée quel que soit son stade de développement, étant donné que les séquences d'ADN d'un individu sont identiques à tous ses stades de développement (Stoeckle, 2003 ; Blaxter, 2004 ; Hebert *et al.*, 2004b ; Paquin et Hedin, 2004 ; Barrett et Hebert, 2005 ; Miller *et al.*, 2005 ; Thomas *et al.*, 2005 ; Vences *et al.*, 2005a, b ; Ahrens *et al.*, 2007).

Le troisième argument est lié à la diminution drastique du nombre de taxonomistes dans un contexte de déclin accéléré de la biodiversité (Blackmore, 2002 ; Gewin, 2002 ; Mallet et Willmott, 2003 ; Wilson, 2003 ; Wheeler *et al.*, 2004). En considérant la disparition rapide des habitats, particulièrement dans les régions tropicales, les scientifiques ont estimé que près de 20 % de la biodiversité aura disparue au milieu du 21^{ème} siècle. Beaucoup d'espèces seront éteintes avant même d'être découvertes. Blaxter (2004) estime que seulement 10 % des espèces vivantes sont actuellement connues alors que leur nombre est estimé entre 10 et 15 millions (Wilson, 2003). Il est donc indispensable dans ce contexte de préserver l'expertise taxonomique encore existante et de perfectionner (démocratiser) les méthodes d'identification du vivant afin de faciliter et accélérer ce décompte. Dans ce contexte,

le barcode moléculaire a été proposé comme une méthode d'identification plus accessible et plus rapide que le diagnostic morphologique (Hebert *et al.*, 2004a,b ; Barrett et Hebert, 2005 ; Hajibabaei *et al.*, 2006a,b ; Evans *et al.*, 2007 ; Linares *et al.*, 2009). Elle nécessiterait en effet une expertise moins importante dans la mesure où les bases de données associant séquences d'ADN et noms d'espèces seraient correctement construites (Sperling, 2003 ; Moritz et Cicero, 2004 ; Will et Rubinoff, 2004 ; Hajibabaei *et al.*, 2006b ; Scheffer *et al.*, 2006).

II.A.3. Le choix du marqueur moléculaire

Une portion d'ADN correspondant à la fin de la région 5' du gène mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase I (COI) (658 paires de bases), a été choisie comme barcode moléculaire universel. La Cytochrome oxydase est une protéine trans-membranaire impliquée dans le cycle de Krebs. Elle est fortement conservée à travers les espèces qui emploient la phosphorylation oxydative dans leur métabolisme. Les amorces universelles (LCO1490 et LHCO2198) qui permettent l'amplification de ce fragment pour la majorité des Arthropodes sont les plus couramment utilisées (Folmer *et al.*, 1994 ; Zhang et Hewitt, 1997).

Outre la présence de ce gène dans toutes les espèces animales, les autres raisons qui ont conduit au choix de ce fragment comme barcode moléculaire universel (Hebert *et al.*, 2003) sont les suivantes :

1. Le gène choisi est **codant**. Il n'y a donc pas d'introns. De plus, il y a peu de délétions et d'insertions. De ce fait, les problèmes d'alignements des séquences et les analogies sont limitées.
2. Il existe **plusieurs copies** par cellule, ce qui facilite la phase d'amplification,
3. Il est communément admis que le couplage d'un mode de transmission maternel et d'un état haploïde font que le tri complet du polymorphisme ancestral sera plus rapidement atteint avec des gènes mitochondriaux qu'avec des gènes nucléaires, et permettra ainsi de visualiser plus rapidement des espèces par ces gènes (Hudson et Turelli, 2003). Le taux de mutation plus élevé de l'ADN mitochondrial comparativement à l'ADN nucléaire constitue un avantage à son utilisation comme marqueur moléculaire pour différencier des entités spécifiques (Brown *et al.*, 1979).

4. Enfin, la transmission maternelle garantit l'absence de recombinaisons entre les chromosomes maternels et paternels, ce qui permet de retracer plus aisément l'histoire évolutive d'une lignée sans les «interférences» des recombinaisons

II.A.4 Comment décider si deux individus appartiennent ou pas à une même espèce sur la base du barcoding ?

Le barcode moléculaire est basé sur la comparaison de séquences d'ADN. L'étape principale est de déterminer comment quantifier les divergences entre plusieurs individus / populations / espèces

II.A.4.1. La notion de seuil

La méthode la plus simple pour estimer une divergence génétique est de calculer le nombre de paires de bases différentes entre deux séquences. Certains auteurs (e.g. Avise *et al.*, 1987) ont mis en évidence une corrélation entre la divergence génétique et les isolements reproducteurs entre deux espèces. Il a été montré que 98 % de la variation intraspécifique (Cytb) de plusieurs espèces de vertébrés ne dépassait pas 2 % et que la divergence génétique était beaucoup plus élevée entre des espèces différentes (distance interspécifique) qu'à l'intérieur d'une même espèce (distance intraspécifique) (Moore, 1995 ; Johns et Avise, 1998 ; Avise et Walker, 1999).

De ce fait, de nombreux auteurs dont Hebert *et al.* (2003) ont proposé de baser la délimitation des espèces sur les différences existant entre les distances génétiques intra- et interspécifiques. Ils ont proposé un seuil de délimitation des espèces qui correspond à la distance génétique intraspécifique maximale. De même, de nombreux auteurs ont décidé de l'existence de plusieurs espèces, du fait de l'absence de chevauchements (ou « gaps ») entre les distances intra- et interspécifiques (Figure 10).

En supposant que les patrons d'évolutions de l'ADN mitochondrial soient identiques dans tous les groupes taxonomiques (Grant et Bowen, 1998 ; Hebert *et al.*, 2003a ; Hogg et Hebert, 2004). Hebert *et al.* (2003 , 2004a,b) ont proposé d'utiliser **un seuil unique** pour délimiter l'ensemble des espèces du vivant. Pour tester cette hypothèse au sein des invertébrés, Hebert *et al.* (2003) ont estimé les variations intra- et interspécifiques entre des séquences de COI de 200 espèces de Lépidoptères. La

valeur maximale des distances intraspécifiques obtenues ne dépassait pas 3 %, et plus de 98 % des individus ont pu être correctement assignés à la bonne espèce. Seules quatre espèces ont été mal classées du fait de faibles distances interspécifiques (0,6 et 2 %).

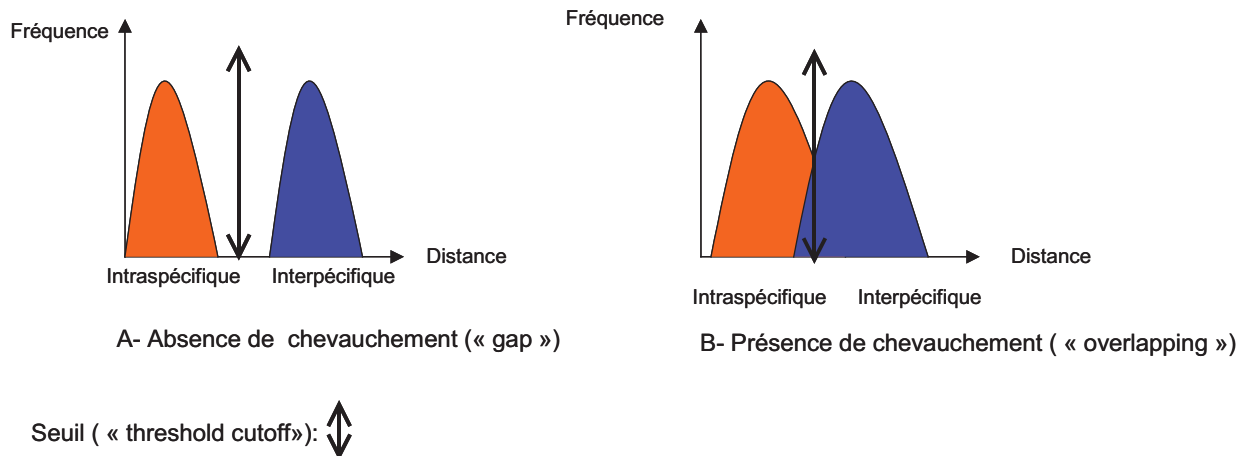


Figure 10. Schéma représentant les fréquences des distances génétiques à l'intérieur d'une espèce (intraspécifique) et entre des espèces (interspécifiques). Ces variations peuvent être chevauchantes (absence de « gap ») ou non chevauchantes (présence de « gap »).

Les distances intraspécifiques, observées par Hebert *et al.* (2003) dans cette étude, présentent des valeurs similaires à celles obtenues précédemment par Avise (1998, 1999) pour les vertébrés. Sur la base de l'ensemble de ces résultats, Hebert *et al.* (2003) ont proposé que la distance génétique moyenne entre deux espèces (distance interspécifique) était 10 fois supérieure à la distance génétique moyenne à l'intérieur de la même espèce (distance intraspécifique). Le facteur « 10 » représenterait le temps nécessaire à la fixation des allèles au sein de chaque lignée évolutive (spéciation).

Ce facteur « 10 » a été utilisé par Hebert *et al.* (2004a) lors d'une étude portant sur 260 espèces d'oiseaux d'Amérique du Nord. Un seuil de 2,7 % (moyenne intraspécifique X 10) a permis d'assigner correctement plus de 90 % des séquences aux espèces d'oiseaux étudiées et d'en découvrir quatre nouvelles. L'utilisation de cette même approche a permis de plus, de mettre en évidence un complexe d'espèces cryptiques (10 espèces au lieu d'une seule) au sein de l'espèce *Astrartes*

fuligator Walch (Hesperidae), en corrélation avec la famille de leurs plantes hôtes (Hebert *et al.*, 2004b).

L'utilisation de ce facteur « 10 » a permis dans certains groupes taxonomiques d'assigner correctement les séquences obtenues à l'espèce correspondante (Hebert *et al.*, 2004b ; Ward *et al.*, 2005 ; Hajibabaei *et al.*, 2006a ; Lefebure *et al.*, 2006). Cependant, cette méthode a suscité de nombreuses critiques (Moritz et Cicero, 2004 ; Rubinoff, 2005 ; Rubinoff *et al.*, 2006a,b). De nombreux auteurs pensent que la relation entre les distances génétiques et l'isolement reproducteur (donc l'espèce) n'est pas claire car des différenciations génétiques importantes peuvent exister, sans que cela n'implique pour autant une spéciation.

II.A.4.2 .Les analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques se déclinent selon deux types : (1) les méthodes de distances (phénétiques) et (2) les méthodes basées sur des hypothèses évolutives dans lesquelles on distingue la parcimonie et les méthodes probabilistes, comme le maximum de vraisemblance et l'inférence bayésienne.

► **Une méthode de reconstruction basée sur les distances : la méthode Neighbour Joining (NJ)** est la méthode de distance la plus utilisée (et une des plus anciennes) pour assigner un individu à une espèce (Hebert *et al.*, 2003, 2004a,b ; Wiemers et Fielder, 2007). Cette méthode est intéressante lorsque les divergences sont faibles. Cependant, même si la méthode NJ est relativement rapide, son principal défaut est que les différences observées entre les séquences ne reflètent pas exactement les distances évolutives. Des substitutions multiples sur le même site peuvent sous-estimer la vraie distance et faire que des séquences soient artificiellement proches (Holder et Lewis, 2003). De nombreux auteurs considèrent ainsi que cette méthode essentiellement phénétique serait inappropriée pour délimiter des espèces (Farris, 1981 ; Swofford, 1981 ; Penny, 1982 ; Farris, 1985 ; 1986 ; Steel *et al.*, 1988 ; Farris, 1990 ; Siebert, 1992 ; Farris *et al.*, 1996 ; Hillis, 1996 ; Swofford *et al.*, 1996 ; Will et Rubinoff, 2004 ; Rubinoff, 2006a). Austerlitz *et al.* (2009) qui ont étudié les performances de six méthodes de reconstruction pour délimiter des espèces au sein du genre *Astraptus* (12 espèces pour 466 spécimens), de la famille des Cypraeidae (249 espèces et sous espèces pour 2036 spécimens) et

une sous famille de Lépidoptères d'Amazonie (61 espèces pour 424 spécimens), ont cependant mis en évidence que la méthode NJ s'avère être aussi performante que le maximum de vraisemblance pour délimiter les espèces étudiées.

➤ **Des méthodes basées sur des critères optimaux (parcimonie et maximum de vraisemblance)**

Contrairement aux méthodes basées sur les distances, la parcimonie et le maximum de vraisemblance retracent l'histoire d'un gène sur un arbre.

Maximum de parcimonie. Cette méthode vise à reconstruire l'arbre phylogénétique le plus court, en minimisant le nombre de "pas" (mutations / substitutions) nécessaires pour expliquer les relations entre les taxa considérés. Cependant, cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée. Cette approche présente de plus l'inconvénient d'être sensible à l'attraction des longueurs de branches (Simmons *et al.*, 2004) qui conduit au regroupement des taxons, évoluant à la même vitesse, sans refléter véritablement leur lien de parenté. Il semble en fait que le maximum de parcimonie ne soit performant que lorsque les convergences évolutives sont rares. La méthode du maximum de vraisemblance a été utilisée dans des études sur le barcode moléculaire par exemple au sein des coléoptères Carabidae (Cardoso *et al.*, 2009) et des Phytoseiidae (Tixier *et al.*, 2006a, 2008a ; Kanouh *et al.*, 2010a,b).

Le Maximum de vraisemblance. Cette méthode a été développée pour faciliter l'interprétation des mutations multiples sur un même site. La vraisemblance d'un arbre phylogénétique est proportionnelle à la probabilité (P) d'observer des données (D) sous différentes hypothèses (les arbres T) qui rendent la vraisemblance L maximale. La vraisemblance des données s'exprime donc selon la probabilité suivante : $L(T) = P(D/T)$.

La vraisemblance n'est donc pas la probabilité que l'arbre soit vrai mais plutôt la probabilité que l'arbre reflète au mieux les données observées, selon un modèle prédéfini. Cette méthode permet d'appliquer différents modèles d'évolution et d'estimer la longueur des branches en fonction des changements évolutifs. En

revanche, c'est la méthode qui demande la plus grosse puissance de calcul et requiert le plus de temps.

Elle a été utilisée dans des études sur le barcode moléculaire par exemple au sein des Ephéméroptères Ephemelleridae (Alexander *et al.*, 2009), des Diptères Culicidae (Hemmerter *et al.*, 2009) et des Rongeurs Muridae (Pagès *et al.*, 2010).

L'Inférence Bayésienne : L'inférence bayésienne est proche de la méthode du maximum de vraisemblance. Elle demande une puissance de calcul élevée et permet de proposer des modèles d'évolution complexes. Elle calcule la probabilité d'obtenir une topologie d'arbre en fonction du nombre de topologies d'arbres possibles *a posteriori* et conserve celle qui est la plus probable. La probabilité *a posteriori* est estimée avec la chaîne de Markov par la méthode de Monte Carlo.

La difficulté majeure de ce type d'analyse est de déterminer si la chaîne de Markov a produit une approximation raisonnable de la distribution des probabilités *a posteriori* (Pickett et Randle, 2005). Les probabilités *a posteriori* ont tendance par ailleurs à surestimer la fiabilité des nœuds internes (Holder et Lewis, 2003).

II.A.4.3. Les méthodes basées sur la théorie de la coalescence

Ces méthodes font le lien entre la longueur des branches d'un arbre phylogénétique et la vitesse de spéciation (temps qu'il faut pour former des espèces) en lui appliquant une horloge moléculaire construit selon le maximum de vraisemblance afin de caractériser la localisation des nœuds correspondant à la formation des espèces, en appliquant un modèle mixte coalescent de formation des espèces (GMYCM ou « General Mixed Yule Coalescent Model »). En effet, les longueurs de branches entre les espèces (interspécifiques) sont déterminées par des taux de spéciation et d'extinction (Nee *et al.*, 1994) alors que les longueurs de branches à l'intérieur des espèces reflètent les processus de coalescence qui ont lieu au sein des populations (Wakeley, 2006).

Le GMYCM est une approche relativement récente, qui a été utilisée avec succès pour délimiter plusieurs espèces (Pons *et al.*, 2006, Ahrens *et al.*, 2007 ; Pagès *et al.*, 2010).

II.A.4.4. Les autres méthodes

La méthode CAOS (Characters Attributes Organization System), décrite par Sarkar *et al.* (2002), consiste à rechercher dans un premier temps des attributs caractéristiques et des combinaisons uniques d'états de caractères à l'aide de l'algorithme CAOS. Ceci suppose donc que les entités spécifiques soient bien identifiées comme telles. Les types d'attributs caractéristiques peuvent être purs (spécifiques d'un taxon) ou privés (spécifiques à certains membres d'un même taxon). Après avoir été identifiés, les attributs discriminants sont utilisés pour identifier des séquences inconnues et / ou pour construire une clé d'identification moléculaire dichotomique (sur la base de sites et séquences diagnostiques) (Rach *et al.*, 2008).

Certaines études se sont développées récemment pour associer des risques d'erreur d'identification en utilisant des données moléculaires, en intégrant pour certaines des aspects de génétique de populations (et démographiques) (Abdo et Golding, 2007 ; Nielsen et Matz, 2006 ; O'Meara, 2010). Ces approches visent à réduire les erreurs d'identification liées aux chevauchements entre les distances génétiques appartenant à deux espèces différentes ; et au contraire à la très bonne séparation (par les distances et les reconstructions phylogénétiques) d'individus appartenant à la même espèce.

II.A.5. Avantages et limites de l'approche barcode : chez les Arthropodes en général

- ❖ Les avancées dues à l'approche barcode moléculaire

L'analyse des séquences de COI a démontré son efficacité dans l'identification des espèces appartenant aux groupes taxonomiques suivants : Collembola (Hogg et Hebert, 2004), Lepidoptera (Hebert *et al.*, 2004a ; Hajibabaei *et al.*, 2006a), Ephemeroptera (Ball *et al.*, 2005), Araneae (Greenstone *et al.*, 2005), Hymenoptera (Smith *et al.*, 2005) et Crustacea (Costa *et al.*, 2007). Ces analyses ont permis d'identifier et de décrire de nouvelles espèces souvent cryptiques (Bucklin *et al.*, 2007 ; Pfenninger *et al.*, 2007 ; Tavares et Baker, 2008) et de différencier des

espèces morphologiquement proches (Hogg et Hebert, 2004 ; Van Velzen *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces travaux a permis clairement d'améliorer la fiabilité du diagnostic en testant la valeur discriminante des caractères communément utilisés pour identifier et décrire ces espèces.

Cependant, comme déjà évoqué précédemment, certaines limites du barcode moléculaire sont soulevées dans la littérature.

❖ Les limites de l'approche barcode moléculaire

▪ **Les pseudogènes**

Un pseudogène est une portion d'ADN mitochondrial qui s'intègre dans le noyau et qui n'est plus fonctionnel (Bensasson *et al.*, 2001). La première mise en évidence de pseudogènes au sein des métazoaires a été reportée pour *Locusta migratoria* (L.) (Orthoptera Acrididae) (Gellissen *et al.*, 1983). La présence de pseudogènes a été signalée de nombreuses fois au sein de plusieurs groupes d'eucaryotes (Bensasson *et al.*, 2001) mais les effets de l'amplification de ces séquences non fonctionnelles, dans les approches barcoding, n'ont été que très peu étudiées (Song *et al.*, 2008).

En effet, si cette intégration au niveau du génome nucléaire est assez ancienne, les amorces utilisées pour amplifier les séquences mitochondriales (séquences **orthologues** : dérivés du même ancêtre commun) peuvent également amplifier des séquences **paralogues**. L'amplification de ces dernières et leur utilisation se traduira par une surestimation du nombre d'espèces, liée à l'augmentation des divergences entre deux individus. Song *et al.* (2008) ont démontré en analysant deux jeux de données de séquences appartenant à quatre sous-familles d'Acrididae et à des espèces de crabes du genre *Orconectes*. Le jeu de données A était composé de séquences orthologues et de séquences paralogues (pseudogènes), tandis que le jeu de données B était uniquement composé de séquences orthologues. L'analyse des données a révélé l'existence de 17 espèces différentes dans le premier cas et six espèces dans le second. Pour éviter de telles erreurs, les auteurs préconisent donc : (1) de vérifier l'absence des codons stops dans les séquences obtenues et (2)

d'analyser le taux de pourcentage de AT qui est souvent faible dans les séquences paralogues (Benasson *et al.*, 2001 ; Song *et al.*, 2008).

- **Les bactéries endosymbiotiques**

Les α -protéobactéries du genre *Wolbachia* sont des organismes endosymbiotiques qui parasitent essentiellement les arthropodes (Jeyaprakash et Hoy, 2000) et les nématodes non parasites. Ces bactéries sont transmises verticalement à la génération suivante par l'intermédiaire des ovocytes dont le cytoplasme est infecté. Les *Wolbachia* entraînent une incompatibilité cytoplasmique lorsque des femelles saines s'accouplent avec des mâles infectés. Plusieurs études ont montré que la présence de ces organismes pouvait affecter la variation génétique et être à l'origine d'introgessions mitochondriales (Narita *et al.*, 2007).

- **Les règles de décisions : la notion de seuil unique**

En dépit du succès d'identification et de la mise en évidence d'espèces cryptiques dans de nombreux groupes taxonomiques (Hebert *et al.*, 2004 a,b ; Paquin et Hedin, 2004 ; Ward *et al.*, 2005 ; Hajibabae *et al.*, 2006a,b ; Lefébure *et al.*, 2006), de nombreux auteurs n'adhèrent pas à l'idée d'appliquer un seuil universel (distance génétique) pour séparer l'ensemble des espèces du règne animal. Selon eux, ce seuil n'aurait aucun fondement biologique (Ferguson, 2002 ; Rubinoff *et al.*, 2006a ; Wiemer et Fiedler, 2007).

Dans le cas des mollusques (Meyer et Paulay, 2005) et des amphibiens (Thomas *et al.*, 2005 ; Van der Meijden *et al.*, 2005 ; Vences *et al.*, 2005a,b), des chevauchements entre la variation intra- et interspécifique entre des espèces préalablement bien définies (et considérées comme valables selon une expertise taxonomique morphologique) ont été mis en évidence. De même, dans une étude réalisée sur 1995 espèces d'insectes, Virgilio *et al.* (2010) observent un chevauchement entre les distances intra- et interspécifiques. Le succès d'identification était ainsi inférieur à 70 % en appliquant un seuil unique. En revanche, lorsque un seuil différent était défini dans chacun des ordres considérés, le succès d'identification augmentait très fortement (95 %).

Il apparaît donc que lorsque les seuils sont mal fixés (variations intra- et interspécifiques mal délimitées) des **faux positifs** et des **faux négatifs** sont observés, remettant en cause la fiabilité de l'approche barcode moléculaire à délimiter les espèces (Nielsen et Matz, 2008). Ces erreurs peuvent être évitées par une meilleure caractérisation : (1) de l'étendue de la variation interspécifique des espèces étudiées.(2) De l'étendue de la variation intraspécifique d'une espèce en collectant un maximum de populations sur l'ensemble de de son aire de distribution géographique (Sperling, 2003 ; Will et Rubinoff, 2004 ; Frezal et Leblois, 2008 ; Austerlitz *et al.*, 2009).

Le choix du gène unique. Deux remarques essentielles concernant le choix du gène unique sont communément rencontrées dans la bibliographie.

La première remarque concerne l'utilisation d'**amorces universelles pour l'ensemble des espèces du vivant**, l'un des fondements de la standardisation du barcode. De nombreux problèmes techniques (absence d'amplification, mauvaise qualité des séquences amplifiées), liés à l'utilisation de ces amorces ont cependant été constatés dans plusieurs groupes. En conséquence, les amorces universelles ont été remplacées par des amorces spécifiques dans beaucoup d'études (e.g. Ward *et al.*, 2005 ; Ivanova *et al.*, 2007 ; Neigel *et al.*, 2007).

La deuxième remarque concerne la capacité du gène choisi (COI) à délimiter les espèces quelles que soient leurs positions taxonomiques (Lipscomb *et al.*, 2003 ; Mallet et Willmott, 2003 ; Tautz *et al.*, 2003 ; Moritz et Cicero, 2004 ; Rubinoff, 2005 ; Rubinoff *et al.*, 2006a,b). Un même gène peut en effet avoir une histoire évolutive différente (Avice, 2004) en fonction des taxa considérés. Pour pallier ce problème, certains auteurs préconisent l'utilisation de plusieurs marqueurs (approche multi-locus) pour mieux comprendre et représenter l'ensemble des processus évolutifs qui aboutissent à la formation des espèces (Funk et Omland, 2003 ; Austerlitz *et al.*, 2009).

Ces dernières limites ont mis en exergue la nécessité de développer une **taxonomie intégrative** (Dayrat, 2005 ; Will *et al.*, 2007 ; Valdecasas *et al.*, 2008 ; Padial *et al.*, 2010 ; Tan *et al.*, 2010) qui combine l'utilisation de plusieurs approches issues des différents concepts d'espèce afin de rendre plus fiable la délimitation spécifique.

II.A.6. Le Barcoding moléculaire et le diagnostic au sein de la famille des Phytoseiidae

Au vu de la plupart des résultats obtenus sur l'ensemble des arthropodes, le barcode moléculaire pourrait être une approche intéressante pour aider au diagnostic des espèces de la famille des Phytoseiidae, pour laquelle les difficultés d'identification ont été évoquées dans le §1-1-2 de ce chapitre. L'application de cette approche doit être préalablement étudiée, ceci fait l'objet de ce travail de thèse. Plus précisément :

Le **premier objectif** de ce travail est de déterminer si l'approche barcode moléculaire peut fiabiliser le diagnostic aux différents stades de développement des Phytoseiidae, particulièrement aux stades immatures et adultes (mâles) pour lesquels l'identification est impossible ou très peu fiable.

Le **second objectif** est la caractérisation des variations intra- et interspécifiques moléculaires et morphologiques de plusieurs espèces d'intérêts agronomiques. Cette caractérisation permettra de déterminer s'il est possible de mettre en place des règles de décision claires pour différencier les espèces de l'ensemble de la famille des Phytoseiidae (notion de seuil), en lien avec leurs caractéristiques morphologiques.

Dans la partie suivante, nous allons nous attacher à présenter les méthodologies utilisées.

CHAPITRE II. LE DIAGNOSTIC SPECIFIQUE AU SEIN DE LA FAMILLE DES PHYTOSEIIDAE

PARTIE B. MATERIEL ET METHODES

II.B.1. Echantillonnage

II.B.1.1. Liste des taxons étudiés

La famille des Phytoseiidae présente un intérêt agronomique important comme indiqué dans le chapitre I, car de nombreuses espèces sont prédatrices d'espèces nuisibles aux cultures (Helle et Sabelis, 1985a ; Kostianen et Hoy, 1996 ; McMurtry et Croft, 1997). Ainsi, une vingtaine d'espèces sont commercialisées à travers le monde (Zhang, 2003).

Le choix des espèces modèles pour ce travail de thèse est basé sur (1) leur importance en lutte biologique et (2) leur facilité d'échantillonnage. En plus de ces espèces modèles, nous nous sommes également intéressés à des espèces morphologiquement proches. L'ensemble des espèces et des populations étudiées est présenté dans le tableau I. Les espèces modèles sont indiquées en noir et les autres espèces en rose. Un total de 21 espèces, appartenant aux sous-familles des Amblyseiinae et des Typhlodrominae, a été étudié dans ce travail de thèse.

II.B.1.2. Lieux de collecte et méthodes de prélèvement des échantillons

Afin d'étudier des individus provenant le plus possible de l'ensemble de l'aire de distribution de chacune des espèces étudiées, des échantillonnages ont été réalisés dans différents sites en France et à l'étranger. Les lieux de collectes et les plantes supports sur lesquelles les individus ont été échantillonnés sont indiqués dans le tableau II.

Tableau II. Liste des populations de chaque espèce modèle et des espèces morphologiquement proches.

| Sous-famille | Genre | Sous-genre | Espèce | Pays | Localité | Plante support |
|----------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------------------------|
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Tunisie | Tozeur | <i>Convolvus arvensis</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Italie | Sicile | <i>Fragaria vesca</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Italie | Florence | <i>Fragaria vesca</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Chili | - | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Grèce | Thessaloniki | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Bresil | Piracicaba | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Chili | La cruz | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Japon | Ibaraki | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Elevage/ commercial | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | France | Mauguio | <i>Solanum melongena</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | France | Mandon | <i>Malus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | France | Midi pyrénéé | <i>Vitis</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Espagne | Valence | <i>Fragaria vesca</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Afrique du sud | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Corée | - | <i>Citrus reticulata</i> |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>californicus</i> | Etats-Unis | New york | <i>Malus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>picanus</i> | Italie | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | - | <i>picanus</i> | Argentine | - | <i>Sida</i> sp. |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | France | Mandon | <i>Celtis australis</i> |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | France | Mandon | <i>Ficus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | France | Mandon | <i>Quercus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | France | Pouzolle | <i>Quercus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | France | Pouzolle | <i>Vitis</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | France | Pouzolle | <i>Malus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | France | Marsillargues | <i>Malus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | Autriche | - | <i>Malus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | Croatie | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | Pologne | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>aberrans</i> | Italie | - | <i>Vitis</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>corylosus</i> | France | Marsillargues | <i>Malus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>corylosus</i> | France | Mercantour | <i>Corylus avellana</i> |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | - | <i>corylosus</i> | France | Mercantour | <i>Ulmus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>stipulatus</i> | France | Mandon | <i>Citrus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>stipulatus</i> | Espagne | Valence | <i>Citrus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>gallicus</i> | France | Mandon | <i>Tilia</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>gallicus</i> | France | Mandon | <i>Prunus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>gallicus</i> | France | Mandon | <i>Aesculus hippocatanum</i> |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>gallicus</i> | France | Mandon | <i>Viburnum</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>gallicus</i> | France | Bourgogne | - |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>gallicus</i> | France | Marsillargues | <i>Malus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>finlandicus</i> | France | Bourgogne | <i>Prunus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>finlandicus</i> | Hongrie | - | <i>Malus purpurea</i> |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>finlandicus</i> | Hongrie | - | <i>Aesculus hippocatanum</i> |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>finlandicus</i> | Hongrie | - | <i>Juglans nigra</i> |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>finlandicus</i> | Pologne | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>ovalis</i> | Elevage/commercial | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | - | <i>ovalis</i> | Pays-bas | - | <i>Ricinus communis</i> |
| Amblyseiinae | <i>Iphiseius</i> | - | <i>degenerans</i> | Italie | - | <i>Citrus</i> sp |
| Amblyseiinae | <i>Iphiseius</i> | - | <i>degenerans</i> | Kenya | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Iphiseius</i> | - | <i>degenerans</i> | Elevage/commercial | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>persimilis</i> | France | - | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>persimilis</i> | Italie | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>persimilis</i> | Tunisie | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>persimilis</i> | Angleterre | - | Elevage |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>persimilis</i> | Espagne | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>macropilis</i> | Argentine | - | Solanacea |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>macropilis</i> | Guadeloupe | - | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>longipes</i> | Argentine | Paso de Los Libres | Solanacea |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>longipes</i> | Chili | Los Andes | - |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>longipes</i> | Afrique du sud | Citrusdal | - |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>longipes</i> | Brésil | Urugaiana | Solanacea |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | - | <i>fragariae</i> | Argentine | - | Solanacea |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | France | Valleraugue | <i>Rubus</i> sp |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | France | Restinclières | <i>Vitis vinifera</i> |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | France | Mercantour | <i>Cornus sanguinea</i> |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | France | Bourgogne | - |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | Autriche | Vienne | <i>Malus</i> sp |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | Belgique | - | <i>Malus</i> sp |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | Pologne | - | - |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | Italie | - | <i>Vitis</i> sp |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | Etats-Unis | - | <i>Malus</i> sp |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | Hongrie | - | - |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>exhilaratus</i> | Italie | Toscane | <i>Vitis vinifera</i> |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>exhilaratus</i> | France | Restinclières | <i>Sorbus domestica</i> L. |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>phialatus</i> | France | Restinclières | <i>Sorbus domestica</i> L. |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Typhlodromus</i> | <i>athiasae</i> | Israël | - | <i>Citrus</i> sp |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Amblyseius</i> | <i>andersoni</i> | Pologne | - | - |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Amblyseius</i> | <i>andersoni</i> | France | Marsillargues | <i>Malus</i> sp |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>Amblyseius</i> | <i>andersoni</i> | Elevage/commercial | - | - |

Les spécimens ont été prélevés directement sur la plante support avec un pinceau, à l'aide d'une loupe binoculaire. Une partie des acariens a été conservée dans des tubes contenant de l'alcool à 70 % pour le montage entre lame et lamelle et l'autre dans des tubes contenant de l'alcool absolu (100 %) pour les analyses moléculaires. Pendant ce travail de thèse, des mesures morphométriques ont été effectuées sur près de 718 femelles. Le nombre de femelles analysées par espèce est indiqué dans le tableau II. Pour les analyses moléculaires, 441 individus ont été analysés ce qui nous a permis d'obtenir un total de 441 séquences avec le marqueur 12S ARNr ; 262 séquences avec le marqueur Cytb, 36 séquences avec le marqueur COI et 108 séquences avec le marqueur ITS (Tableau II). Le nombre d'individus étudiés et le nombre de séquences obtenues pour chaque espèce considérée sont présentés dans le tableau III.

Tableau III. Nombre d'individus mesurés et nombre de séquences obtenues en fonction de l'objectif de chaque étude par espèce

| Liste des espèces étudiées | Nombre de femelles mesurées | Nombre de caractères morphologiques considérés | Nombre de séquences obtenues | | | | Nombre de populations étudiées |
|---|-----------------------------|--|------------------------------|------|-----|-----|--------------------------------|
| | | | 12S | CYTB | COI | ITS | |
| Le diagnostic aux stades immatures et adultes mâles | | | | | | | |
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | - | - | 32 | 22 | - | - | 2 |
| <i>T. (T.) phialatus</i> | - | - | 5 | 5 | - | - | 1 |
| La différenciation d'espèces morphologiquement proches | | | | | | | |
| <i>E. stipulatus</i> | 25 | 34 | 6 | - | 4 | - | 2 |
| <i>E. gallicus</i> | 116 | 34 | 9 | - | 6 | - | 5 |
| <i>E. finlandicus</i> | 12 | - | 3 | - | 3 | - | 2 |
| <i>P. persimilis</i> | 29 | 32 | 49 | 24 | - | - | 5 |
| <i>P. macropilis</i> | 15 | 32 | 5 | 5 | - | - | 2 |
| <i>P. fragariae</i> | - | - | 5 | 5 | - | - | 1 |
| La mise en évidence d'espèces cryptiques au sein des Phytoseiidae | | | | | | | |
| <i>N. californicus</i> | 354 | 32 | 124 | 67 | - | 58 | 15 |
| <i>N. picanus</i> | - | - | 15 | 10 | - | 2 | 2 |
| <i>T. (T.) pyri</i> | 84 | 32 | 34 | 40 | 29 | 30 | 9 |
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | - | - | 5 | 5 | - | - | 1 |
| La distinction de quatre espèces appartenant au même genre | | | | | | | |
| <i>E. ovalis</i> | 15 | - | 13 | 9 | - | 9 | 2 |
| <i>E. stipulatus</i> | 25 | 34 | 9 | 3 | 4 | - | 2 |
| <i>E. gallicus</i> | 116 | 34 | 19 | 2 | 6 | - | 5 |
| <i>E. finlandicus</i> | 12 | - | 18 | 1 | - | - | 2 |
| La distinction de <i>I. degenerans</i> et de quatre espèces du genre <i>Euseius</i> | | | | | | | |
| <i>I. degenerans</i> | - | - | 23 | 13 | - | 7 | 4 |
| <i>E. ovalis</i> | 15 | - | 13 | 9 | - | 9 | 2 |
| <i>E. stipulatus</i> | 25 | 34 | 9 | 3 | 4 | - | 2 |
| <i>E. gallicus</i> | 116 | 34 | 19 | 2 | 6 | - | 5 |
| <i>E. finlandicus</i> | 12 | - | 18 | 1 | - | - | 2 |
| Résultats préliminaires sur la délimitation d'autres espèces d'intérêts agronomiques | | | | | | | |
| <i>K. aberrans</i> | 15 | 32 | 49 | 28 | 1 | - | 7 |
| <i>K. corylosus</i> | - | - | 4 | 4 | - | - | 2 |
| <i>A. andersoni</i> | - | - | 12 | 8 | - | 6 | 2 |
| <i>A. swirskii</i> | - | - | 5 | 5 | - | 4 | 2 |

II.B.2. Analyses moléculaires

II.B.2.1. Extraction de l'ADN

Deux protocoles d'extraction d'ADN, présentés en annexe 1 et 2, ont été utilisés : le protocole CTAB (Cethyl Trimethyl Amonium Bromide) et le kit d'extraction Qiagen avec le protocole « Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells » qui a été adapté du fait de la petite taille des acariens.

Le protocole CTAB requiert la destruction totale du spécimen, par un broyage à l'aide d'une loupe binoculaire.

Le protocole Qiagen, qui ne nécessite pas le broyage du spécimen, s'est avéré être plus simple et plus rapide à mettre en œuvre. Il permet l'extraction de l'ADN sans la destruction totale du spécimen, permettant ainsi de conserver les spécimens dont l'ADN a été extrait comme des « vouchers spécimens » (Tixier *et al.*, 2010, sous presse).

II.B.2.2. Evaluation de la quantité d'ADN extrait

La concentration et la qualité de l'ADN extrait ont été mesurées à l'aide du Spectrophotomètre NanoDrop 8000 (NanoDrop Technologies). La courbe d'absorbance obtenue permet de calculer la concentration de l'ADN extrait et fournit les rapports de densité optique qui déterminent la pureté de l'ADN.

L'ADN est caractérisé par un maximum d'absorbance à 260 nm. Ainsi, lorsque l'ADN est « pur », un pic net et très fin est obtenu à 260 nm. L'appréciation de la pureté d'un échantillon est mise en évidence par deux rapports de densité optique : (1) le rapport **260/280** : une valeur en dessous de 1,8 signifie que les résidus protéiques sont présents dans l'extrait d'ADN, tandis qu'une valeur plus élevée met en évidence une dégradation de cet extrait. (2) Le rapport **260/230** : lorsque sa valeur est comprise entre 1,8 et 2,2, l'échantillon est considéré comme ne contenant pas de résidus de type phénol ou chloroforme (Jeyaprakash et Hoy, 2010).

II.B.2.3. Gènes utilisés et protocoles d'amplification de l'ADN

Afin de déterminer la pertinence des approches moléculaires pour fiabiliser le diagnostic, plusieurs gènes ont été étudiés. Comme cela a été dit dans la première partie de ce chapitre, le gène COI a été choisi comme barcode moléculaire de

référence (Hebert *et al.*, 2003a,b). C'est la raison pour laquelle nous avons commencé par étudier ce fragment au début de ce travail de thèse. Cependant, au vu des difficultés rencontrées lors de son amplification, deux autres marqueurs mitochondriaux ont été testés: 12S ARNr et Cytb.

En plus de l'étude de la pertinence des marqueurs mitochondriaux pour le diagnostic spécifique, nous avons également étudié celle d'un marqueur nucléaire. En effet, dans la littérature, des incongruences entre les résultats observés avec les marqueurs mitochondriaux et les marqueurs nucléaires ont été observées dans plusieurs études (Sota et Vogler, 2001 ; Tosi *et al.*, 2002, 2003, 2004 ; Rubinoff *et al.*, 2006a,b).

II.B.2.3.1. Les gènes mitochondriaux

L'ADN mitochondrial des arthropodes est composé de deux gènes ribosomiaux (ARNr) (codant pour les sous-unités 12S et 16S), de 22 ARNs de transfert (ARNt) et de 13 gènes protéiques (Figure 9) qui codent pour des enzymes qui interviennent dans le transport des électrons ou la synthèse de l'ATP (Anderson *et al.*, 1981 ; Chomyn *et al.*, 1986). Les portions des gènes étudiés sont indiquées par des flèches sur la figure 11.

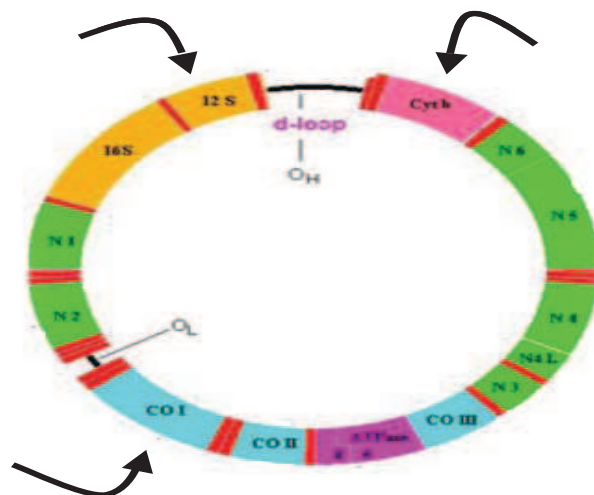


Figure 11. Localisation des gènes de l'ADN mitochondrial au sein de la plupart des arthropodes (Simon *et al.*, 1994)

❖ Le gène 12S ARNr

Chaque ribosome est composé de deux sous-unités (la grande et la petite) constituées chacune d'ARNr et de protéines.

Ces deux sous-unités s'assemblent pour former un ribosome fonctionnel, qui se fixe à l'ARN messager lors de la transcription de l'information codante contenue dans l'ADN du noyau (Simon *et al.*, 1994). On peut noter également que les ARN ribosomiaux ont une structure secondaire en forme de boucle qui est remarquablement conservée (Simon *et al.*, 1994).

Le marqueur 12S ARNr a été utilisé pour résoudre plusieurs questions taxonomiques au sein des acariens : dans des analyses phylogénétiques au sein des Ixodidae (Murell *et al.*, 1999 ; Nooris *et al.*, 1999), des Phytoseiidae (Kanouh *et al.*, 2010a,b), dans des études sur la variation génétique des espèces et des populations au sein des Sarcopitidae (Skerratt *et al.*, 2002), dans des études concernant le diagnostic moléculaire au sein de la famille des Phytoseiidae (Jeyaprakash et Hoy, 2002 ; Tixier *et al.*, 2010) et des Ixodidae (Casati *et al.*, 2008).

❖ Le gène COI

Ce gène code pour la sous unité 1 de la cytochrome oxydase, qui est une enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire (voir partie A de ce chapitre).

Le gène COI a été très utilisé (et continue à l'être) dans de nombreuses études sur les acariens et cela bien avant le développement du barcode moléculaire (Hebert *et al.*, 2003). Ce marqueur a été utilisé dans des études portant sur la variation génétique des espèces et des populations au sein des Tetranychidae (Navajas *et al.*, 1996, 1999 ; Navajas et Fenton, 2000 ; Toda *et al.*, 2000 ; Hinomoto *et al.*, 2001a,b), des Phytoseiidae (Tixier *et al.*, 2006a), des Varroidae (Warrit *et al.*, 2006), des Sarcopitidae (Walton *et al.*, 2004), des Ixodidae (Murell *et al.*, 2000 ; Casati *et al.*, 2007) et des Tenuipalpidae (Rodrigues *et al.*, 2004), et dans des études portant sur les analyses phylogénétiques au sein des Tetranychidae (Gotoh *et al.*, 2009 ; Ito *et al.*, 2009) , des Trombidiidae, des Johnstonianidae, des Calyptostomatoidea, des Smarididae, des Erythraeidae, des Microtombidiidae, des Thyasidae (Söller, 2001), des Steganacaridae (Salomone *et al.*, 2002), des Scutoverticidae (Schaëffer *et al.*,

2008, 2010), des Penthaledidae (Stevens et Hoggs, 2006 ; Mitani *et al.*, 2007) et des Dermanyssidae (Marangi *et al.*, 2009).

❖ Le gène Cytb

C'est un gène qui code pour la sous unité b de la cytochrome oxydase, qui est une enzyme également impliquée (comme la COI) dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. L'utilisation de ce marqueur est relativement récente au sein des acariens. Il a été utilisé dans des études portant sur la variation intraspécifique au sein des Ixodidae (Casati *et al.*, 2008) et des Tetranychidae (Navajas *et al.*, 2010), et dans des analyses phylogénétiques au sein des Phytoseiidae (Kanouh *et al.*, 2010a,b).

II.B.2.3.2. Le gène nucléaire ITS

Parallèlement aux fragments mitochondriaux, nous nous sommes également intéressés à un fragment nucléaire : le fragment ITS ou « Internal Transcribed Spacer », qui contient les régions ITS1- 5.8S - ITS2.

La présence des régions flanquantes conservées (18S et 28S) aux deux extrémités 5' et 3' facilite la définition des amorces qui permettent l'amplification des régions ITS1 et ITS2.

Au sein des acariens, le fragment ITS a été utilisé dans des études portant sur la variation génétique des espèces et des populations au sein des Ixodidae (Wesson *et al.*, 1993), des Phytoseiidae (Navajas *et al.*, 1999 ; Yli-Mattila *et al.*, 2000 ; Ramadan *et al.*, 2004 ; Tixier *et al.*, 2006a) et des Psoroptidae (Essig *et al.*, 1999), dans des études sur l'histoire de la colonisation d'une espèce au sein de la famille des Eriophyidae (Navia *et al.*, 2005) et enfin dans des études phylogénétiques au sein des Phytoseiidae (Kanouh *et al.*, 2010a,b), des Psoroptidae (Ramey *et al.*, 2000) et des Rhinonyssidae (Morelli et Spicer, 2007).

II.B.2.4. Les protocoles d'amplifications

Les différents protocoles d'amplification utilisés dans ce travail de thèse sont présentés en annexe 3 pour chacun des marqueurs moléculaires considérés. Ces protocoles suivent toutes les différentes étapes de la PCR (réaction en chaîne par

polymérisation) classique. La réplication de l'ADN double brin se fait en trois étapes principales (1) L'étape de dénaturation qui permet de séparer l'ADN double brin en ADN simple brin (2) l'étape d'hybridation qui permet l'amplification sélective du fragment avec des amorces spécifiques et enfin (3) l'étape d'élongation qui permet la synthèse des brins à partir des amorces hybridées. Entre 30 et 40 cycles ont été nécessaires pour amplifier les fragments étudiés. Avant le début et à la fin de l'ensemble des cycles effectués, une étape de dénaturation initiale et d'extension finale est réalisée.

II.B.2.5. Les difficultés rencontrées

Des difficultés ont été rencontrées durant l'étape d'amplification de certains fragments, notamment au début de ce travail de thèse. Ces difficultés se traduisaient surtout par (1) une absence d'amplicons ou un faible taux d'amplification (2) une mauvaise qualité des produits amplifiés (bandes au signal faible). Afin d'améliorer l'amplification de ces fragments, une phase d'optimisation des protocoles d'amplification a été nécessaire, notamment pour les marqueurs COI, Cytb et ITS.

❖ Pour le marqueur COI

Pour ce marqueur, trois couples d'amorces ont été testés : les amorces proposées par Navajas *et al.* (1994) définies pour des espèces d'acariens appartenant à la famille des Tetranychidae, les amorces universelles proposées par Folmer *et al.* (1994), Zhang et Hewitt (1997) et Hebert *et al.* (2003a,b), et enfin les amorces proposées par Cœur d'acier *et al.* (communication personnelle), définies pour des espèces de pucerons de la famille des Aphidae.

Le couple d'amorces proposé par Navajas *et al.* (1994) a été utilisé dans des études précédentes portant sur les Phytoseiidae (Tixier *et al.*, 2006a, 2008a). Dans ces travaux, le nombre d'individus étudiés ne dépassait pas sept. Lorsque nous avons utilisé ce couple d'amorces sur un nombre d'individus plus important (>20), les difficultés suivantes ont été observées :

- Une absence de répétitivité dans l'amplification des spécimens
- Un signal faible des produits PCR amplifiés

Pour les produits PCR amplifiés, un échec élevé de l'étape de séquençage du fait de la présence de bandes multiples.

Suite à ces difficultés, les deux autres couples d'amorces cités précédemment ont été testés et les mêmes problèmes ont été rencontrés.

Pour limiter ces problèmes, apparemment non liés aux couples d'amorces, les conditions des PCR ont donc été modifiées, en : (1) augmentant la durée de la dénaturation initiale afin de mieux séparer l'ADN double brin, (2) réduisant la durée de l'étape d'hybridation afin de limiter l'amplification de bandes aspécifiques et enfin, (3) en diminuant la concentration des amorces dans le volume final. En effet, une trop forte concentration d'amorces peut rendre plus difficile l'étape de purification des produits PCR et limiter le rendement de la réaction de séquence.

Après une longue phase d'optimisation avec les trois couples d'amorces, ce sont les amorces proposées par Cœur d'acier et *al.* (communication personnelle) qui ont été retenues du fait d'un meilleur taux d'amplification et d'une meilleure qualité des séquences obtenues.

La qualité des résultats obtenue pour les Phytoseiidae étaient sûrement dus au fait que ces amorces soient dégénérées. En effet, les Aphidae sont de toute évidence taxonomiquement plus éloignés des Phytoseiidae que ne le sont les Tetranychidae.

❖ **Pour le marqueur Cytb**

La principale difficulté était liée au faible taux d'amplification des produits PCR (inférieur à 20 %). Pour pallier ce problème, les conditions de la PCR ont été modifiées par l'ajout dans le mélange ou « mix » PCR de $MgCl_2$, ce qui a permis d'augmenter significativement le taux d'amplification (supérieur à 90 %).

En effet, l'ion Mg^{++} est tout d'abord un co-facteur essentiel de la Taq polymérase, enzyme qui a besoin de cation bivalent pour être active. Il permet de plus de stabiliser l'hybridation entre les amorces et l'ADN matriciel interagissant avec les charges négatives de l'ADN, limitant ainsi les forces de répulsions entre ces deux brins d'ADN.

❖ Pour le marqueur ITS

Un seul couple d'amorce, proposé par Navajas *et al.* (1999) et défini pour des espèces de la famille des Tetranychidae, a été utilisé pour amplifier ce fragment.

Les difficultés rencontrées pour l'amplification de ce gène étaient (1) un taux d'amplification relativement faible et (2) la présence de bandes aspécifiques. Pour pallier ces difficultés, les conditions de la PCR ont été modifiées par l'ajout dans le mélange ou « mix » PCR de BSA (Bovine Serum Albumine) qui a la propriété de dénaturer les matrices d'ADN riches en bases Guanine et Cytosine. Quatre concentrations différentes ont été testées : 0,2 mg/ml ; 0,4 mg/ml 0,6 mg/ml et 0,8 mg/ml. Les meilleurs résultats ont été obtenus à une concentration de 0,8 mg/ml. De plus, la présence de bandes aspécifiques a été éliminée en réduisant le nombre de cycles total de la réaction PCR (30 cycles au lieu de 35 cycles).

II.B.2.6. Obtention des séquences

II.B.6.1. Le séquençage

Le séquençage a été réalisé dans deux laboratoires spécialisés dans le séquençage automatisé qui sont (1) la société MacroGen, et (2) la plateforme séquençage – génotypage à l'IFR119 "Montpellier Environnement Biodiversité".

Dans les deux cas, la méthode de séquençage utilisée est celle de Sanger. Dans le premier cas, le séquençage a été réalisé avec l'appareil ABI3730XL et dans le deuxième cas avec l'appareil CEQ 2000XL (Beckman coulter).

II.B.6.2. La correction des séquences

La correction des séquences a été réalisée manuellement avec deux logiciels: MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2008) et Geneious pro 3.5.4 (Drummond *et al.*, 2007).

Le préalable requis avant toute correction était l'observation de l'intensité des pics des chromatogrammes. Les séquences dont les chromatogrammes (séquences « forward » et « reverse ») présentaient un bruit de fond élevé n'ont pas été analysées afin de limiter les erreurs. Pour ces spécimens, les étapes d'amplification et de séquençage ont donc été recommencées.

II.B.6.3. Le contrôle de la qualité de la séquence amplifiée

Une fois la séquence « nettoyée », nous nous sommes assurés que (1) la séquence du spécimen amplifiée appartenait bien à la famille des Phytoseiidae et (2) la séquence amplifiée n'était pas un pseudogène.

II.B.6.3.1. Absence de contaminations

Cette vérification a consisté à réaliser un « blast » (basic local alignment search tool) de la séquence obtenue (« query séquence ») dans la base de donnée Genbank (Nucleic Acid Research, 2008) qui comprend près de 108 millions de séquences enregistrées pour près de 300 000 espèces. Pour les Mésostigmates 1261 séquences sont répertoriées, parmi lesquelles 313 séquences correspondent à 33 espèces de la famille des Phytoseiidae.

II.B.6.3.2. Absence de pseudogènes

Nous avons vérifié que les séquences amplifiées ne sont pas des séquences paralogues (pseudo-gènes) à l'aide du logiciel Mega (Tamura *et al.*, 2007). Cette étape a consisté à : (1) s'assurer de l'absence de codons stop sur le premier, deuxième et troisième cadre de lecture de la séquence d'ADN traduite en protéine, et (2) étudier la composition nucléotidique des séquences, particulièrement du pourcentage de AT qui est supposé être faible au sein des séquences pseudo-gènes (Benasson *et al.*, 2001 ; Song *et al.*, 2008).

II.B.2.7. Analyse des séquences

Dans un premier temps, une matrice de distance a été construite afin de visualiser le pourcentage de divergence génétique entre les différents taxa considérés (que ce soit au niveau intra et/ou interspécifique). Ces variations seront représentées dans la partie résultat sous la forme de boîtes à moustache ou d'histogrammes, notamment pour caractériser la variation intraspécifique de chaque espèce et pour étudier les chevauchements (présence de « gaps ») entre les variations intra- et interspécifiques.

Dans un deuxième temps, des arbres phylogénétiques (de type Neighbour Joining ou basés sur le maximum de Parcimonie et les algorithmes bayésiens) ont été

construits afin de déterminer les relations phylogénétiques entre les entités étudiées (monophylie des espèces considérées). Les méthodes de reconstruction par parcimonie ou par inférence bayésienne sont généralement considérées comme plus performantes que la méthode Neighbour-Joining. (Voir Chapitre II.A, §2-4-2). Les arbres phylogénétiques construits ont été réalisés avec deux logiciels de reconstruction phylogénétiques : Paup (Swofford, 2002) et MrBayes (Jordal et Hewitt, 2004 ; Nylander *et al.*, 2004). L'ensemble des paramètres utilisés pour chacune des méthodes d'analyse est détaillé dans les articles 1, 3, 4, 5 et 6.

II.B.3. Analyses morphologiques

II.B.3.1. Montage des acariens

Les acariens sont montés entre lame et lamelle dans le milieu de Hoyer dont la composition(mélange d'eau bidistillée, de gomme arabique, chloral hydraté et de glycérine). Après l'étape de montage, les lames sont séchées dans des étuves durant plusieurs jours.

II.B.3.2. Les observations microscopiques

Les analyses morphologiques ont été réalisées grâce à un microscope optique à contraste de phase (Leica DMLB, Leica Microsystèmes SAS, Rueil-Malmaison, France) associé à une station d'acquisition d'images et à un logiciel de mesures (Perfect image). Les caractères morphologiques communément utilisés pour le diagnostic spécifique ont été observés et des mesures morphométriques ont été effectuées sur 718 femelles. La liste des caractères continus considérés pour l'analyse morphologique est présentée dans les articles 2, 3, 4, 5 et 6.

II.B.3.3. Les analyses statistiques

Les caractères morphologiques ont été analysés afin de déterminer leurs variations à l'intérieur d'une même espèce et entre deux espèces différentes, ceci afin de conclure sur leur pertinence pour le diagnostic spécifique.

Deux tests statistiques ont été principalement utilisés (1) des analyses de variance (ANOVA) et (2) des analyses multifactorielles, comme l'analyse en composante principale.

L'analyse de la variance a pour objectif de caractériser les différences significatives entre les moyennes des variables considérées entre l'ensemble des populations et espèces analysées.

L'analyse en composante principale permet de projeter chaque individu sur un plan factoriel afin de déterminer si la combinaison des caractères morphologiques considérés dans ce plan permet de séparer les populations et espèces étudiées.

II.B.4. La mise en collection des échantillons

II.B.4.1. Les spécimens montés entre lame et lamelle

Sont apposées sur chaque lame deux étiquettes comportant les informations suivantes : sur la gauche des informations concernant la famille, le genre, l'espèce et le sexe de chaque spécimen ainsi que le nom du collecteur ; et sur la droite des informations sur la date, le lieu de collecte et la plante support. Chaque lame reçoit ensuite un numéro unique qui est enregistré dans une base de données et est placée dans une boîte dans un local sec à l'abri de la lumière.

II.B.4.2. Les extraits d'ADN

Les extraits d'ADN sont conservés à -20°C . Chaque extrait comporte un numéro unique qui est le même que celui attribué aux lames des spécimens de référence. Au début de ce travail de thèse, la méthode d'extraction utilisée nécessitait un broyage complet du spécimen, le « voucher spécimen » était donc représenté par un individu issu de la même population que celle de l'individu utilisé pour l'extraction d'ADN. Actuellement, il est possible de conserver la carcasse des spécimens dont l'ADN a été extrait, ces carcasses une fois montées entre lame et lamelle constituent les « vouchers spécimens » (Tixier *et al.*, 2010, sous presse).

II.B.4.3. Les séquences d'ADN

Les séquences d'ADN obtenues ont été stockées dans une base de donnée. Chaque séquence a le même numéro que l'ADN extrait dont elle est issue.

Une illustration des principales étapes abordées dans cette deuxième partie du chapitre II est présentée dans la figure 12, montrant le lien entre le code barre unique attribué aux extraits d'ADN et les vouchers spécimens (montés entre lame et lamelle) ainsi qu'avec les informations de collecte.

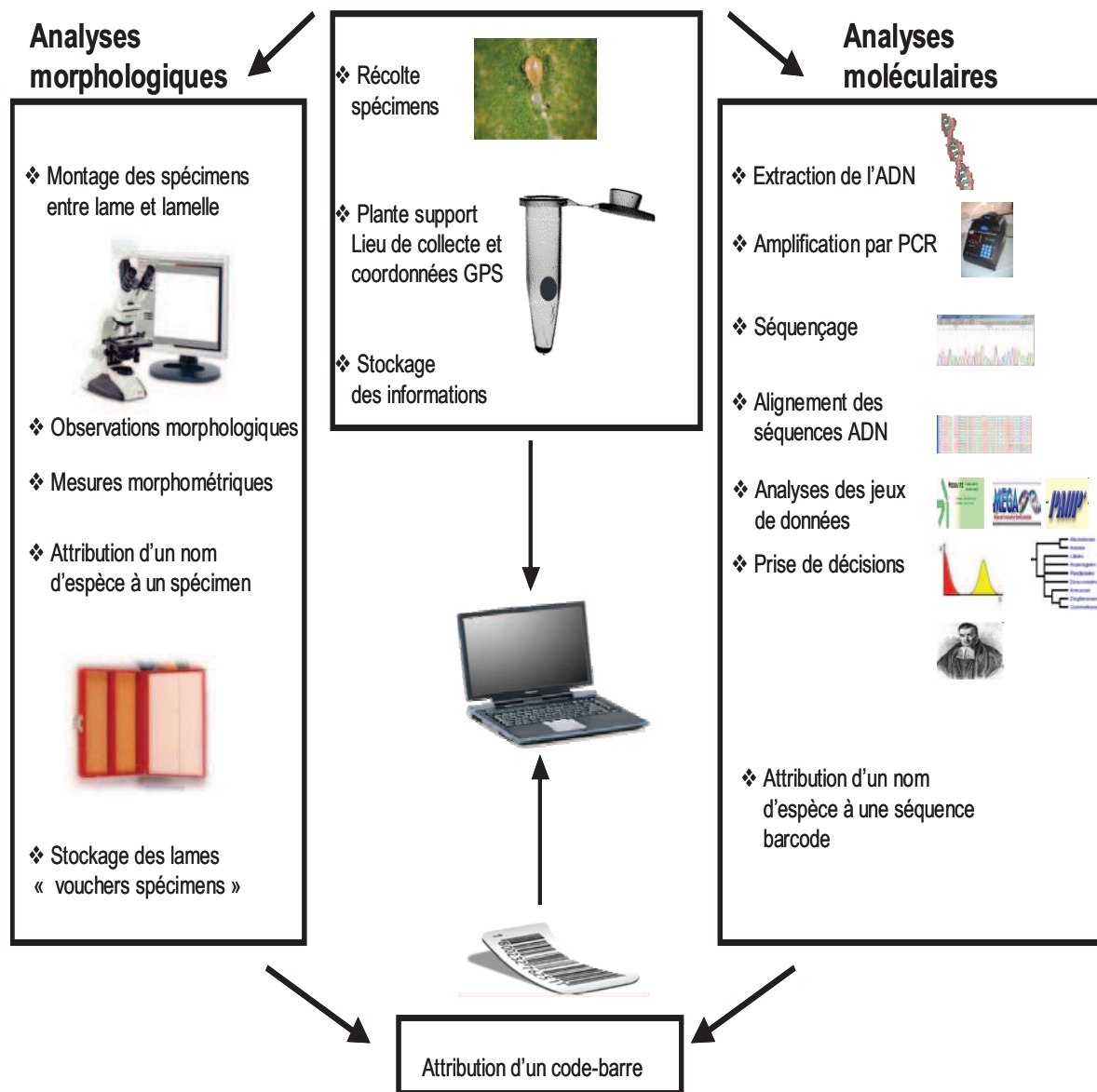


Figure 12. Ensemble des étapes réalisées pour les analyses moléculaires et morphologiques sur chaque spécimen collecté

II.B.5. Conclusion

La deuxième partie de ce chapitre visait à présenter (1) l'ensemble des étapes que nous avons mis en œuvre pour obtenir des données morphologiques et moléculaires pour les échantillons collectés et étudiés et (2) l'ensemble des méthodes d'analyses utilisées pour étudier la pertinence des approches moléculaires pour améliorer le diagnostic spécifique des espèces de Phytoseiidae.

Nous allons maintenant présenter l'ensemble des résultats que nous avons obtenus en fonction des différentes interrogations soulevées dans l'introduction, en commençant par le diagnostic à tous les stades de développement.

**CHAPITRE III. LE DIAGNOSTIC AUX
STADES IMMATURES ET ADULTES
MALES**

CHAPITRE III. LE DIAGNOSTIC AUX STADES IMMATURES ET ADULTES MALES

Le diagnostic à tous les stades de développement a été l'un des autres enjeux du Barcoding (voir chapitre II § 2.2), particulièrement pour des groupes taxonomiques pour lesquels l'identification des stades immatures ne peut être réalisée par des observations morphologiques. Le diagnostic spécifique des stades immatures et des mâles est précisément un problème au sein de la famille des Phytoseiidae. En effet, les Phytoseiidae sont caractérisés par 5 stades post-embryonnaires, dont le stade adulte. Or, il est impossible d'identifier les individus, bien entendu au stade œuf mais également aux stades larve et protonymphe. Ce diagnostic est de plus peu fiable aux stades deutonymphe et adulte mâle. Au stade deutonymphe, seule la sous-famille et le genre peuvent être désignés sans prendre trop de risques car les prémisses d'insertions des soies sont déjà visibles. Les stades immatures comme les larves hexapodes, les protonymphes et les deutonymphes ont moins de caractères discriminants que les adultes car toutes les structures ne sont pas visibles. En effet, les soies s'ajoutent ou se retranchent au fur et à mesure des mues et atteignent leurs nombres définitifs au stade adulte (Helle et Sabelis, 1985a).

Les mâles possèdent un spermatodactyle qui leur permet de transférer leur spermathopore vers le tractus génital femelle. Cet organe a été utilisé pour identifier les espèces dans de nombreux groupes taxonomiques (Chant et McMurtry, 2007) mais très peu d'études sur la valeur diagnostique de ce caractère ont été publiées pour les Phytoseiidae.

III.1. Objectifs de l'étude

Lorsqu'un échantillon contient uniquement des spécimens immatures et mâles, le diagnostic spécifique ne peut être effectué. Le but de cette étude a été de déterminer si le diagnostic spécifique à des stades immatures de développement (œufs, larves, protonymphe et deutonymphe) et au stade adulte mâle est possible. La principale difficulté réside dans la petite taille des stades considérés. En effet, la taille d'une femelle, stade de développement le plus important, est comprise entre 300 et 500 µm. Les autres stades de développement et les mâles sont beaucoup plus petits.

Pour réaliser cette étude, nous avons considéré différents stades de développements de l'espèce *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus* Ragusa et deux marqueurs moléculaires mitochondriaux (12S ARNr et Cytb), très souvent utilisés pour le diagnostic spécifique au sein de la famille des Phytoseiidae (Jeyaprasah *et al.*, 2002 ; Kanouh *et al.*, 2010a,b ; Tixier *et al.*, 2010).

III.2. Position taxonomique de *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus* Ragusa

Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus a été décrite à partir de spécimens collectés sur *Rosmarinus officinalis* (L.) sous le nom de *Typhlodromus exhilaratus* en Italie par Ragusa en 1977. Cette espèce appartient à la tribu des Typhlodromini et à la sous-famille des Typhlodrominae.

III.3. Quelques caractéristiques biologiques de *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus*

III.3.1. Type de prédation

Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus est considéré comme un prédateur généraliste polyphage qui appartient la catégorie fonctionnelle de type III, d'après la classification de McMurtry et Croft (1997). Cette espèce peut consommer des proies comme *T. urticae*, *Panonychus citri* (McGregor), *Eotetranychus carpini* (Oudemans) et *Colomerus vitis* (Pagenstecher) et également des pollens de différentes plantes (Castagnoli et Liguori, 1986).

III.3.2. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio

❖ Dans des conditions optimales (26 °C, 70-80 % d'hygrométrie relative), le développement du stade œuf au stade adulte varie lorsqu'il consomme *E. carpini* (7,53 jours) ou *P. ulmi* (8,15 jours) ou du pollen de *Quercus ilex* (L.) (7,44 jours) (Castagnoli et Liguori, 1986).

❖ Le taux de fécondité (nombre d'œufs pondus par femelle par jours) est aussi dépendant du type de proies consommées : *T. urticae* (0,48) (Ragusa, 1979, 1981a), *E. carpini* (1,61) (Castagnoli et Liguori, 1986), *P. citri* (0,99) (Ragusa, 1979, 1981a), *P. ulmi* (1,21) (Castagnoli et Liguori, 1986); *C. vitis* (1,35) (Castagnoli et Liguori,

1986) ou du pollen de *Q. ilex* (1,51) (Castagnoli et Liguori, 1986), de *R. officinalis* (0,96) (Ragusa, 1981) ou de *Quercus* sp (0,84) (Castagnoli et Liguori, 1994).

❖ Enfin, la sex ratio est biaisée en faveur des femelles comme pour la plupart des espèces de Phytoseiidae (Helle et Sabelis, 1985a). Elle est de 51 % lorsque *T.(T.) exhilaratus* consomme du pollen de *Q. ilex*.

Il semblerait que cette espèce puisse survivre à de faible hygrométrie. En effet, Liguori et Guidi (1995) ont observé que pour une hygrométrie relative de 50 %, plus de 50 % des œufs éclosent et 79 % des larves survivent. En revanche, une température élevée et une hygrométrie inférieure à 50% plus faible provoquent la mort de plus de 50 % des œufs.

III.4. Importance de cette espèce en lutte biologique

Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus est utilisée dans des stratégies de lutte biologique par « conservation de la biodiversité » pour lutter contre les pullulations d'acariens ravageurs dans les parcelles de vigne en Italie et en France (Ragusa 1986 ; Castagnoli *et al.*, 1997 ; Barbar *et al.*, 2006).

III.5. Distribution géographique

Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus a été observée dans **six** pays de la **région méditerranéenne** : en **France** (Tixier *et al.*, 2000b ; Barbar *et al.*, 2006), en **Grèce** (Swirski et Ragusa, 1977 ; Chant et Yoshida-Shaul, 1987 ; Ragusa et Tsolakis, 1998), en **Italie** (Castagnoli et Liguori, 1986, 1987 ; Ragusa, 1986 ; Vacante et Nucifora, 1987 ; Corino, 1989 ; Liguori et Castagnoli, 1989 ; Nicotina *et al.*, 1990 ; Nicotina et Tsolakis, 1994 ; Nicotina, 1996a ,b ; Nicotina et Cioffi, 1998 ; Nicotina, 1999 ; Nicotina et Cioffi, 2000), en **Israël** (Swirski et Amitai, 1997), au **Maroc** (Tixier *et al.*, 2003a) et enfin en **Tunisie** (Kreiter *et al.*, 2004).

Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus est largement répandue dans les vignobles et les vergers d'agrumes au centre et au sud de l'Italie (Ragusa, 1986 ; Liguori, 1987 ; Nicotina et Cioffi, 1998 ; Castagnoli *et al.*, 1997 ; Nicotina, 1999) et dans les vignobles grecs (Papainoannou-Souliotis *et al.*, 1999). Cette espèce a été observée mais en faible proportion dans les vignobles du Languedoc en France en 1988 et en 2004 (S. Kreiter, communication personnelle).

III.6. Populations et espèces étudiées

Une population de *T. (T.) exhilaratus* a été collectée dans le Site de la Restinclières situé à 20 km de Montpellier. Cette population a été mise en élevage dans des conditions suivantes : 25 ± 1 °C de température, 70 % d'hygrométrie relative, 16L: 8D pour la photopériode et nourrie tous les deux jours avec des œufs de *T. urticae*. Trente-quatre spécimens correspondant à l'ensemble des stades de développement ont été analysés pour les deux marqueurs mitochondriaux 12S ARNr (420 pb) et la Cytb (416 pb). Afin d'estimer la variation interspécifique et de déterminer si les marqueurs utilisés permettaient de séparer *T. (T.) exhilaratus* d'une autre espèce du même genre, une espèce témoin a été ajoutée à cette étude : *Typhlodromus (Typhlodromus) phialatus* (Athias-Henriot), collectée également sur le site de Restinclières. Cette espèce est considérée comme une espèce jumelle de *T. (T.) exhilaratus*. En effet, ces deux espèces se différencient uniquement par un seul caractère morphologique qui est la forme de la spermathèque (Tixier *et al.*, 2006a).

III.7. Article 1. Molecular identification of all life stages of a mite species (Mesostigmata: Phytoseiidae): *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus*. En cours de soumission.

Abstract

Several species of the family Phytoseiidae are well known for their ability to control mite pests in many crops in the world. However, biological control success greatly depends on the accurate identification of the predatory mites involved. Since now, species diagnostic is essentially based on the morphological characters of females. Thus, when samples only contain immature stages and / or males, species identification is poorly supported. Molecular tools could be of great help for species identification whatever the life stage considered, as it is argued by barcoding proponents. In this study, molecular diagnostic at early stages and males was studied using two mitochondrial DNA fragments (12S rRNA and Cytb mtDNA) for one species of Phytoseiidae: *Typhlodromus (Typhlodromus)*

exhilaratus, which is known to control mite pests in grapevines in southern Europe. The key point was the extraction of a sufficient DNA amount from a single specimen (less than 300 µm in length), whatever the life stage considered: egg, larva, protonymph, deutonymph and adults (male and female). Despite a low quantity of DNA obtained, particularly for the egg, larva and protonymph stages, DNA has been amplified and sequenced from all the life stages considered with the two mtDNA fragments. DNA sequences obtained were similar for all the life stages. The main conclusion of this study is thus that the two molecular markers could ensure identification at all development stages. However, this identification requires now the construction of a great DNA species library to assign the sequence obtained to the correct corresponding species.

Key-words : 12S rRNA, Cytb mtDNA, diagnostic, life stages

Introduction

Several species in the family Phytoseiidae are important natural enemies of mite pests in many crops all around the world (McMurtry & Croft 1997). However, the success of biological control programs greatly depends on the accurate identification of these predatory mites. Species diagnostic is essentially based on morphological characters of females, especially leg and dorsal chaetotaxy (especially setal lengths), spermatheca shape and cheliceral dentition (Chant & McMurtry 1994, 2007). Such identifications face two main difficulties.

First, as Phytoseiidae are microscopic organisms (less than 500 µm in length for females), the number of available (visible) characters to discriminate between specific entities is low. Furthermore, the reliability of the characters helpful to distinguish between species is not very clear as several studies have recently shown that some characters currently used to discriminate specific entities are highly variable within a same one (Tixier *et al.*, 2003, 2006a, b, 2008a, b). Lastly, some characters which are difficult to observe or/ and whose observation depends on mounting quality (i.e. spermatheca shape, number of teeth on the chelicera digits) seem to be relevant to discriminate between some species (Chant & McMurtry 1994, 2006a, b, 2007; Tixier *et al.*, 2006a, b). All these difficulties,

specific to morphological taxonomy, could be reduced using molecular diagnostic as stated by Hebert *et al.* (2003, 2004a, b) in barcoding approaches.

Secondly, when a sample contains only immature stages and / or males, the accurate identification of the specimens at species level would be poorly sustained. DNA barcoding approach could be of great help for solving such a problem as DNA sequences are assumed to be similar whatever the life stages considered (Stoeckle, 2003; Blaxter, 2004). Several studies dealing with insects have shown the utility of such an approach for immature stage identification (e.g. Hebert *et al.*, 2004b; Paquin & Hedin 2004; Barrett & Hebert 2005; Miller *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005; Vences *et al.*, 2005a, b). However, phytoseiid mites are microscopic organisms. The larger stage is the female and its body length ranges between 300 and 500 µm. The main question addressed in the present study thus concerns the possibility to extract a sufficient DNA amount from immature and male stages to ensure DNA amplification and further sequencing with two mitochondrial DNA markers (12S rRNA and Cytb mt DNA) currently used in species diagnostic within the family Phytoseiidae (Jeyaprasah & Hoy 2002; Tixier *et al.*, 2006a, b; Okassa *et al.*, 2009; Kanouh *et al.*, 2010; Okassa *et al.*, 2010; Tixier *et al.*, 2010). Very recently, Jeyaprasah & Hoy (2010) succeed in extracting and amplifying DNA from eggs and males of *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt). We tested in the present paper a different DNA extraction method and perform extraction on the other life stages. For this, we focus on the species *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus* Ragusa that is known to control mite outbreaks in vine crops in Italy and France (Ragusa 1986; Castagnoli *et al.*, 1997; Barbar *et al.*, 2006). A sister-species, *Typhlodromus (Typhlodromus) phialatus* Athias-Henriot was also studied to validate the molecular diagnostic as only weak differences in the shape of the spermatheca (an organ that is only observed on females) differentiate these two species (Tixier *et al.*, 2006a).

Material and methods

Populations and species studied

The specimens of *T. (T.) exhilaratus* considered were collected in vine crops at Restinclières at 20 kms North of Montpellier (Hérault, southern France). The mites were collected directly on leaves with a fine and clean hairbrush, and transferred

into a rearing unit, composed of a black plastic support surrounded by wet cotton barriers for avoiding mite escape. The mites were mass-reared in climatic chambers (25 °C, 70 % HR, 16 L: 8D) for six months on eggs of *Tetranychus urticae* Koch. The life stages: eggs, larvae, protonymphs, deutonymphs, adults (male and female) were directly collected in the rearing unit and individually put in plastic vials filed with 100 % alcohol (Table 1).

The sister species of *T. (T.) exhilaratus*, *T. (T.) phialatus*, was considered as a control. Specimens were also collected at Restinclières on *Viburnum tinus* L., directly on leaves with a fine and clear hairbrush. Only the females of this latter species were used for molecular experiments (Table 1).

Specimens designated as vouchers are selected from the same series of specimens (identical population, locality, and date of collect) as the ones which were extracted. These specimens were mounted on slides, identified and conserved in the mite collection of Montpellier SupAgro / INRA. *Typhlodromus (T.) exhilaratus* and *T. (T.) phialatus* were differentiated on the basis of the shape of the insemination apparatus (spermatheca) (Tixier et al., 2006a).

Table 1. Number of specimens studied for each life stage of *T. (T.) exhilaratus* and *T. (T.) phialatus* and their accession numbers in the Genbank database, for 12S rRNA and Cytb mt DNA markers

| Mites species | Location | Life stage | Accession numbers of the sequences obtained (12S ARNr mtDNA) | Accession numbers of the sequences obtained (Cytb mtDNA) |
|----------------------------|-----------------------|------------|---|---|
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | France, Restinclières | Egg | HM635275 | – |
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | France, Restinclières | Larva | HM635276 HM635277 HM635278 HM635279 | HM635301 HM635302 HM635303 |
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | France, Restinclières | Protonymph | HM635280 HM635281 HM635282 | HM635304 HM635305 HM635306 HM635307 |
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | France, Restinclières | Deutonymph | HM635283 HM635284 HM635285 | HM635308 HM635309 HM635310 HM635311 HM635312 |
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | France, Restinclières | Male | HM635286 HM635287 HM635288 HM635289 HM635290 | HM635313 HM635314 HM635315 HM635316 HM635317 |
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | France, Restinclières | Female | HM635264 HM635265 HM635266 HM635267 HM635268 HM635269 | HM635291 HM635292 HM635293 HM635294 HM635295 |
| <i>T. (T.) phialatus</i> | France, Restinclières | Female | HM635270 HM635271 HM635272 HM635273 HM635274 | HM635296 HM635297 HM635298 HM635299 HM635300 |

DNA extraction

In order to prevent contaminations due to the low DNA amounts in immature stages, precautions have been taken using separated worktops (pre- and post-PCR rooms) for DNA extraction and DNA amplification; these latter were frequently cleaned with 1M NaOH, distilled water, and 95 % ethanol. Ultrapure water, decontaminated during 30 min (UV radiation exposure), was also used for molecular experiments.

Total DNA was individually extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) according to the DNA extraction protocol « Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells » (Spin-Column Protocol) adapted for extracting total DNA from mites. To a tube containing a single mite we added lysis buffer (90 µL Phosphate-Buffered Saline), 10 µL Proteinase K and 100 µL Buffer AL (Qiagen). After tubes were centrifuged for 5 min (13,000 rpm) and incubated at 56°C for 16 hours, 100 µL of alcohol (100 %) was added. Following a centrifugation during 1 min (8,000 rpm), this mix was deposited on a Dneasy column and centrifuged for 1 min (8,000 rpm). The collection tube and its contents were thrown away and the column was kept. The DNA on the column was then washed with 250 µL of buffer AW1 (Qiagen) which was removed by centrifuging 1min at 8,000 rpm. After that, the collection tube was thrown away and a second wash was performed with 250 µL of buffer AW2 (Qiagen) followed by two centrifugations of 3 min each (13,000 rpm). Then, the DNA was eluted from the column using 30 µL of ultrapure water for egg stage, 40 µL for larva, protonymph and deutonymph stages, 50 µL for adult stages. After two final centrifugations (1min; 8,000 rpm each), the DNA extract was obtained.

Amount of DNA

The total amount of DNA was assessed using the spectrophotometry method (NanoDrop 8000, NanoDrop Technologies). The A 260 / A 280 ratio provides an estimate of DNA purity; values of 1.8-2.0 predicting "clean DNA". When possible, DNA amount was evaluated for several specimens of each life stage (Table 2).

DNA amplification

Two mitochondrial DNA markers were used: 12S rRNA and Cytb mtDNA. The primers used to amplify these fragments were as follows: 12S rRNA, 5'-3' TACTATGTTACGACTTAT and 3'-5' AACTAGGATTAGATACCC (Jeyaprakash and

Hoy 2002); Cytb mtDNA, 5'-3' TAWRAARTATCAYTCDGGTTKRATATG and 3'-5' CCWTGAGG ACAAATAWSWTTYTGAGG (W. Dermauw, pers. comm.). A total volume of 25 μ L was used for PCR reaction :2 μ L DNA template, 2.5 μ L (1.5 mM) of buffer 10X (KCl), 1 μ L (1 mM) of Mgcl₂, 0.5 μ L (0.05 mM for each) of dNTP, 0.175 μ L (0.7 μ M) of each primer, 0.125 μ L (0.625 U) of Taq Qiagen and 18.525 μ L of ultrapure water for a total reaction volume of 25 μ L. Thermal cycling conditions were as follows, for the 12S rRNA marker: 95 °C for 1 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 40 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and 72 °C for 5 min; for the Cytb mtDNA marker: 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 92 °C for 20 s, 53 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and an additional 5 min at 72 °C. Electrophoresis was carried out on 1.5 % agarose gel in 0.5x TBE buffer during 20 min at 135 V.

DNA sequencing

PCR products were sequenced using CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (CEQTM] 2000XL DNA Analysis System, Beckman, Beckman Coulter, USA). Purification of DNA was carried out with gel of filtration on a rG-50 Super fine Sephadex[®] resin.

All DNA fragments were sequenced along both strands. Sequences were analysed and aligned with Geneious v3.5.4 (Drummond *et al.*, 2007). The number of sequences obtained and their accession number in the Genbank database are shown in the table 1.

Data analysis

Preliminary observations were conducted on the sequences of coding DNA (Cytb mtDNA) to check for the absence of stop codons, using Mesquite (Maddison & Maddison 2009). The distance matrices were constructed using the Kimura 2-parameter model with Neighbour Joining (NJ) and Maximum Parsimony (MP) analyses were conducted with PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Node supports were determined using 1,000 bootstrap replicates. For Parsimony analysis, a heuristic search procedure repeated 1,000 times was applied, with randomized taxon additions and branch-swapping algorithm (TBR).

Results and Discussion

DNA extraction

DNA was successfully extracted for all the immature stages despite their small size (Table 2). In a recent study, Jeyaprakash & Hoy (2010) also succeed in extract DNA from eggs, males and females of phytoseiid mites with another DNA extraction protocol using a lysis buffer (GuSCN) and DNA isolation on silica matrix. The present results show that the Qiagen DNeasy tissue kit, a quite commonly used DNA extraction method, can also be used for extracting successfully DNA from all the life stages of a species of Phytoseiidae: *T. (T.) exhilaratus*.

Table 2. Quantity (ng/mite) and quality of DNA extracts for all the life stages of *T. (T.) exhilaratus*

| Life stage (n=number of specimens) | Mean DNA amount in ng / specimen (standart error) | DO 260/280 |
|------------------------------------|---|-------------|
| egg (n=1) | 28.8 (-) | 0.91 |
| larva (n=3) | 29.33 (4.23) | 0.45 -7.3 |
| protonymph (n=2) | 82.09 (26.09) | 0.76 - 0.98 |
| deutonymph (n=2) | 93.4 (26.87) | 0.62- 0.93 |
| female (n=1) | 157 (-) | 2.05 |
| male (n=2) | 100.8 (10.74) | 0.97- 3.36 |

A correlation between life stage sizes and DNA amounts was observed, the highest DNA quantity being obtained for females and the lowest for eggs (Table 2). The DNA quantity in eggs and larvae was quite similar, as well as the DNA quantity in males and deutonymphs, which is in accordance with the respective size of these life stages. A bit lower amount of DNA was observed in protonymphs than in deutonymphs. This does not exactly reflect the size differences between these two stages; however, size can vary according to the moulting date; thus, old protonymphs would be only weakly smaller than young deutonymphs (Table 2). Few studies report DNA amount in phytoseiid mites; furthermore, the quantity reported in litterature are very different. Jeyaprakash & Hoy (2010) recorded that the amount of genomic DNA in females of *M. occidentalis* varied between 109 and 200 ng per mite with quality (DO_{280 / 260}) ranging from 1.3 to 8.8. Konakandla *et al.* (2006) recorded that the amount of DNA in a female of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot was 1.3 ± 0.7 ng per mite. The DNA amount presently observed ranged between 28 (egg) and 126 ng

(female) per mite with DNA quality ($DO_{280/260}$) varying from 0.45 to 7.3. The present results, both on DNA quantity and quality, are very similar to those observed by Jeyaprakash & Hoy (2010). Thus, the Qiagen DNA protocol extraction presently used and the one proposed by the latter authors lead to similar quality and quantity of DNA extracts.

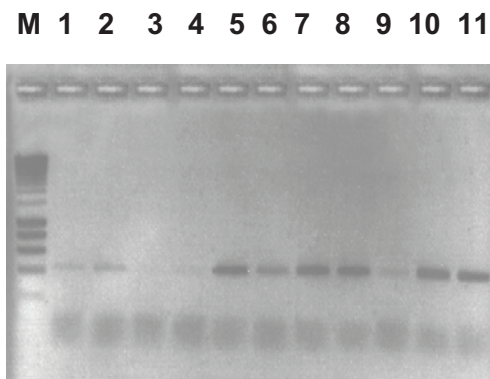
DNA amplification

PCR products were obtained for all the life stages considered with the two molecular markers (12S rRNA and Cytb mtDNA). The figure 1 presents the electrophoresis gels for the Cytb mtDNA marker for egg, larva, deutonymph and adult (male) stages. Amplification rates were high for all life stages studied, ranging between 50 and 100 % (Table 3). Jeyaprakash & Hoy (2010) obtained for eggs and males of *M. occidentalis*, an amplification rate of 100 %, using two markers EF-1& and COI mtDNA. As obtaining PCR products of such so small organisms do not guarantee that what has been amplified corresponds to the DNA of the initial specimens, sequencing was carried out.

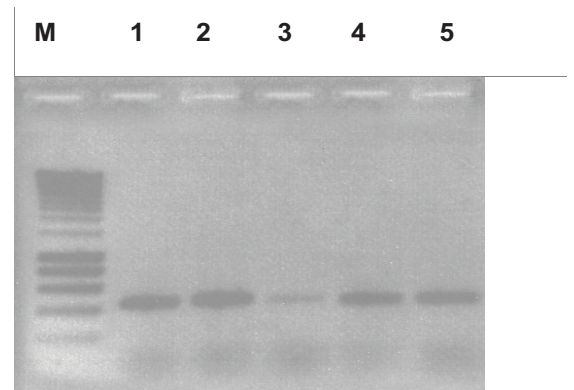
Table 3. Amplification and sequencing rates with the two molecular markers (12S rRNA and Cytb mtDNA) for *T. (T.) exhilaratus* (all life stages) and *T. (T.) phialatus* (adult stage: female)

| Life stage | 12S rRNA marker | | Cytb mtDNA marker | |
|------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| | Amplification rates (%) | Sequencing rates (%) | Amplification rates (%) | Sequencing rates (%) |
| Egg | 5/7 (71%) | 5/5 (100%) | 4/7 (57%) | 4/4 (100%) |
| Larva | 4/5 (80%) | 5/5 (100%) | 5/5 (100%) | 5/5 (100%) |
| Protonymph | 3/6 (50%) | 3/3 (100%) | 6/6 (100%) | 6/6 (100%) |
| Deutonymph | 3/5 (60%) | 3/3 (100%) | 5/5 (100%) | 5/5 (100%) |
| Male | 5/5 (100%) | 5/5 (100%) | 5/5 (100%) | 5/5 (100%) |
| Female | 6/6 (100%) | 6/6 (100%) | 5/6 (83%) | 6/6 (100%) |

A.



B.



C.

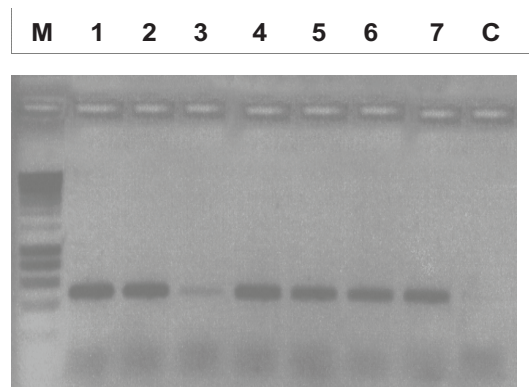


Figure 1. DNA bands of the expected sizes were amplified for Cytb mtDNA marker from different life stages of *T. (T.) exhilaratus*. Lane **M** indicates SmartLadder SF, Lane **C** indicates water control. One DNA band corresponds at single specimen. In picture **A**, **lanes 1-6** indicate egg stage, **lanes 7-11** indicate larva stage. In picture **B**, **lanes 1-5** indicate protonymph stage. In picture **C**, **lanes 1-2** indicate deutonymph stage, **lanes 3-7** indicate adult stage (male).

DNA sequencing

For all the PCR products, sequences were obtained (Table 3). Quantity and quality of PCR products were thus good enough to allow sequencing. Fragments of 464 and 426 base pairs (bp) were amplified for the 12S rRNA and Cytb mtDNA markers, respectively.

A Blast research on the Genbank database shows that the majority of sequences obtained aligned with Phytoseiidae mites for the two DNA markers. However, despite the precautions taken to prevent contaminations, some sequences matched with *Homo sapiens*. The higher contaminations rates were observed with the Cytb mtDNA marker (100 % of eggs, 40 % of larvae and 20 % of protonymphs), probably because the primers used to amplify this latter fragment are degenerated and consequently less specific than the primers used to amplify the 12S rRNA fragment. With this latter marker, only sequences from eggs were contaminated and even if high (80 % of contamination), this contamination rate was lower than the one observed with the Cytb mtDNA marker for the same life stage. These results underline the difficulty to extract DNA from such so small immature stages. Procedures used for extractions and amplifications of rare DNA (museum specimens, fossiles, bones ...) should thus be applied for such material, especially sterile conditions (Ramón *et al.*, 2009; Woide *et al.*, 2010).

The size of sequences of *T. (T.) exhilaratus* were similar for all the life stages considered for both markers, as already observed for other organisms (Anderson *et al.*, 2004; Greenstone *et al.*, 2005; Dergoussoff & Chilton 2007). The NJ and MP trees with the two molecular markers considered (figure 2 a, b, c, d) show two clades well separated by high bootstrap values. The first clade contains all of the specimens *T. (T.) exhilaratus* studied whatever the life stages and the second one the females of *T. (T.) phialatus*. For both DNA fragments, the mean intraspecific distances within each species was of 0 %, whereas the interspecific mean genetic distances were of 13.9 % for the 12S rRNA fragment and of 23.4 % for the Cytb mtDNA. The two DNA markers used allow thus to clearly distinguish between these two species at all life stages, despite a single weak difference in spermatheca shape, only visible on females.

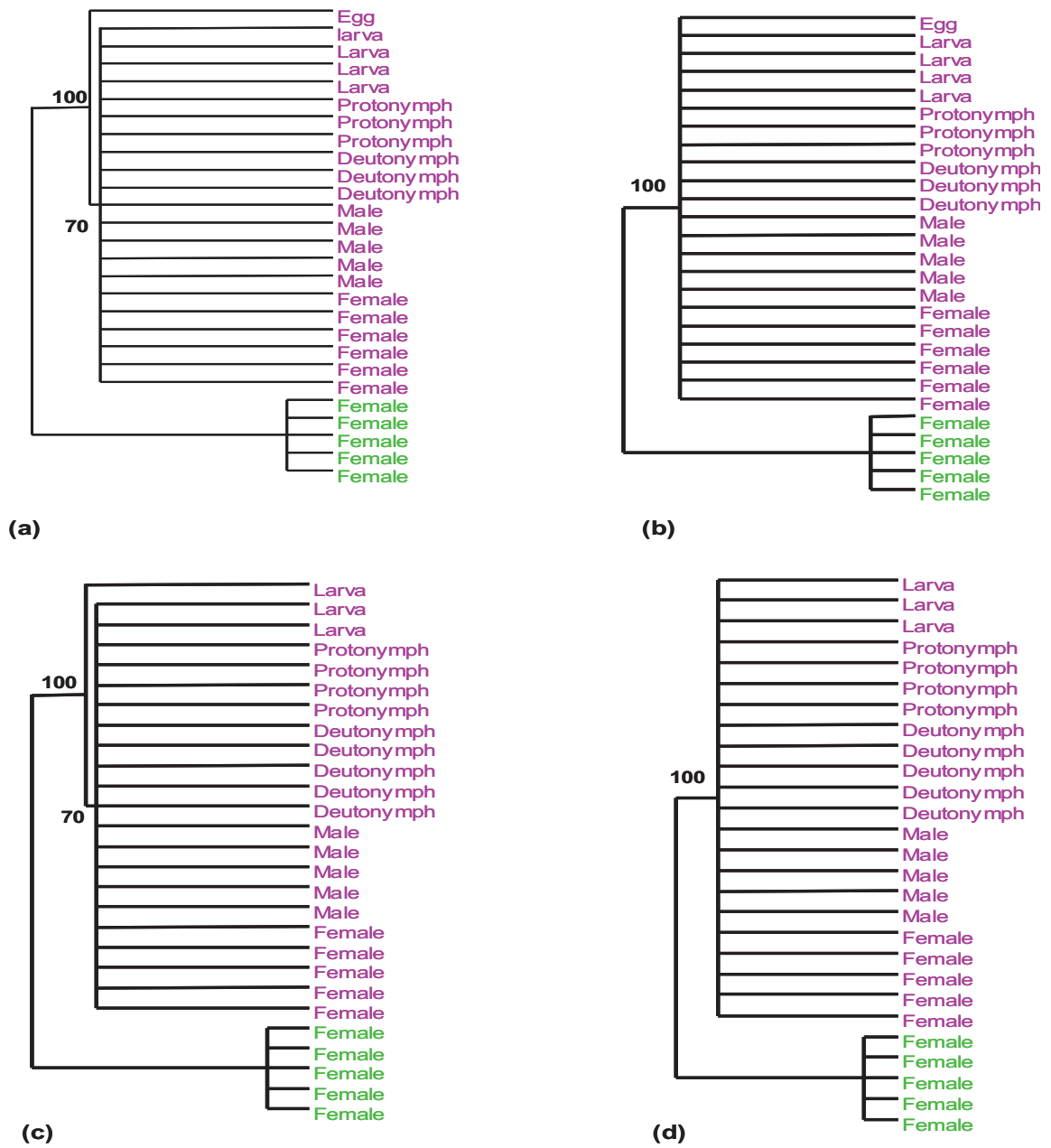


Figure 2. Neighbour Joining (a, c) and Maximum Parsimony (b, d) trees built with all the sequences from all the life stages of *T. (T.) exhilaratus* and females of *T. (T.) phialatus* with 12S rRNA (a, b) and Cytb mtDNA (c, d) markers.

Conclusion

Molecular identification at early stages has been performed for other animal groups, such as Metastriate ixodid ticks (Anderson *et al.*, 2004; Dergousoff & Chilton 2007), carabids and spider (Greenstone *et al.*, 2005) and *Lygus* spp. (Hemiptera: Miridae) (Bon *et al.*, 2008). However, these latter organisms are much larger than phytoseiid mites. The main insight of the present paper is thus the success in DNA extraction and amplification for all the life stages of such small specimens. Furthermore, DNA sequences were obtained and successfully used for specific diagnostic between two related species, opening great applications for facilitating specific diagnostic within the family Phytoseiidae. Such results could also be applied in ecological studies. For instance, when studying interspecific competitions, it was impossible since now to determine when two species were put together, to which of these two species the eggs laid belong. However, the success in DNA amplification and sequencing was lessened by contaminations (despite the basic precautions taken) for the three smaller stages (eggs, larvae and protonymphs). Such problems are currently observed when working with rare DNA (Ramón *et al.*, 2009; Woide *et al.*, 2010). Further studies have thus to be carried out to determine the best conditions (sterile conditions) to reduce contamination's rates.

Lastly, this work confirms the great help of molecular biology for species diagnostic. In the near future, the taxonomists will not have to wait for the adult's stages for species identification. Furthermore, it will be possible to use a female as a voucher and the descendants for DNA extraction. However to apply efficiently molecular tools for species diagnostic, i.e. to assign a DNA sequence to the correct species, the number of species sequenced has to increase. Actually, the number of sequences of the Phytoseiidae is presently very low (302 sequences, 33 species) compared to its known diversity (2, 238 species) (Moraes *et al.*, 2004).

Acknowledgements

We are very grateful to Frédérique Cerqueira (IFR119 « Montpellier Environnement Biodiversité ») for her help during the sequencing phase. We also thank Jean-Francois Martin and Maxime Galan for their technical assistance.

References

- Anderson, J.M., Ammerman, N.C. & Norris, D.E. (2004). Molecular differentiation of Metastriate tick immatures. *Vector-Borne Zoon. Dis.* **4**,334-342.
- Barbar, Z., Tixier, M.S., Cheval, B. & Kreiter, S. (2006). Effects of agroforestry on phytoseiid mite communities (Acari: Phytoseiidae) in vineyards in the South of France. *Exp. Appl. Acarol.* **40**,175-188
- Barrett, R.D.H. & Hebert, P.D.N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Can. J. Zool.* **83**, 481–491.
- Bon, M.C, Hoelmer, K., Coutinot, D. & Ramualde, N. (2008). PCR-based, rapid diagnosis of parasitism of *Lygus* spp (Hemiptera: Miridae) by *Peristenus relictus* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Sci. Techn.* **18**, 505-516.
- Blaxter, M.L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. *Phil. Trans. R. Soc. London* **359**, 669-679.
- Castagnoli, M., Liguori, M. & Nannelli, R. (1997). La popolazioni degli acari nei vigneti inerbiti del chianti: confronto tra cultivar. *Redia* **80**, 15-31.
- Chant, D.A. & McMurtry, J.A. (1994). A review of the subfamilies Phytoseiinae and Typhlodrominae (Acari: Phytoseiidae). *Int. J. Acarol.* **20**, 223-310.
- Chant, D.A. & McMurtry, J.A. (2006a). A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part VIII. The tribes Macroseiini Chant, Denmark and Baker, Phytoseiulini n. tribe, Africoseiulini n. tribe and Indoseiulini Ehara and Amano. *Int. J. Acarol.* **32**, 13-25.
- Chant, D.A. & McMurtry, J.A. (2006b). A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part IX. An overview. *Int. J. Acarol.* **32**, 125-152.
- Chant, D.A. & McMurtry, J.A. (2007). Illustrated keys and diagnoses for the genera and subgenera of the Phytoseiidae of the world (Acari: Mesostigmata). Indira Publishing House, Michigan, 220 pp.
- Dergousoff, S.J. & Chilton, N.B.(2007) Differentiation of three species of ixodid tick, *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* and *D. albipictus*, by PCR-based approaches using markers in ribosomal DNA. *Mol. Cell. Probes* **21**, 343-348.

- Drummond, A.J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer, T. & Wilson, A. (2007). Geneious V3.5.4, available from: <http://www.geneious.com/> (accessed in July 2010).
- Greenstone, M.H., Rowley, D.L., Heimbach, U., Lundgren, J.G., Pfannenstiel, R.S. & Rehner, S.A. (2005). Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders. *Mol. Ecol.* **14**, 3247–3266.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & De Waard, J.R. (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **270**, 313–321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. & Hallwachs, W. (2004a). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14812–14817.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, L.Y., Zemplak, T.S. & Francis, C.M., (2004b). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* **2**, 10e312.
- Jeyaprakash, A. & Hoy, M.A. (2002). Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari:Phytoseiidae). *Biol. Contr.* **25**, 136–142.
- Jeyaprakash, A. & Hoy, M.A. (2010). A DNA extraction procedure that allows mite specimens to be slide mounted: phytoseiid species evaluated as a model. *Exp. Appl. Acarol.* **52** (2), 131–140.
- Kanouh, M., Tixier, M.S., Guichou, S., Cheval, B. & Kreiter S. (2010). Two synonymy cases within the genus *Neoseiulella* (Acari: Phytoseiidae): is the molecular evidence so evident? *Biol. J. Linn. Soc.* **101**, 323–344.
- Konakandla, B., Park, Y. & Margolie, D. (2006). Whole genome amplification of Chelex-extracted DNA from a single mite: a method for studying genetics of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. *Exp. Appl. Acarol.* **40**, 241–247.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (2009). Mesquite: a Modular System for Evolutionary Analysis. Version 2.72 <http://mesquiteproject.org> (accessed in July 2010).
- McMurtry, J.A. & Croft, B.A. (1997). Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Ann. Rev. Entomol.* **42**, 291–321.
- Miller, K.B., Alarie, Y., Wolfe, G.W. & Whiting, M.F. (2005). Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae). *Syst. Entomol.* **30**, 499–509.

- Moraes, G.J., McMurtry, J.A., Denmark, H.A. & Campos, C.B (2004). A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. *Zootaxa* **434**, 1-494.
- Okassa, M., Tixier, M.S., Cheval, B. & Kreiter, S. (2009). Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). *Can. J. Zool.* **87**, 689-698.
- Okassa, M., Tixier, M.S. & Kreiter, S. (2010). Morphological and molecular diagnostic of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari : Phytoseiidae) *Exp. Appl. Acarol.* **52**, 291–303
- Paquin, P. & Hedin, M. (2004). The power and perils of ‘molecular taxonomy’: a case study of eyeless and endangered *Cicurina* (Araneae: Dictynidae) from Texas caves. *Mol. Ecol.* **13**, 3239–3255.
- Ragusa S. (1986). A five year study on population fluctuations of phytoseiids mites in a citrus orchard in Sicily. *Acarologia* **27**, 193-201.
- Ramón, C., Alberto, D., Manuel, G.G., José Antonio, H., Fernando, R. & Manuel, R.R. (2009). Forensic Strategies Used for DNA Extraction of Ancient and Degraded Museum Sturgeon Specimens. In Fish & Fisheries Series. Vol. 29. Biology Conservation and Sustainable Development of Sturgeons (Eds.Springer Netherlands), 95-96.
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *Biosci.* **53**, 796-797.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP- Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), Ver. 4. 0. Beta. [computer software]. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thomas, M., Raharivololoniaina, L., Glaw, F., Vences, M. & Vieites, D.R. (2005). Montane tadpoles in Madagascar: molecular identification and description of the larval stages of *Mantidactylus elegans*, *Mantidactylus medacassus*, and *Boophis laurenti* from the Andringitra Massif. *Copeia*, 174–183.
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Cheval, B. & Auger, P. (2003). Morphometric variation between populations of *Kampimodromus aberrans* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae): implications for the taxonomy of the genus. *Inv. Syst.* **17**, 349-358.
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Ferragut, F. & Cheval, B. (2006a). The suspected synonymy of *Kampimodromus hmiminai* McMurtry and *K. adrianae* (Acari:

- Phytoseiidae): morphological and molecular investigations. *Can. J. Zool.* **84**, 1216-1222.
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Barbar, Z., Ragusa, S. & Cheval, B. (2006b). The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy. *Zool. Scr.* **35**, 115-122.
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Croft, B.A. & Cheval, B. (2008a). *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) from USA: morphological and molecular assessment of its identity. *Bull. Entomol. Res.* **98**, 125-134.
- Tixier, M.S., Guichou, S. & Kreiter, S. (2008b). Morphological variation of the species *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae): importance for diagnostic reliability and synonymies. *Inv. Syst.* **22**, 453–469.
- Tixier, M.S., Ferrero, M., Okassa, M., Guichou, S. & Kreiter, S. (2010). On the specific identity of specimens of *Phytoseiulus longipes* Evans (Mesostigmata: Phytoseiidae) showing different feeding behaviours: morphological and molecular analyses. *Bull. Entomol. Res.* **100** (5), 569-579.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y. & Vieites D.R. (2005a). Comparative performance of 16S rRNA in DNA barcoding of amphibians. *Front. Zool.* **2**, 1-12.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R.M. & Vieites, D.R. (2005b). Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **360**, 1859–1868.
- Woide, D., Zink, A. & Thalhammer S. (2010). Technical note: PCR analysis of minimum target amount of ancient DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.* **142**, 321-327.

**CHAPITRE IV. LA DISTINCTION
D'ESPECES MORPHOLOGIQUEMENT
PROCHES**

CHAPITRE IV. PARTIE A. LA DISTINCTION DE DEUX ESPECES PROCHES ET LA DECOUVERTE D'UNE NOUVELLE ESPECE

La découverte de nouvelles espèces constitue l'un des autres challenges du barcoding, ceci afin d'accélérer le décompte de la biodiversité dans un contexte où beaucoup de scientifiques s'accordent sur le fait que près de 20 % de la biodiversité aura disparue au milieu de ce siècle (voir chapitre II.A § 2.2).

Les espèces de la famille des Phytoseiidae sont considérées comme des morpho-espèces. De ce fait, leur identification et leur description sont souvent difficiles notamment lorsque les caractères discriminants sont difficiles à observer (Tixier *et al.*, 2003b, 2006a). Dans ce contexte, l'utilisation du barcoding permettrait d'accélérer le décompte de la biodiversité par la découverte de nouvelles espèces que les caractères habituellement utilisés dans le diagnostic morphologiques ne permettent pas de distinguer clairement. Il est vrai que la synonymie (~ 10 %) au sein de la famille des Phytoseiidae semble moins répandue que pour d'autres groupes taxonomiques appartenant à l'embranchement des Arthropodes (Moraes *et al.*, 2004 ; Chant et McMurtry, 2007). Cependant, l'importance agronomique de plusieurs espèces de cette famille impose l'absence d'erreur d'identification pour les professionnels qui les utilisent. Chaque espèce présente en effet ses propres attributs biologiques et écologiques, qui déterminent le succès des programmes de lutte biologique dans lesquels ces auxiliaires sont utilisés.

IV.A.1. Objectifs de l'étude

Nous nous sommes intéressés dans cette partie du chapitre III à l'identité d'individus appartenant au genre *Euseius* Wainstein collectés sur quatre espèces végétales en France. Au sein du genre *Euseius*, trois espèces sont répandues dans la région Ouest-paléarctique. Il s'agit d'*Euseius stipulatus* (Athias-Henriot), *Euseius finlandicus* (Oudemans) et *Euseius scutalis* (Athias-Henriot) (Ferragut et Escudero, 1997; Moraes *et al.*, 2004).

Les spécimens collectés se sont avérés être morphologiquement très différents d'*E. scutalis* et *E. finlandicus*, notamment pour les caractères suivants : longueurs de certaines soies du bouclier dorsal, longueur du péritrème et la forme de la

spermathèque. Ces caractères sont généralement utilisés pour différencier les espèces au sein de la famille des Phytoseiidae (Chant et McMurtry, 1994, 2006a,b). Ces spécimens étaient morphologiquement très similaires à *E. stipulatus*. Les différences les plus marquées entre cette dernière espèce et les spécimens collectés étaient la forme de la spermathèque et la réticulation du bouclier dorsal. Or la réticulation n'est jamais utilisée comme critère de diagnostic unique. De plus, les différences de la forme de la spermathèque étaient relativement ténues, concernant la forme du calyx (droit ou en « trompette »). Même si la forme de la spermathèque est un critère important pour le diagnostic (Athias-Henriot, 1968, 1969 ; Denmark, 1992 ; Tixier *et al.*, 2006a), il est difficile de déterminer à partir de quelle différence de forme des individus n'appartienne plus à la même espèce. De plus, la spermathèque était présentée comme un caractère peu discriminant par certains auteurs (Moraes, communication personnelle).

Cette étude a eu pour objectif de déterminer le statut des spécimens collectés, appelés dans la suite du document *Euseius* sp. Afin de répondre à cette interrogation, des études moléculaires et morphologiques ont été réalisées.

IV.A.2. Position taxonomique de *Euseius stipulatus* (Athias-Henriot)

Euseius stipulatus a été décrite sous le nom de *Amblyseius stipulatus* à partir de spécimens femelles collectés par Athias-Henriot sur des citronniers en 1960 en Algérie. Cette espèce appartient à la sous famille des Amblyseiinae, à la tribu des Euseiini et au genre *Euseius* Wainstein qui comprend actuellement 187 espèces décrites (Moraes *et al.*, 2004; Chant et McMurtry, 2007). L'identification des espèces de ce genre est difficile du fait : (1) d'une grande variation des longueurs de soies au sein d'une même espèce ; et (2) de l'absence de clé d'identification au sein de ce genre très diversifié.

IV.A.3. Quelques caractéristiques biologiques d'*Euseius stipulatus*

IV.A.3.1. Type de prédation

Euseius stipulatus appartient à la catégorie fonctionnelle du type IV, selon la classification des espèces de Phytoseiidae proposée par McMurtry et Croft (1997). Cette espèce est polyphage, mais son taux intrinsèque d'accroissement potentiel, comme pour de nombreuses espèces du genre *Euseius*, est plus élevé lorsqu'il

s'alimente avec du pollen plutôt qu'avec des proies (Abou-Setta et Childers, 1987 ; Ferragut *et al.*, 1987 ; McMurtry et Rodriguez, 1987 ; Abou-Setta et Childers, 1989 ;).

IV.A.3.2. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio

❖ Dans des conditions optimales (20 ± 1 °C, 65 ± 5 % d'hygrométrie relative, photopériode J : N 16 : 8), la durée de développement du stade œuf au stade adulte est dépendante des espèces de proies ou du type de pollen consommé. La durée de développement est en effet relativement longue, lorsqu'il consomme du pollen de pommier ($9,14 \pm 0,09$ jours) ou de noyer ($9,58 \pm 0,11$ jours), et plus courte avec du pollen d'amandier ($8,38 \pm 0,08$ jours), de poirier ($8,39 \pm 0,08$ jours), d'abricotier ($8,70 \pm 0,08$ jours), de prunier ($8,89 \pm 0,09$ jours) ou de cerisier ($8,47 \pm 0,11$ jours) (Bouras *et al.*, 2005). Elle varie aussi selon qu'il consomme du pollen de *Carpobrotus edulis* (L.) (5,5 jours), tous les stades de développement de *Panonychus citri* (McGregor) (6,9 jours) et de *T. urticae* Koch (9,2 jours), des œufs de *Aleurothrixus floccosus* (Maskell) (9,1 jours) ou du miellat sécrété par *A. floccosus* (9,7 jours) (Ferragut *et al.*, 1987).

❖ Dans des conditions optimales de développement, le taux de fécondité est aussi dépendant du type de proies ou de la variété de pollen consommé. Une étude a permis d'observer que le taux de fécondité était plus élevé lorsqu'*E. stipulatus* consommait du pollen de *C. edulis* ($1,81 \pm 0,2$ œufs) que *P. citri* ($1,21 \pm 0,2$ œufs) (Ferragut *et al.*, 1987).

Lorsque *T. urticae* est proposée comme unique source de nourriture à *E. stipulatus*, une forte mortalité des stades juvéniles, une augmentation de la durée de développement, une baisse de la fécondité des femelles et de la longévité des adultes ont été observés, comparativement à d'autres sources d'alimentation (McMurtry *et al.*, 1970 ; Ferragut *et al.*, 1987 ; Bouras et Papadoulis, 2005 ; Abad-Moyano *et al.*, 2009).

❖ Enfin, la sex ratio est biaisée en faveur des femelles, comme pour la plupart des espèces de Phytoseiidae (Helle et Sabelis, 1985a). Cette valeur est supérieure à 60 % dans des conditions optimales de développement, quelle que soit la variété de pollen consommée (Ferragut *et al.*, 1987 ; Bouras et Papadoulis, 2005).

IV.A.4. Importance de cette espèce en lutte biologique

Euseius stipulatus permet de lutter efficacement contre *P. citri* dans des vergers d'agrumes en Espagne (Garcia-Mari *et al.*, 1983, 1986 ; Ferragut *et al.*, 1988, 1992; Urbaneja *et al.*, 2008). Cette espèce est naturellement présente dans ces vergers et dans leur environnement non cultivé, dans la région méditerranéenne (Moraes *et al.*, 2004). Le maintien de cette espèce dans l'environnement non cultivé des parcelles ainsi que dans les parcelles est un élément important pour limiter la présence des acariens ravageurs dans les vergers (Ferragut *et al.*, 1988 ; Urbaneja *et al.*, 2008). Pour cela, on favorise la présence de certaines variétés de plantes (au pollen favorable) autour des vergers de Citrus dans certains pays (Grafton-Cardwell *et al.*, 1997).

IV.A.5. Distribution géographique

Euseius stipulatus est présente sur la végétation spontanée et dans les parcelles cultivées dans la région Ouest-Paléarctique (Moraes *et al.*, 1986, 2004).

Euseius stipulatus a été introduite dans la région Néarctique, dans le sud de la Californie, pour lutter contre *P. citri*. *Euseius stipulatus* est la seule espèce de type IV à avoir pu s'établir dans une région dont elle n'était pas originaire, en prenant le dessus sur l'espèce native : *Euseius hibisci* (Chant, 1959) dans les vergers d'agrumes californiens (McMurtry, 1992).

IV.A.6. Populations et espèces étudiées

Quatre populations d'*Euseius* sp. originaires de France et deux populations de *E. stipulatus* originaires de France et d'Espagne ont été pris en considération dans cette étude. Des mesures morphométriques de trente-quatre caractères continus ont été effectuées sur vingt-cinq spécimens de *E. stipulatus* et cent-seize spécimens de *Euseius* sp. Les analyses moléculaires ont été effectuées avec deux marqueurs mitochondriaux. Nous avons analysé: quinze spécimens pour le marqueur 12S (420 pb) et dix spécimens pour le COI (416 pb). Pour déterminer les distances génétiques interspécifiques, l'espèce témoin *E. finlandicus* a été choisie. Cette dernière espèce se distingue facilement des deux autres (*Euseius* sp. et *E. stipulatus*) par les longueurs de certaines soies du bouclier dorsal, la forme de la spermathèque et la longueur du péritrème.

IV.A.7. Article 2. Okassa M., Tixier M.-S., Kreiter S. 2009. Molecular and morphological evidence for a new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). *Canadian Journal of Zoology* 87, 689-698.

Abstract

The identity of specimens belonging to the genus *Euseius* Wainstein, 1962 found on several trees in France is investigated. These specimens are morphologically close to *Euseius stipulatus* (Athias-Henriot, 1960) except for the shape of the spermatheca and the dorsal shield reticulation. The aim of the present study was to determine if these specimens belong to this latter species and thus if the shape of the spermatheca could be considered as a reliable diagnostic character. Thirty-four characters, including idiosomal seta lengths, were measured and molecular tests (12S rDNA, COI mtDNA) were carried out. Even though tiny, significant differences between the populations of *Euseius* sp. were observed. The morphometric differences between *E. stipulatus* and *Euseius* sp. were very small except for the seta z2 and for the length of the ventrianal shield and the length and form of the spermatheca. Molecular analyses support that *Euseius* sp. and *E. stipulatus* are two different species and *Euseius* sp. has been described as a new species to science in another publication under the name *Euseius gallicus*. Reliability of some morphological characters for species diagnosis is discussed.

Key-words : *Euseius stipulatus*, cervix, morphology, 12S rDNA, COI mtDNA

Résumé

L'identité d'individus appartenant au genre *Euseius* Wainstein 1962 collectés sur quatre espèces d'arbres en France est étudiée. Ces spécimens sont morphologiquement très proches de *Euseius stipulatus* excepté pour la forme de la spermathèque et la réticulation du dorsum. Le but de cette étude est de déterminer si ces spécimens appartiennent à cette dernière espèce et par conséquent, si la forme de la spermathèque peut être utilisée comme un critère diagnostique fiable. Trente-quatre caractères, dont la longueur des soies de l'idiosoma, ont été mesurés et des tests moléculaires (12S rDNA, COI mtDNA) ont été réalisés. De faibles différences, bien que significatives, ont été observées entre les différentes populations de

Euseius sp. Les différences morphologiques entre *E. stipulatus* et *Euseius* sp. se sont également révélées très faibles, exceptés pour les longueurs de la soie z2, de la plaque ventrianale et la longueur et la forme de la spermathèque. Cependant, les tests moléculaires montrent que *Euseius* sp. and *E. stipulatus* sont deux espèces différentes. Les spécimens de *Euseius* sp. ont été décrits comme une nouvelle espèce pour la science dans une autre publication sous le nom d'*Euseius gallicus*. Une discussion sur la pertinence des caractères morphologiques pour la diagnose des espèces de Phytoseiidae est proposée.

Mots-clefs : *Euseius stipulatus*, cervix, morphologie, 12S rDNA, COI mtDNA

Introduction

Several species in the family Phytoseiidae are important natural enemies controlling mite pest outbreaks in many crops (McMurtry and Croft 1997). Their identification is thus of great interest in biological control and sustainable crop production. This family is widespread all over the world and consists of around 2,000 valid species contained in three sub-families (Kreiter and Tixier 2006; Chant and McMurtry 2007). Species identification in the Phytoseiidae is based on several characters such as dorsal seta lengths, leg chaetotaxy, spermatheca shape, and cheliceral dentition (i.e. Chant and McMurtry 1994; 2005; 2006). However, the diagnostic value of these characters have been poorly tested and intraspecific variations could lead to misidentification and to description of new species that are actually variation clines of a known one (McMurtry *et al.*, 1976; Hoying and Croft 1977; Mahr and McMurtry 1979; McMurtry and Badii 1989; Messing and Croft 1991; Tixier *et al.*, 2003; Da Silva Noronha and Moraes 2004; Tixier *et al.* 2006a, b). This study focuses on the identity of specimens of the genus *Euseius* Wainstein 1962 (hereafter referred to *Euseius* sp.) found in France. Only three species are known from the West part of the Palaearctic region: *Euseius stipulatus* (Athias-Henriot, 1960), *Euseius finlandicus* (Oudemans, 1915) and *Euseius scutalis* (Athias-Henriot, 1958) (Ferragut and Escudero 1997; Moraes *et al.* 2004). The specimens of *Euseius* sp. found in France clearly differ from *E. finlandicus* and *E. scutalis*, by the shape of the spermatheca, the lengths of both peritreme and of some dorsal setae. However, they were quite similar to *E. stipulatus*, differing by the terminal shape of the calyx of the spermatheca (Fig. 1), the

dorsal shield reticulation (Fig 2) and the ventrianal shield dimensions (Fig. 3). As the reliability of these characters for species identification can be variable according to the authors (Athias-Henriot 1969; Chant and McMurtry 1994, 2007), no clear conclusion could be given about the species status of the specimens found in France. In order to solve this taxonomic question, morphological and molecular investigations have been carried out.

Material and methods

The populations studied. Four populations of *Euseius* sp. were collected in Montpellier (Hérault, South of France) on four plant species: large-leaved summer linden (*Tilia platyphyllos* Scopoli, 1771), sour cherry (*Prunus cerasus* L., 1753), horse chesnut (*Aesculus hippocastanum* L., 1753) and laurustinus (*Viburnum tinus* L., 1753). A population of *E. stipulatus* was collected also in Montpellier on lemon (*Citrus limon* N.L. Burmen, 1768). For molecular experiments, additional specimens of *E. stipulatus* collected on *Citrus* sp. in Valencia (Spain) were studied as well as specimens of *E. finlandicus* collected on sour cherry in Burgundy (France) (Table 1). The mites were collected directly from leaves with a fine and clean hairbrush and immediately put in alcohol (100 %) plastic vials.

Table 1. Characteristics of collection localities of the different populations of *Euseius* sp. and *Euseius stipulatus* studied.

| Species | Country | Locality | Host plant | Date of collection | Nb of females. | Acession nbs COI | Acession nbs 12S |
|----------------------------|---------|-------------|-------------------------------|--------------------|----------------|------------------|------------------|
| <i>Euseius</i> sp. | France | Montpellier | <i>Viburnum tinus</i> | 2007 | 25 | FJ404589 | FJ404569 |
| | | | | | | FJ404590 | FJ404570 |
| | | | | | | | FJ404571 |
| | | | | | | | FJ404572* |
| <i>Euseius</i> sp. | France | Montpellier | <i>Tilia platyphyllos</i> | 2007 | 30 | | FJ404563 |
| <i>Euseius</i> sp. | France | Montpellier | <i>Prunus cerasus</i> | 2007 | 30 | FJ404581 | FJ404564 |
| | | | | | | FJ404582 | FJ404565 |
| <i>Euseius</i> sp. | France | Montpellier | <i>Aesculus hippocastanum</i> | 2007 | 31 | FJ404585 | FJ404566 |
| | | | | | | FJ404586 | FJ404567 |
| | | | | | | | FJ404568 |
| <i>Euseius stipulatus</i> | France | Montpellier | <i>Citrus</i> sp. | 2007 | 25 | FJ404583 | FJ404573 |
| | | | | | | FJ404584 | FJ404574 |
| | | | | | | | FJ404575 |
| <i>Euseius stipulatus</i> | Spain | Valencia | <i>Citrus</i> sp. | 2007 | | FJ404587 | FJ404576 |
| | | | | | | FJ404588 | FJ404577 |
| <i>Euseius finlandicus</i> | France | Burgundy | <i>Prunus cerasus</i> | 2007 | | FJ404591 | FJ404578 |
| | | | | | | FJ404592 | FJ404579 |
| | | | | | | FJ404593 | FJ404580 |

Morphological analysis. Terminology for setal notation used in this paper follows that of Lindquist and Evans (1965) as adapted by Rowell et al. (1978) for the Phytoseiidae. As dorsal seta lengths are usually considered in phytoseiid mite taxonomy, the 19 dorsal idiosomal setae of the females collected were measured. Other characters, such as the lengths of seta JV5, of the macroseta on the basitarsus IV, of the spermatheca and the dimensions (length and width) of the dorsal shield and of the three ventral shields of the female were also taken into account. All values of measurements are given in micrometers. At least 25 females per strain were mounted on slides in Hoyer's medium and measured with a phase and differential interference contrast microscope (Leica DMLB, Leica Microsystèmes SAS, Rueil-Malmaison, France) (40x magnification). The type of *E. stipulatus* (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France) was also examined.

Anova (and Newman and Keuls mean comparison test) (StatSoft France 2005) was performed to determine differences in measurements between the different populations and species studied. A multifactorial analysis was processed to determine whether the combination of the morphological characters can differentiate the populations and species considered.

Molecular analysis. DNA was individually extracted from several females per strain, according to the DNA extraction protocol described in Tixier et al. (2006b). Two mitochondrial DNA markers were used (12S rDNA and COI mtDNA), as previous data have shown their utility for assessing mite and insect synonymies (Simon et al. 1994; Murrel et al. 2001; Jeyaprakash and Hoy 2002; Tixier et al. 2006a, 2008). The number of specimens analysed per species and population with both fragments, and the accession numbers of the sequences submitted to GenBank are reported in the table 1.

The primers used to amplify the 12S rDNA fragment, were those proposed by Jeyaprakash and Hoy (2002): 5'-3' TACTATGTTACGACTTAT and 3'-5' AAAGTAGGATTAGATACCC. The primers used to amplify the COI mtDNA were those proposed by Navajas *et al.* (1996) 5'-3' TGATTTTTTGGTCACCCAGAAG and 3'-5' TACAGCTCCTATAGATAAAAC. PCR was carried out in a total volume of 25 µl containing 2 µl of mite DNA, 1 µl of DNTP (2.5 Mm for each nucleotide), 2.5 µl of Taq buffer, 1 µl of each primer (100 µM), 0.5 µl of Taq (Qiagen, 5 U / µl) and 18.9 µl of water. Thermal cycling conditions were as follows: 95 °C for 1 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 40 °C for 30 s and 72 °C for 1 min for the 12S rDNA marker and 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 92 °C for 1 min, 45 °C for 30 s and 72 °C for 1 min for the COI mtDNA marker. An additional 5 min at 72 °C was added for final strand elongation. Electrophoresis was carried out on 1.5 % agarose gel in 0.5 X TBE buffer during 30 min at 100 volts. PCR products were sequenced using the dynamic ET terminator cycle sequencing kit. Purification of DNA was carried out with Exosap-IT (Amersham). The sequencer used was the Megabase 1,000 apparatus. All DNA fragments were sequenced along both strands. Sequences were checked and read manually using Mega3.1[®] (Kumar et al. 2008), then aligned using ClustalW[®] (1997) (Higgins et al. 1994) and analysed with Mega3.1[®] (Kumar et al. 2008). The distance matrices was constructed using the Jukes and Kantor model as

the rate transition / reversion is 1. Neighbour Joining trees were constructed with a 1,000 bootstrap.

Results and discussion

Morphological analysis. Significant differences in the measurements of the four populations of *Euseius* sp. were observed. However, these differences were very small and the standard errors within the strains were low (Table 2). The individuals collected on *T. platyphyllos* have usually lower values for almost all the variables measured. Many characters were significantly different between *E. stipulatus* and *Euseius* sp. (Table 2), but these differences are usually very low. For most of the characters, the measurements of *E. stipulatus* are included in the range of variation of the specimens of *Euseius* sp. The characters for which a considerable difference is observed are the lengths of seta z2 and of the ventrianal shield. The ratio: length of the ventrianal shield / width of the ventrianal shield at the level of anus is also quite different (1.30 for *Euseius* sp. and 1.44 for *E. stipulatus*) essentially due to the higher length of the ventrianal shield for *E. stipulatus*. The length and the shape of the spermatheca are also different between *E. stipulatus* and *Euseius* sp.. Moreover, in *E. stipulatus*, the side walls of the calyx are more parallel than for *Euseius* sp., as well the embolus is more prominent in *E. stipulatus* than in *Euseius* sp. (Fig. 1). On the axis 1 of the multifactorial analysis, the populations are not well separated except for some individuals mainly collected on *T. platyphyllos* (Fig. 4). On the axis 2 explained by the lengths of the seta j6, of the ventrianal shield and the spermatheca, *E. stipulatus* is well separated from *Euseius* sp. Even if morphological differences between *E. stipulatus* and *Euseius* sp. are observed, they are quite small and their reliability for supporting species status is still questioned.

Table 2. Mean, Min, Max, Standard Error (SE) for the 4 strains of *Euseius* sp. and *E. stipulatus* and results of the ANOVA. The letters show the differences of the Newman and Keuls test (DSL: dorsal shield length, DSW: dorsal shield width, VAS: ventrianal shield)

| Populations | <i>Euseius</i> sp. | | | | | <i>P. cerasus</i> | | | | | <i>A. hippocastanum</i> | | | | | <i>V. tinus</i> | | | | | | |
|--|--------------------|-----|-----|-------|-------|-------------------|-----|------|-------|-------|-------------------------|-----|-----|------|------|-----------------|-----|------|------|------|------|-----|
| | Mean | Min | Max | SE | | Mean | Min | Max | SE | | Mean | Min | Max | SE | | Mean | Min | Max | SE | | Mean | Min |
| DSL | 315.2 | b | 2.9 | 258.9 | 351.5 | 341.8 | b | 2.8 | 300 | 364 | 339.1 | b | 2.8 | 308 | 370 | 339.1 | b | 3.1 | 299 | 355 | | |
| DSW | 215.2 | b | 2.6 | 178.9 | 248.9 | 228.9 | a | 2.5 | 192 | 247 | 231.1 | a | 2.5 | 199 | 253 | 226.5 | a | 2.8 | 203 | 243 | | |
| J1 | 32.6 | b | 0.6 | 24.5 | 37.8 | 32.7 | b | 0.7 | 21.9 | 39.2 | 33.6 | ab | 0.6 | 25.4 | 39.8 | 32.4 | b | 0.7 | 27.1 | 36.8 | | |
| J3 | 32.6 | b | 0.8 | 23.3 | 41.2 | 34.5 | b | 0.7 | 26 | 40.8 | 34.7 | b | 0.7 | 27.7 | 41.7 | 33.0 | b | 0.8 | 24.1 | 37.6 | | |
| J4 | 12.1 | b | 0.4 | 8.8 | 16.7 | 14.7 | a | 0 | 10.13 | 20.37 | 13.6 | a | 0.3 | 7.96 | 18.2 | 13.7 | a | 0.4 | 9.2 | 19.9 | | |
| J5 | 13.5 | c | 0.3 | 10.3 | 15.6 | 15.9 | a | 0.3 | 12.1 | 19.3 | 14.8 | b | 0.3 | 9.2 | 19.9 | 15.7 | ab | 0.3 | 12.3 | 18 | | |
| J6 | 15.2 | b | 0.4 | 11.0 | 20.2 | 18.6 | a | 0.4 | 13.4 | 22 | 17.5 | a | 0.4 | 10.9 | 22.4 | 17.9 | a | 0.5 | 13.1 | 20.4 | | |
| J2 | 16.2 | b | 0.4 | 12.2 | 19.6 | 19.6 | a | 0.4 | 15.4 | 23.7 | 18.7 | a | 0.4 | 11.4 | 24.3 | 18.3 | a | 0.5 | 16.1 | 21.7 | | |
| J5 | 5.0 | | 0.2 | 3.0 | 6.6 | 5.6 | | 0.2 | 4.06 | 7.06 | 5.6 | | 0.2 | 4.14 | 7.69 | 5.0 | | 0.3 | 3.99 | 7.64 | | |
| Z2 | 26.9 | b | 0.6 | 20.3 | 34.69 | 29.8 | a | 1 | 21 | 34 | 30.9 | a | 0.6 | 22.7 | 37.5 | 29.2 | ab | 0.7 | 25.2 | 33.5 | | |
| Z4 | 28.8 | b | 0.7 | 22.9 | 35.8 | 32.3 | a | 1 | 21 | 40 | 32.0 | a | 0.7 | 24 | 39.1 | 32.5 | a | 0.8 | 28.1 | 39.6 | | |
| Z5 | 12.8 | b | 0.4 | 8.3 | 17.7 | 14.4 | a | 0.4 | 11.8 | 17.6 | 13.5 | ab | 0.4 | 10.8 | 18.8 | 14.1 | a | 0.4 | 9.52 | 18.3 | | |
| Z1 | 15.8 | b | 0.4 | 11.0 | 21.2 | 18.7 | a | 0.4 | 14.2 | 21.2 | 17.8 | a | 0.3 | 13.3 | 21.3 | 17.7 | a | 0.4 | 13.8 | 21.3 | | |
| Z4 | 17.6 | b | 0.4 | 13.3 | 22.2 | 19.5 | a | 0.4 | 15.8 | 23.2 | 18.2 | ab | 0.4 | 12.8 | 24 | 19.3 | a | 0.5 | 15.5 | 25.3 | | |
| Z5 | 55.0 | | 0.9 | 47.1 | 62.3 | 55.0 | | 0.9 | 44.6 | 62.5 | 54.7 | | 0.9 | 42.3 | 60.7 | 52.3 | | 0.9 | 34.8 | 60.8 | | |
| S4 | 36.1 | b | 0.7 | 30.3 | 44.7 | 42.7 | a | 0.7 | 30.7 | 49.4 | 43.0 | a | 0.7 | 29.7 | 52.1 | 41.8 | a | 0.8 | 37.8 | 46.4 | | |
| S2 | 20.5 | b | 0.4 | 16.1 | 25.3 | 22.6 | a | 0.44 | 17 | 26 | 22.5 | a | 0.4 | 15.9 | 28.2 | 22.2 | a | 0.5 | 18.6 | 26.6 | | |
| S4 | 21.4 | c | 0.4 | 18.3 | 25.2 | 23.1 | b | 0.4 | 18.4 | 27.5 | 22.9 | ab | 0.4 | 18.4 | 28.8 | 22.5 | ab | 0.5 | 18.9 | 25.4 | | |
| S5 | 25.6 | b | 0.6 | 20.4 | 31.1 | 28.9 | a | 0.7 | 20.4 | 35.7 | 29.0 | a | 0.6 | 19 | 35.7 | 28.1 | ab | 0.7 | 24.9 | 32 | | |
| r3 | 15.4 | bc | 0.4 | 11.9 | 19.5 | 15.9 | c | 0.4 | 12.1 | 19.4 | 14.7 | c | 0.4 | 11.8 | 17.8 | 16.3 | c | 0.5 | 12.6 | 21.1 | | |
| R1 | 15.0 | a | 0.3 | 12.6 | 17.3 | 15.4 | a | 0.3 | 12.7 | 17.8 | 15.5 | a | 0.3 | 11.8 | 19.6 | 15.4 | a | 0.4 | 11.4 | 18.1 | | |
| S11-S11 | 54.0 | c | 0.5 | 48.6 | 59.2 | 58.1 | b | 0.5 | 51.1 | 62.4 | 57.2 | b | 0.5 | 51.7 | 63.6 | 58.1 | b | 0.5 | 53.6 | 60.7 | | |
| S12-S12 | 60.7 | c | 0.5 | 56.3 | 64.5 | 67.3 | b | 0.5 | 58.5 | 72.3 | 66.8 | b | 0.5 | 58.1 | 73 | 66.5 | b | 0.6 | 62.7 | 71 | | |
| S13-S13 | 72.7 | c | 0.6 | 65.4 | 77.9 | 78.0 | b | 0.6 | 70.2 | 85.1 | 77.8 | b | 0.6 | 70.7 | 83.8 | 77.7 | b | 0.7 | 73.1 | 83.2 | | |
| S11-S13 | 61.1 | b | 0.5 | 55.7 | 66.2 | 64.2 | a | 0.5 | 56.3 | 68.7 | 63.0 | a | 0.5 | 57.5 | 72.6 | 63.8 | a | 0.5 | 59.7 | 66.7 | | |
| S14-S14 | 86.0 | c | 1.5 | 67.7 | 103.4 | 98.2 | a | 1.5 | 81 | 120 | 96.7 | b | 1.5 | 82.5 | 101 | 92.4 | b | 1.6 | 77 | 108 | | |
| S15-S15 | 72.8 | bc | 0.9 | 61.8 | 86.0 | 74.9 | a | 0.9 | 64.1 | 84 | 73.2 | bc | 0.9 | 64.9 | 87.1 | 74.5 | 1.1 | 70.8 | 79.3 | | | |
| S12-S13 | 25.8 | bc | 0.4 | 21.4 | 29.4 | 27.9 | a | 0.4 | 22.5 | 36.8 | 26.3 | bc | 0.4 | 22.4 | 21.4 | 27.1 | ab | 0.4 | 23.3 | 29.2 | | |
| length of VAS at width of VAS at ZV2 level | 94.5 | c | 1 | 79.3 | 106.0 | 100.7 | b | 1 | 90.6 | 113 | 100.0 | b | 1.1 | 90.1 | 10.7 | 99.9 | b | 1.3 | 93.4 | 104 | | |
| width of VAS at anus level | 46.7 | c | 0.8 | 40.9 | 52.4 | 52.5 | b | 0.8 | 41.8 | 66.3 | 52.6 | ab | 1 | 47.6 | 63.5 | 48.4 | bc | 1 | 43.3 | 51.8 | | |
| width of VAS at JV5 | 74.8 | ab | 0.9 | 61.2 | 83.9 | 76.5 | a | 1 | 68.5 | 82.7 | 76.4 | a | 1.1 | 64 | 86.9 | 76.4 | a | 1.2 | 72.8 | 83.5 | | |
| JV5 | 39.2 | a | 0.8 | 31.5 | 48.1 | 40.0 | a | 0.8 | 29.7 | 49.2 | 41.4 | a | 0.9 | 33.2 | 48.7 | 40.0 | a | 0.9 | 32.7 | 44.7 | | |
| StV | 59.1 | a | 1.1 | 49.1 | 69.8 | 57.7 | ab | 1.1 | 39.4 | 68.3 | 58.8 | a | 1.3 | 46.6 | 71.3 | 56.7 | ab | 1.2 | 41 | 67.2 | | |
| length of spermatheca | 16.6 | b | 0.4 | 14.7 | 19.0 | 16.3 | b | 0.5 | 10.7 | 20.2 | 16.0 | b | 1.2 | 12.1 | 19 | 17.0 | b | 0.5 | 13.2 | 21.4 | | |

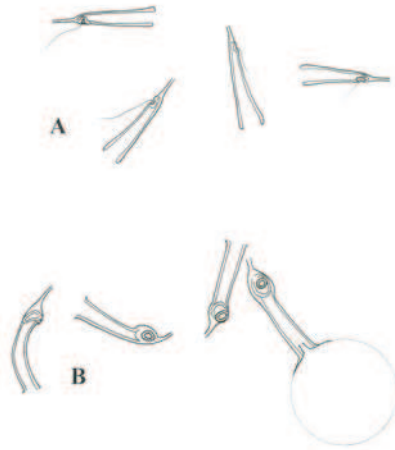


Figure 1. Spermatheca shape of *Euseius gallicus* n. sp.(A) and *Euseius stipulatus* (B)

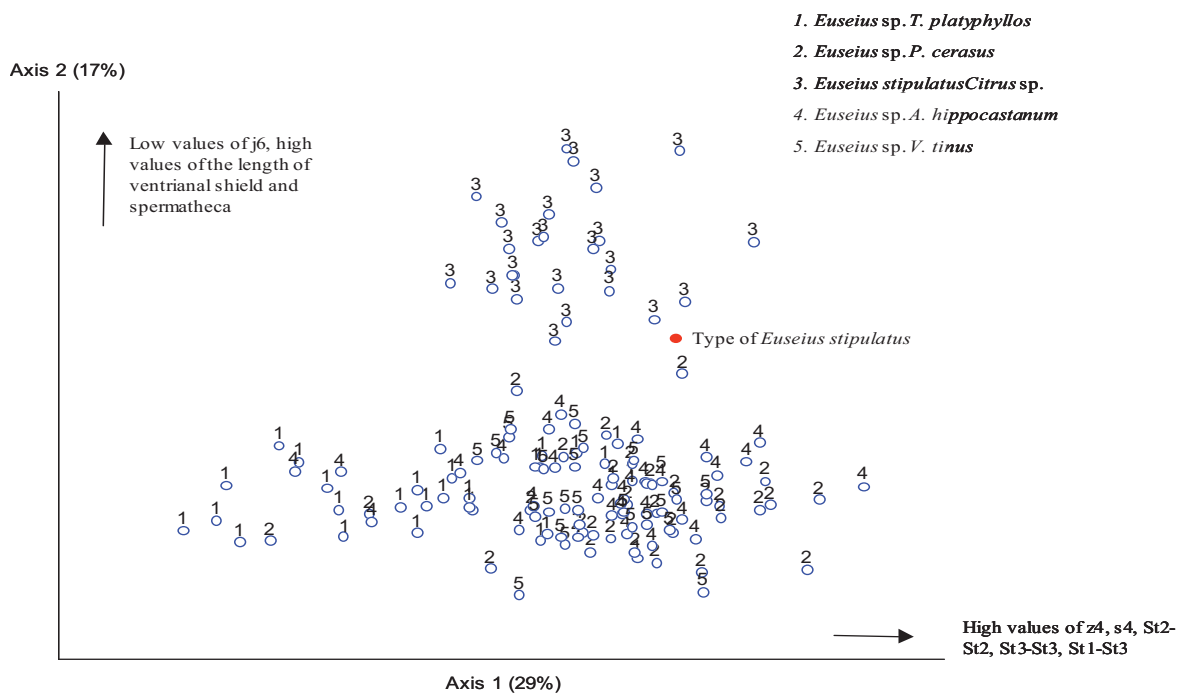
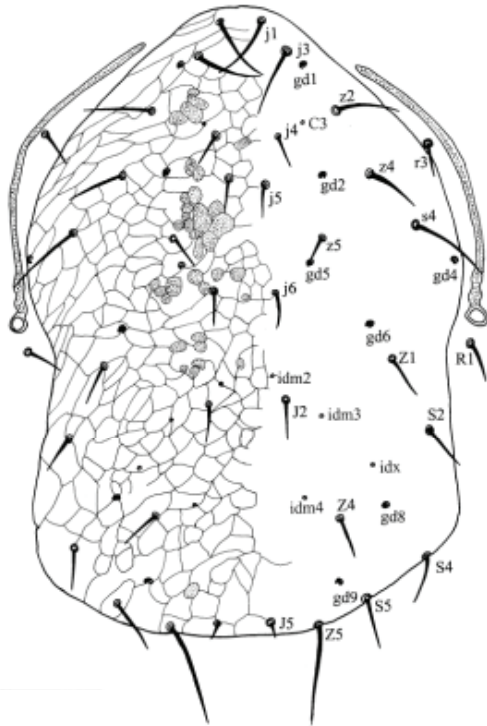


Figure 4. Multifactorial analysis based on setae lengths of the specimens of *Euseius* sp. collected on *T. platyphyllos*, *P. cerasus*, *A. hippocastanum* and *V. tinus*, of *Euseius stipulatus* collected on *C. lemon* in France and the type of *E. stipulatus*

Figure 2

(A)

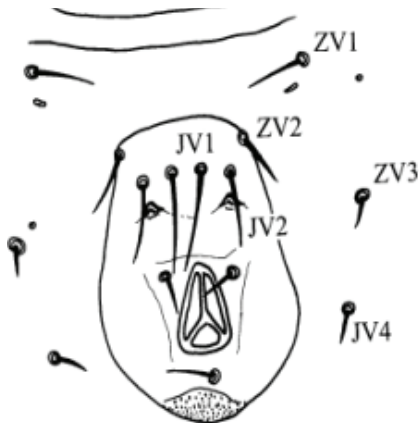


(B)



Figure 3

(A)



(B)



Figure 2. Dorsal shield reticulation of *Euseius gallicus* n.sp. (A) and *Euseius stipulatus* (B)

Figure 3. Ventrional shield of *Euseius gallicus* n.sp. (A) and *Euseius stipulatus* (B)

Molecular analyses. A fragment of 392 bp and 432 bp were amplified for the 12S rDNA and COI mtDNA, respectively. DNA analysis showed quite similar rates of the different nucleotide and these rates are constant for all populations and species studied. Among the 392 bp and 432 bp amplified, 377 and 428 were aligned for the 12S rDNA and COI mtDNA, respectively. A blast search in the Genbank database shows that the sequences blast with other COI mtDNA and 12S rDNA sequences of Phytoseiidae. The Neighbour Joining trees obtained both with the COI mtDNA and the 12S rDNA markers show three groups sustained by a bootstrap value of 100 (Figs. 5a, b). A first group includes all the specimens of *Euseius* sp. The genetic distances obtained with the two molecular markers between these specimens are very small (ranging from 0 to 0.2 % for the two DNA fragments) (Tables 3, 4). A second group includes the specimens of *E. stipulatus* (from France and Spain) and one specimen collected on *V. tinus* in France (for the 12S rDNA fragment analysis). The genetic distances between these specimens are also very small (ranging from 0 to 1,4 % for the two DNA markers). A third group includes the specimens of *E. finlandicus* and the genetic distances between them range between 2 and 3 % for the 12S rDNA marker and between 1.4 and 5 % for the COI mtDNA marker. The genetic distances between these three groups are high and no overlapping between intra- and interspecific distances is observed: *E. stipulatus* – *E. finlandicus*: 12S rDNA: 16-17 %, COI mtDNA: 22-25 %; *E. finlandicus* – *Euseius* sp.: 12S rDNA: 20-22 %, COI mtDNA: 17-19 %; *E. stipulatus* – *Euseius* sp.: 12S rDNA: 14 %; COI mtDNA: 20-21 %. The distances between *E. stipulatus* and *Euseius* sp. are thus as high as distances between two valid species (*E. stipulatus* and *E. finlandicus*). *Euseius* sp. and *E. stipulatus* could thus be considered as two different valid species. One specimen collected on *V. tinus* was assigned to *E. stipulatus* with the 12S rDNA marker. It seems thus that on this plant, the two species could be present at the same time even if the density of *E. stipulatus* is very low.

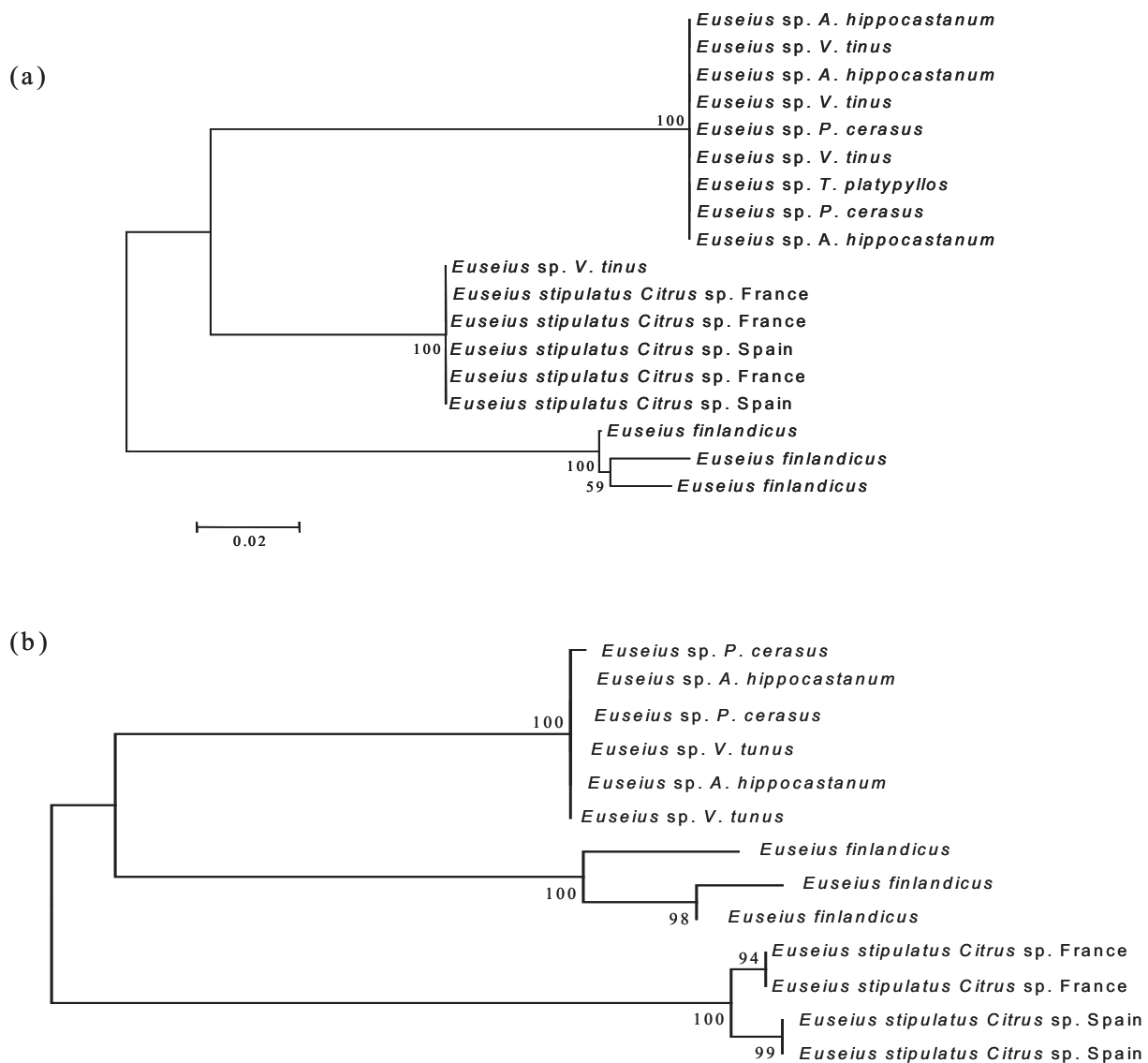


Figure 5. Neighbour joining trees based on genetic distances between the specimens of *Euseius* sp. collected on *T. platyphyllos*, *P. cerasus*, *A. hippocastanum* and *V. tinus*, *Euseius stipulatus* collected on *C. lemon* in France and Spain and *Euseius finlandicus* collected on *P. cerasus* in Burgundy, France; with (a) the 12S rDNA fragment and (b) with the COI mtDNA fragment. The numbers at nodes correspond to bootstrap values

Taxonomic discussion

The specimens of *Euseius* sp. evidently do not belong to *E. stipulatus*, despite very small differences in idiosomal setae lengths. The specimens of *Euseius* sp. have been identified as a new species described in Tixier et al. (submitted): *Euseius gallicus* Kreiter & Tixier. As already shown in previous studies, this work emphasises the great variability of seta lengths at intraspecific level (Tixier et al. 2003; 2006a, b; 2008). In the family Phytoseiidae, species identification and new species descriptions are sometimes based on differences in seta lengths (Chant and McMurtry 2007). As a consequence, some already known species could be easily considered as new species if not enough attention is paid to this intraspecific variation. For most of the dorsal setae considered, the maximum value is always nearly double the minimum value for the specimens of *Euseius* sp. For *E. stipulatus*, this intraspecific variation is, however, less significant, even if great for some setae. Eighty-six specimens of *Euseius* sp., collected on four different host plants were considered, whereas no more than 25 specimens of *E. stipulatus* collected on one plant at one locality were taken into account. It seems that the greater the numbers of both specimens measured and host plants sampled, the more the intraspecific range of variation is notable. These morphological variations even allow discrimination of populations according to their host plants (especially for the specimens collected on horse chesnut), as already observed for other species of Phytoseiidae species, especially *Kampimodromus aberrans* (Oudemans) and *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Tixier et al. 2003, 2008).

This study highlights the importance of three characters for the discrimination between *E. stipulatus* and *E. gallicus*: (1) the spermatheca shape, (2) the reticulation of the dorsal shield (3) the length of the ventrianal shield (Figs. 1, 2, 3). The reliability of spermatheca shape as a species diagnostic character has been previously shown within the genus *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) Scheuten, 1857 (Tixier et al. 2006b) and also proposed as a notable character for species discrimination by several authors as long as 50 years ago (Dosse 1958; Schuster and Smith 1960; DeLeon 1962; Athias-Henriot 1968, 1977; Dumitrescu and Juvara-Bals 1977). A good visualisation of the spermatheca (and thus of its shape) greatly depends on the quality of the mountings. The spermatheca floats in liquid space within the body cavity and thus its appearance on mountings depends on its position when viewed,

as much as how the specimen is prepared during slide mounting (Faraji et al. 2008). Particular caution must thus be paid to mite preparation. Furthermore, the spermatheca shape is not only difficult to see but also difficult to accurately describe in words used (as it is a shape), despite the nice terminology proposed by Denmark *et al.* (1999). Thus, particular attention must be paid in description and drawings of this character. In the future, to develop easier and more accurate descriptions, geometric morphology (Adams et al. 2004 ; Villemant et al. 2007) could be applied. The reticulation of the dorsum could be considered as a key diagnostic criterion for differentiating between *E. stipulatus* and *E. gallicus*. This character has been considered by several authors as an important parameter for species discrimination within the genus *Euseius* (Moraes personal communication). At last, the ventrianal shield length could also be considered as a diagnostic character between the two species. However, the differences (of 10µm in mean) is not very considerable and could be used in a lesser extend. As for spermatheca shape, it would be worth to develop geometric morphology to better assess differences in ventrianal shield shapes and dimensions.

Conclusion

This study emphasizes the great contribution of molecular markers in taxonomy for determining the reliable morphologic criteria for species discrimination, as it is currently developed within the Barcoding of Life project (Hebert et al. 2003, 2004; Moritz and Cicero 2004). For Phytoseiidae mites, both COI mtDNA and 12S rDNA fragments seem to be good markers for reaching the objectives of molecular species assignment, i.e. no overlapping between intra- and interspecific genetic distances. Molecular markers could be of great help in species discrimination, especially because it is sometimes difficult to study the reproductive incompatibility among sexually reproductive species. Furthermore, molecular markers could help in the diagnostic of immature stages, for which no key exists as the number of discriminant characters is low and/or poorly studied. However, molecular markers could be used in a routine diagnostic way, but if and only if the entities sequenced have been well identified at the beginning thanks to an accurate and reliable taxonomic expertise based on a good knowledge of the group studied.

Acknowledgements

We are very grateful to Dr L. Kolodochka for his help and advices concerning the identity of *Euseius* sp., and to Dr F. Ferragut (University of Valencia, Spain) and G. Sentenac (French Institute of Viticulture, Beaune, France) for sending specimens of *Euseius stipulatus* and *Euseius finlandicus*. Thanks are also due to Marie Laporte and Martial Douin (Montpellier SupAgro) for technical assistance during the preparation of the manuscript.

References

- Adams, D.C., Slice, D.E., and Rohlf, F.J. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.* 71: 5–16.
- Athias-Henriot, C. 1968. L'appareil d'insémination Laelapoïde (acariens anactinotriches : Laelapoidea). Premières observations, possibilités d'emploi à des fins taxonomiques. *Bull. Sci. De Bourgogne*, **25** : 230-274.

- Athias-Henriot, C. 1977. Nouvelles notes sur les Amblyseiini. III. Sur le genre *Cydnodromus*: redéfinition, composition (Parasitiformes, Phytoseiidae). *Entomophaga*, **22(4)**: 61-73.
- Chant, D.A., and McMurtry, J.A. 1994. A review of the subfamilies Phytoseiinae and Typhlodrominae (Acari: Phytoseiidae). *Int. J. Acarol.* **20(4)**: 223-310.
- Chant, D.A., and McMurtry, J.A. 2005. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part VI. The tribe Euseiini N. tribe, subtribes Typhlodromalina, N. subtribe, Euseiina, N. subtribe and Ricoseiina, N. subtribe. *Int. J. Acarol.* **31**: 187-224.
- Chant, D.A., and McMurtry, J.A. 2006b. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part IX. An overview. *Int. J. Acarol.* **32**: 125-152.
- Chant, D.A., and McMurtry, J.A. 2007. Illustrated keys and diagnoses for the genera and subgenera of the Phytoseiidae of the world (Acari: Mesostigmata). Indira Publishing House West Bloomfield, Michigan, USA, 220 pp.
- Clustal W. 1997. Citing online sources: W server at the EBI embnet.news volume 4.2 1997. Available from http://www.ebi.ac.uk/embnet.news/vol4_3/clustalw1.html [accessed 21 February 2009].
- Da SilvaNoronha, A.C., and Moraes, G.J. 2004. Reproduction compatibility between mite populations previously identified as *Euseius concordis* (Acari: Phytoseiidae). *Exp. Appl. Acarol.* **32**: 271-279.
- DeLeon, D.D. 1962. The cervices of some phytoseiid type specimens (Acarina: Phytoseiidae). *Acarologia* 4: 174-176.
- Denmark, H. A., Evans, G.A., Aguilar, H., Vargas, C., Ochoa, R. 1999. Phytoseiidae of central America (Acari: Mesostigmata). Indira Publishing House West Bloomfield, Michigan, USA, 125 pp.
- Dosse, G. 1958. Die Spermathecae, ein zusätzliches Bestimmungsmerkmal bei Raubmilben (Acar., Phytoseiidae). *Pflanzenschutz Ber.* 20(1/2): 1-11.
- Dumitrescu, M., and Juvara-Bals, I. 1977. L'importance de la structure des organes copulateurs femelles dans la systématique des Ricinulei. *Travaux de l'Institut de Spéologie "Emile Racovitza"*, 16: 259-261.
- Faraji, F., Sakenin-Chelav, H., Kamali, K., McMurtry, J.A. 2008. Four new species records of Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) for Iran, and description of variability in the spermatheca of *Typhlodromus bakeri*. *Sys. Appl. Acarol.* **13**: 123–132.

- Ferragut, F., and Escudero, A. 1997. Taxonomy and distribution of predatory mites belonging to the genus *Euseius* Wainstein 1962, in Spain (Acari, Phytoseiidae). *Boletin de Sanidad Vegetal, Plagas* 23(2): 227-235.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., and Waard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **270**: 313–321.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., and Francis, C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* **2**(10): 312.
- Higgins, D., Thompson, J., and Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Hoying, S.A., and Croft, B.A. 1977. Comparisons between populations of *Typhlodromus longipilus* Nesbitt and *T. occidentalis* Nesbitt: taxonomy, distribution and hybridization. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **70**(1): 150-159.
- Jeyaprakash, A., and Hoy, M.A. 2002. Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae). *Biol. Control*, **25**(2):136-142
- Kreiter, S., and Tixier, M.-S. 2006. A new genus and species of phytoseiid mites (Acari : Mesostigmata) from southern Tunisia, with discussion of its phylogenetic position. *Zootaxa*, **1237**: 1-18
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., and Tamura, K. 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* **9**, 299-306.
- Lindquist, E.E., and Evans, G.W. 1965. Taxonomic concepts in the Ascidae, with a modified setal nomenclature for the idiosoma of the Gamasina (Acarina: Mesostigmata). *Mem. Entomol. Soc. Can.* **47**, 64pp.
- Mahr, D.L., and McMurtry, J.A. 1979. Mass breeding studies involving populations of *Typhlodromus citri* Garman & McGregor, *T. arboreus* Chant and a sibling species of each (Mesostigmata: Phytoseiidae). *Int. J. Acarol.* **5**: 155-161.
- McMurtry, J.A., Mahr, D.L., and Johnson, H.G. 1976. Geographic races in the predaceous mite, *Amblyseius potentillae* (Acari: Phytoseiidae). *Int. J. Acarol.* **2**(1): 23-28.

- McMurtry, J.A., and Badii, M.H. 1989. Reproductive compatibility in widely separated populations of three species of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae). *Pan-Pacific Entomologist*, **65(4)**: 397-402.
- McMurtry, J.A., and Croft, B.A. 1997. Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* **42**: 291-321.
- Messing, R.H., and Croft, B.A. 1991. Biosystematics of *Amblyseius andersoni* and *A. potentillae* (Acarina: Phytoseiidae): implications for biological control. *Exp. Appl. Acarol.* **10**: 267-278.
- Moritz, C., and Cicero, C. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* **2**: 1529–1531
- Moraes, G.J. de, McMurtry, J.A., Denmark, H.A., and Campos, C.B. 2004. A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. *Zootaxa*, **434**: 1-494.
- Navajas, M., Guttierrez, J., and Lagnel, J. 1996. Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites : a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bull. Entomol. Res.* **86**: 407-417.
- Rowell, H.J., Chant, D.A., and Hansell, R.I.C. 1978. The determination of setal homologies and setal patterns on the dorsal shield in the family Phytoseiidae. *Can. Entomol.* **110**: 859-876.
- Schuster, R.O. and Smith, L M. 1960. The spermathecae as taxonomic features in phytoseiid mites of western North America. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **62**: 181-188.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., and Flook, P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87(6)**: 651-701
- StatSoft France 2005. Citing online sources: STATISTICA (logiciel d'analyse de données), version 7.1. Available from <http://www.statsoft.fr> [accessed 21 February 2009].
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Cheval, B., and Auger, P. 2003. Morphometric variation between populations of *Kampimodromus aberrans*. Implications for the taxonomy of the genus. *Inv. Systematics*, **17(2)**: 349-358.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Ferragut, F., and Cheval, B. 2006a. Morphological and molecular evidences for the synonymy of *Kampimodromus hmiminai* McMurtry

- & Bounfour and *K. adrianae* Ferragut & Pena-Estevez (Acari: Phytoseiidae). *Can. J. Zool.* **84** (8): 1216-1222.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Barbar, Z., Ragusa, S., and Cheval, B. 2006b. The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy. *Zool. scripta* **35**: 115-122.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Croft, B.A., and Cheval, B. 2008. *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) from USA: morphological and molecular assessment of its identity. *Bull. Entomol. Res.* **98**: 125-134.
- Tixier M.-S., Kreiter S., Okassa M., Cheval B. A new species of the genus *Euseius* Wainstein (Acari: Phytoseiidae) from France. Submitted to *Journal of Natural History*.
- Villemant C., Simbolotti G., and Kenis M., 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Syst. Entomol.* **32**: 625-634.

IV.A.8. Article 3. Tixier M.-S., Kreiter S., Okassa M., Cheval B. 2009. A new species of the genus *Euseius* Wainstein (Acari: Phytoseiidae) from France. *Journal of Natural History* **44, 241-254.**

Abstract

The identity of specimens belonging to the genus *Euseius* found on several trees in France is investigated. Previous molecular and morphological analysis have shown that the new species herein described is different from *E. stipulatus*. Among the 187 species belonging to the genus *Euseius*, four of them (*Euseius querci*, *Euseius amissibilis*, *Euseius kirghisicus* and *Euseius longiverticalis*) seem to be morphologically close to this new species. However, none were very similar. This paper reports the description of this new species: *Euseius gallicus* n. sp. Kreiter & Tixier.

Key-words : *Euseius gallicus* n. sp., *Euseius stipulatus*, calyx of spermatheca, morphology, taxonomy

Introduction

Several species in the family Phytoseiidae are important natural enemies controlling mite pest outbreaks in many crops (McMurtry and Croft 1997). This family is widespread all over the world and consists of around 2,000 valid species included in three sub-families (Chant and McMurtry 2003a, b; 2004a, b, 2005a, b, c, 2006a, b, 2007; Moraes et al. 2003, 2004; Ragusa 2003; Kolodochka 2005; Kreiter and Tixier 2006). This study focuses on the identity of a species of the genus *Euseius* Wainstein found in France. The genus *Euseius* (tribe Euseiini Chant & McMurtry, subtribe Euseiina Chant & McMurtry) is one of the most diverse genera (187 species described) within the subfamily Amblyseiinae (Chant and McMurtry 2007). The identification of species in the genus *Euseius* is quite difficult because of the high variation in seta lengths on the dorsum, the most used characteristics for species delimitation within the family Phytoseiidae. This paper focuses on the description of a new species of the genus *Euseius* reported from France. Only three species are known from the Western Palaearctic region: *Euseius stipulatus* (Athias-Henriot), *Euseius finlandicus* (Oudemans) and *Euseius scutalis* (Athias-Henriot) (Ferragut and Escudero 1997; Moraes et al. 2004). Thus a special attention was paid to the differentiation of these three species with the new one here described.

Material and methods

Four populations of the new species of *Euseius* were collected in Montpellier (Hérault, South of France : 43°36'56"N, 3°51'36"E) on four plant species: large-leaved summer linden (*Tilia platyphyllos* Scopoli; Tiliaceae), sour cherry (*Prunus cerasus* L.; Rosaceae), horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.; Sapindaceae) and laurustinus (*Viburnum tinus* L.; Adoxaceae). The mites were collected directly from leaves with a fine and clean hairbrush and immediately put in ethylic alcohol (100 %) (for molecular experiments) into plastic vials.

One hundred and sixteen females were mounted on slides in Hoyer's medium and measured with a phase and interferential contrast microscope (Leica DLMB, Leica Microsystems SAS, Rueil-Malmaison, France) (40x magnification). Setal notations

follow Rowell et al. (1978) and those for solenostomes and poroids Athias-Henriot (1975). All measurements are given in micrometers.

Results and discussion

Genus *Euseius* Wainstein 1962

Amblyseius (*Amblyseius*), section *Afrodromus* Wainstein, 1962: 17.

Amblyseius (*Amblyseius*), section *Euseius* Wainstein, 1962: 15.

Euseius, De Leon, 1967: 18; Muma *et al.*, 1970: 92; Denmark and Muma, 1970: 221; 1972: 20 1973: 260; Chaudhri *et al.*, 1979: 56; Matthyse and Denmark, 1981: 348; Karg, 1982: 193; 1983:301; McMurtry, 1983: 257.

***Euseius gallicus* Kreiter and Tixier n.sp. (Figs. 1-8)**

Holotype: female, *Prunus cerasus* L., Montpellier, France, VI 2007, deposited at Montpellier SupAgro / INRA Acarology Laboratory Collection.

Allotype. Male, *Prunus cerasus* L., Montpellier, France, VI 2007, deposited at Montpellier SupAgro / INRA Acarology Laboratory Collection.

Paratypes: 25 females (on 25 preparations) collected on *V. tinus*, Montpellier, France; 30 females (on 30 preparations) collected on *T. platyphyllos*, Montpellier, France; 29 females (on 29 preparations) collected on *P. cerasus*, Montpellier, France; 31 females (on 31 preparations) collected on *A. hippocastanum*, Montpellier, France; VI 2007; one male collected on *P. cerasus*, Montpellier, France, VI 2007; deposited at Montpellier SupAgro / INRA Acarology Laboratory Collection, collector: Okassa Mireille.

Other material: 14 females collected on *Vitis vinifera*, Montmartre, Paris, VII 2003, deposited at Montpellier SupAgro / INRA Acarology Laboratory Collection, collector: Kreiter Serge.

Etymology: The name of the species refers to the country where the species was collected and commonly found.

Description

Adult Female (Figures 1-6) (n = 116)

Dorsum (Figure 1) - Dorsal shield 334 (259-369) long and 226 (179-252) wide, strongly reticulated on the whole dorsum, with 7 solenostomes (gd1, 2, 4, 5, 6, 8 and 9), 5 pairs of poroids, 17 pairs of dorsal setae and 2 pair of sub-lateral setae: j1 33 (22-40), j3 34 (23-42), j4 13 (8-20), j5 15 (9-20), j6 17 (11-22), J2 18 (11-24), J5 5 (3-8), z2 29 (20-37), z4 31 (21-40), z5 14 (8-19), Z1 17 (11-21), Z4 19 (13-25), Z5 54 (35-62), s4 41 (30-52), S2 22 (16-28), S4 22 (18-29), S5 28 (19-36), r3 15 (12-21), R1 15 (11-20). All setae smooth.

Peritreme (Figure 1) – Extending forward between bases of j3 and z2.

Venter (Figure 2) - Sternal shield slightly reticulated. Other shields smooth. Sternal shield large, with 3 pairs of setae and 2 pair of pores; 1 pair (st4) on the membrane; posterior margin not clearly outlined in all specimens, but distinct in the holotype. Distances between st1-st3 63 (56-73), st2-st2 65 (56-73), st5-st5 74 (62-87). Two pairs of metapodal shields, primary shield 21 (16-25) long, 5 (3-9) wide and secondary shield 9 (8-10) long and very thin and clear for the smallest one. Ventrianal shield with 3 pairs of pre-anal setae, JV1, JV2 and ZV2 and one pair of large elliptical pre-anal pores. Membrane surrounding ventrianal shield with 4 pairs of setae ZV1, ZV3, JV4 and JV5 and 5 pairs of round to oblong poroids; ventrianal shield 98 (79-113) long, 50 (41-66) wide at level of anterior corners and 76 (61-87) wide at level of anus. JV5 40 (30-49) long and smooth.

Chelicera (Figure 3) – Fixed digit 25 (24-33) with 5 teeth and movable digit 23 (20-25) with one tooth.

Spermatheca (Figure 4) – Calyx of spermatheca tubular (Denmark *et al.* 1999), elongate vase shaped, 7 (5-10) wide and 16 (11-21) long, with a small neck and an atrium at the basis, a visible ductus minor and a long ductus major.

Legs (Figure 5) – Legs IV with 3 smooth macrosetae, genua 38 (35-42), tibia 37 (35-50), basitarsus 58 (39-71). The macroseta on the basitarsus with a sharp hyaline tip. Chaetotactic formula of genu II: 1-2/0, 2/0-1; genu III: 1-2/0, 2/0-1. Length of leg I: 255-285, II: 225-258, III: 217-250, IV: 265-313.

Adult male (Figures 6-8) (n = 2)

Dorsum (Figure 6) – Dorsal shield like in the female but very less reticulated, 228-238 long and 140-150 wide. Setae j1 13-15, j3 18, j4 13-15, j5 13-15, j6 15-18, J2 20-25, J5 10-12, z2 13-20, z4 15-18, z5 13-15, Z1 20-25, Z4 45-50, Z5 43-55, s4 18-25, S2 23-33, S4 20-23, S5 18-20, r3 15-20, R1 18-20.

Peritreme (Figure 7) – Extending just pass z4.

Venter (Figure 8) – All shields slightly reticulated. Sternogenital shield with 5 pairs of setae and 2 pairs of pores. Distances between st1-st3 55, st2-st2 55-58, st5-st5 60-68. Ventrianal shield not fused with peritremal shields with 3 pairs of pre-anal setae, JV1, JV2 and ZV2, one pair of large elliptical preanal pores and 2 pairs of poroids. Membrane surrounding ventrianal shield with 1 pair of setae JV5 at level with anal opening, and no pair of oblong poroids; ventrianal shield 88 long, 108-120 wide at level of anterior corners and 53-63 at level of anus.

Legs – Three macrosetae on leg IV, genual 25-28, tibia 20, basitarsus 33-35. Chaetotactic formula of genu II and genu III are identical to the female. Length of leg I: 228-238, II: 200-213, III: 200-203, IV: 233-255.

Chelicera (Fig. 9) – Spermatodactyl with an elongate toe terminating the foot, shaft 15 long.

Table 1. Mean, Min, Max, Standard Error (SE) of *Euseius gallicus* n. sp., measurements of the type specimen of *Euseius stipulatus* and reported in the original descriptions of *Euseius amissibilis*, *Euseius querci*, *Euseius kirghisicus* and *Euseius longiverticalis* (DSL: dorsal shield length, DSW: dorsal shield width, MD: number of teeth of the Mobile Digit, FD: number of teeth on the FD)

| <i>Euseius gallicus</i> n. sp. | | | | | <i>Euseius kirghisicus</i> | <i>Euseius amissibilis</i> | <i>Euseius querci</i> | <i>Euseius longiverticalis</i> |
|--------------------------------|-------|------|-----|-----|----------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| | Mean | SE | min | max | | | | |
| DSL | 334 | 1.69 | 259 | 369 | 340 | 336 | 335 | 310 |
| WDS | 226 | 1.38 | 179 | 252 | 204 | 129 | 210 | 217 |
| j1 | 33 | 0.32 | 22 | 40 | 32 | 40 | 32 | 34 |
| j3 | 34 | 0.38 | 23 | 42 | 31 | 38 | 32 | 31 |
| j4 | 13 | 0.19 | 8 | 20 | 14 | 14 | 21 | 14 |
| j5 | 15 | 0.18 | 9 | 20 | 14 | 17 | 19 | 14 |
| j6 | 17 | 0.23 | 11 | 22 | 15 | 17 | 19 | 17 |
| J2 | 18 | 0.25 | 11 | 24 | 16 | 20 | 21 | 17 |
| J5 | 5 | 0.1 | 3 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 |
| z2 | 29 | 0.34 | 20 | 37 | 25 | 32 | 26 | 25 |
| z4 | 31 | 0.37 | 21 | 40 | 28 | 35 | 29 | 25 |
| z5 | 14 | 0.19 | 8 | 19 | 14 | 16 | 19 | 14 |
| Z1 | 17 | 0.2 | 11 | 21 | 16 | 35 | 21 | 18 |
| Z4 | 19 | 0.22 | 13 | 25 | 19 | 21 | 25 | 20 |
| Z5 | 54 | 0.44 | 35 | 62 | 42 | 59 | 49 | 58 |
| s4 | 41 | 0.44 | 30 | 52 | 39 | 43 | 39 | 34 |
| S2 | 22 | 0.24 | 16 | 28 | 21 | 25 | 25 | 21 |
| S4 | 22 | 0.22 | 18 | 29 | 21 | 26 | 26 | 23 |
| S5 | 28 | 0.35 | 19 | 36 | 21 | 19 | 26 | 32 |
| r3 | 15 | 0.2 | 12 | 21 | 14 | 19 | 19 | 17 |
| R1 | 15 | 0.16 | 11 | 20 | 15 | 18 | 18 | 14 |
| JV5 | 40 | 0.42 | 30 | 49 | 25 | 23 | 41 | 39 |
| StIV | 58 | 0.55 | 39 | 71 | 50 | 68 | 64 | 57 |
| Peritreme | j3-z2 | | | | j3-z2 | j3-z2 | z2-z4 | j3-z2 |
| MD | 1 | | | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| FD | 5 | | | | 4-5 | 2 | 5 | 4 |

Diagnosis: As only three species of *Euseius* are reported from the West part of the West Palaearctic region, the specimens of *E. gallicus* n. sp. were at first compared to these three species. They clearly differ from *E. finlandicus* and *E. scutalis*, by several characters like the shape of the spermatheca, the lengths of both peritreme and of some dorsal setae (Ferragut and Escudero 1997). *Euseius gallicus* n. sp. is more difficult to differentiate from *E. stipulatus*. Both molecular and morphological analyses showed that these two species are valid and differs by the terminal shape of the calyx of the spermatheca, the dorsal shield reticulation (the dorsal shield of *E. gallicus* n. sp. is more reticulated than the dorsum of *E. stipulatus*) and lengths of the seta z2 and ventrianal shield (Okassa et al. in press). According to the 187 species of

Euseius, four seemed to be morphologically closed to *Euseius gallicus* n.sp.: *Euseius querci* (Liang and Ke), *Euseius longiverticilis* (Liang and Ke), *Euseius amissibilis* Meshkov and *Euseius kirghisicus* (Kolodochka). However, it was impossible to contact the authors of the species for a loan of type specimens, except for Dr Kolodochka (Institute of Zoology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev). As he could not send the type of *E. kirghisicus* for postage security reasons, specimens of *Euseius* sp. were sent to him for confirmation.

Euseius amissibilis (Meshkov 1991) was described from Tajikistan, on *Platanus orientalis* L.. It differs from *E. gallicus* n. sp. by the lengths of setae Z1, JV5 and in a lesser extend j1, j3, S5 and StIV (Table 1). The lengths of JV5 and S5 are longer in *E. gallicus* n. sp. than in *E. amissibilis*, while Z1 is shorter in *E. gallicus* n. sp. The fixed digit of *E. amissibilis* has two teeth instead of five as in *E. gallicus* n.sp. However, on the drawings of the original description, *E. amissibilis* seems to have more than two teeth on the fixed digit and may be more than five. Moreover, the fixed digit is not currently used as a valid character from a systematic point of view as it is usually very difficult to count the teeth.

However, Dr Kolodochka compared specimens of *E. gallicus* n. sp. with *E. amissibilis* and confirmed they are two separate species essentially because of the differences in seta lengths. Nevertheless, according to what is known on dorsal seta length intraspecific variation (Tixier et al. 2008) and to similarities between the two species, some doubts could subsist.

Euseius querci (Liang & Ke 1983) was described from China on *Quercus acutissima* Carruthers. The dorsal setae of *E. querci* and *E. gallicus* n.sp. are subequal to equal in length (Table 1). However, in *E. gallicus* n.sp., the peritreme reaches to a level between z2 and z4 but to a level between j3 and z2 in *E. querci*.

Euseius kirghisicus (Kolodochka 1979) was described from Kyrgyzstan, on *Prunus* sp. It differs from *E. gallicus* in the lengths of the seta S5 (longer than in *E. kirghisicus*) (Table 1). Furthermore, the dorsal shield of *E. kirghisicus* is not reticulated and the calyx of the spermatheca is narrower than that of *E. gallicus* n. sp. Dr Kolodochka also compared specimens of *E. gallicus* n. sp. with specimens of *E. kirghisicus* and found them separate species.

Euseius longiverticilis (Liang and Ke 1983) was also described from China, on an unknown plant and is very related to *E. gallicus* n.sp. (Table 1). All attempts to get hold of the type specimens of *E. longiverticilis* was unsuccessful. Therefore, we had

to rely only on the original description of *E. longiverticilis*. In both species the dorsal setal lengths are equally long (Table 1), the dorsal shields are reticulated and the peritremes reach to a level between j3 and z2. The spermatheca of *E. longiverticilis* is not clearly depicted. Apparently the only difference between these two species is the number of teeth on the fixed cheliceral digit, namely 4 in *E. longiverticilis* and 5 in *E. gallicus* n. sp. Again, even if the dentition of the chelicerae of the Phytoseiidae is considered an important character to distinguish between species (Chant and McMurtry 2007; Tixier et al. 2008), the fixed digit dentition has not been really considered as an important character from a systematic point of view. Therefore, we have to be cautious. *Euseius longiverticilis* was never reported again after its description, whereas *E. gallicus* n. sp. was frequently encountered in France (Montpellier on several trees, Paris on *Vitis vinifera* and on large-leaved summer linden *T. platyphyllos*, Calas [Bouche-du-Rhône, France] on the wild rose *Rosa canina* L. and the box elder *Acer negundo* L.).

In conclusion, this paper shows the necessity of very good descriptions to assess the new species state of specimens and the difficulty to retrieve type species for comparisons. To really determine the differences between these species and especially between *E. amissibilis*, *E. longiverticilis* and *E. gallicus* n.sp., molecular experiments would be useful; but for this, alcohol preserved or alive specimens would be required.

Acknowledgements

We are very grateful to Dr L. Kolodochka for his help and advice concerning the identity of *Euseius gallicus* n. sp.. Thanks are also due to Marie Laporte and Martial Douin (Montpellier SupAgro) for technical assistance during the preparation of the manuscript.

References

Athias-Henriot C. 1975. The idiosomatic euneotaxy and epineotaxy in gamasids (Arachnida, Parasitiformes). *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, 13: 97-109.

- Chant DA, McMurtry JA. 2003a. A review of the subfamilies Amblyseiinae (Acari: Phytoseiidae): Part II. Neoseiulini new tribe. *Int. J. Acarol.* 29: 3-46.
- Chant DA, McMurtry JA. 2003b. A review of the subfamilies Amblyseiinae (Acari: Phytoseiidae): Part II. The tribe Kampimodromini. *Int. J. Acarol.* 29: 179-224.
- Chant DA, McMurtry JA. 2004a. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part III. The tribe Amblyseiini Wainstein, subtribe Amblyseiina, N. subtribe. *Int. J. Acarol.* 30: 171-228.
- Chant DA, McMurtry JA. 2004b. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part IV. The tribe Amblyseiini Wainstein, subtribe Arrenoseiina Chant and McMurtry. *Int. J. Acarol.* 30: 291-312.
- Chant DA, McMurtry JA. 2005a. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part V. Tribe Amblyseiini, subtribe Proprioseiopsina Chant and McMurtry. *Int. J. Acarol.* 31: 3-22.
- Chant DA, McMurtry JA. 2005b. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part VI. The tribe Euseiini N. tribe, subtribes Typhlodromalina, N. subtribe, Euseiina, N. subtribe and Ricoseiina, N. subtribe. *Int. J. Acarol.* 31: 187-224.
- Chant DA, McMurtry JA. 2005c. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part VII. Typhlodromipsini n. tribe. *Int. J. Acarol.* 31: 315-340.
- Chant DA, McMurtry JA. 2006a. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part VIII. The tribes Macroseiini Chant, Denmark and Baker, Phytoseiulini n. tribe, Africoseiulini n. tribe and Indoseiulini Ehara and Amano. *Int. J. Acarol.* 32: 13-25.
- Chant DA, McMurtry JA. 2006b. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae) Part IX. An overview. *Int. J. Acarol.* 32: 125-152.
- Chant DA, McMurtry JA. 2007. Illustrated keys and diagnoses for the genera and subgenera of the Phytoseiidae of the world (Acari: Mesostigmata). Indira Publishing House, 220 pp.
- Chaudhri WM, Akbar S, Rasool A. 1979. Studies on the predatory leaf inhabiting mites of Pakistan. University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, 243 pp.
- De Leon D. 1967. Some mites of the Caribbean Area. Part I. Acarina on plants in Trinidad, West Indies. Allen Press Inc., Lawrence, Kansas, USA, pp. 1-66.

- Denmark HA, Muma MH. 1970. Some phytoseiid mites of Paraguay (Phytoseiidae: Acarina). Florida Entomol. 53: 219-227.
- Denmark HA, Muma MH. 1972. Some Phytoseiidae of Colombia (Acarina: Phytoseiidae). Florida Entomol. 55: 19-29.
- Denmark HA, Muma MH. 1973. Phytoseiid mites of Brazil (Acarina: Phytoseiidae). Rev. Bras. Biol. 33: 235-276.
- Denmark HA, Evans GA, Aguilar H, Vargas C, Ochoa R. 1999. Phytoseiidae of Central America. Indira Publishing House, 125 pp.
- Ferragut F, Escudero A. 1997. Taxonomy and distribution of predatory mites belonging to the genus *Euseius* Wainstein 1962, in Spain (Acari, Phytoseiidae). Bol. San. Veg., Plagas 23: 227-235.
- Karg W. 1982. Diagnostic and systematics of predatory mites of the family Phytoseiidae Berlese in orchards. Zool. Jahrb. Syst. 109: 188-210.
- Karg W. 1983. Systematische untersuchung der Gattungen und Untergattungen der Raubmilbenfamilie Phytoseiidae Berlese, 1916, mit der beschreibung von 8 neuen Arten. Mitteilungen Zoologisches Museum in Berlin Germany, 59: 293-328.
- Kolodochka LA. 1979 Four new species of phytoseiid mites of the fauna of USSR (Parasitiformes, Phytoseiidae). Vest. Zool. 5: 32-40.
- Kolodochka LA. 2005. A new species of the genus *Kampimodromus* (Parasitiformes, Phytoseiidae) from Crimea. Acarina 13(1): 23-27
- Kreiter S, Tixier MS. 2006. A new genus and species of phytoseiid mites (Acari : Mesostigmata) from southern Tunisia , with discussion of its phylogenetic position. Zootaxa 1237: 1-18
- Liang LR, Ke LS. 1983. Notes on the *finlandicus* group of *Amblyseius* Berlese of China. Acta Zootaxon. Sin. 8: 162-172.
- Matthysse JG, Denmark HA. 1981. Some phytoseiids of Nigeria (Acarina: Mesostigmata). Florida Entomol. 64: 340-357.
- McMurtry JA. 1983. Phytoseiid mites from Guatemala, with descriptions of two new species and redefinitions of the genera *Euseius*, *Typhloseiopsis*, and the *Typhlodromus occidentalis* species group (Acari: Mesostigmata). Int. J. Entomol. 25: 249-272.
- McMurtry JA, Croft BA. 1997. Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. Annu. Rev. Entomol. 42: 291-321.

- Meshkov Yu.I. 1991. *Euseius amissibilis* sp.n. (Parasitiformes, Phytoseiidae), a new species of mite from Tadjikistan. Zoologich. Zhur. 70: 138-140.
- Moraes GJ, McMurtry JA, Mineiro JLC. 2003. Description of a new genus and species of phytoseiid mite (Acari: Phytoseiidae) from Brazil. Int. J. Acarol. 29: 47-54
- Moraes GJ, McMurtry JA, Denmark HA, Campos CB. 2004. A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. Zootaxa 434: 1-494.
- Muma MH, Denmark HA, De Leon D. 1970. Phytoseiidae of Florida. Arthropods of Florida and neighboring land areas, 6. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, USA, 150 pp.
- Okassa M, Tixier MS, Cheval B, Kreiter S. 2009. Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). Can. J. Zool. In press.
- Ragusa S. 2003. Description of a new genus and of two new species of phytoseiid mites (Parasitiformes, Phytoseiidae) collected in Chile. Acarologia 63: 337-344
- Rowell HJ, Chant DA, Hansell RIC. 1978. The determination of setal homologies and setal patterns on the dorsal shield in the family Phytoseiidae. Can. Entomol. 110: 859-876.
- Tixier MS, Kreiter S, Croft BA, Cheval B. 2008. *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) from USA: morphological and molecular assessment of its identity. Bull. Entomol. Res. 98: 125-134.
- Wainstein BA. 1962. Révision du genre *Typhlodromus* Scheuten, 1857 et systématique de la famille des Phytoseiidae (Berlese 1916) (Acarina: Parasitiformes). Acarologia 4: 5-30.

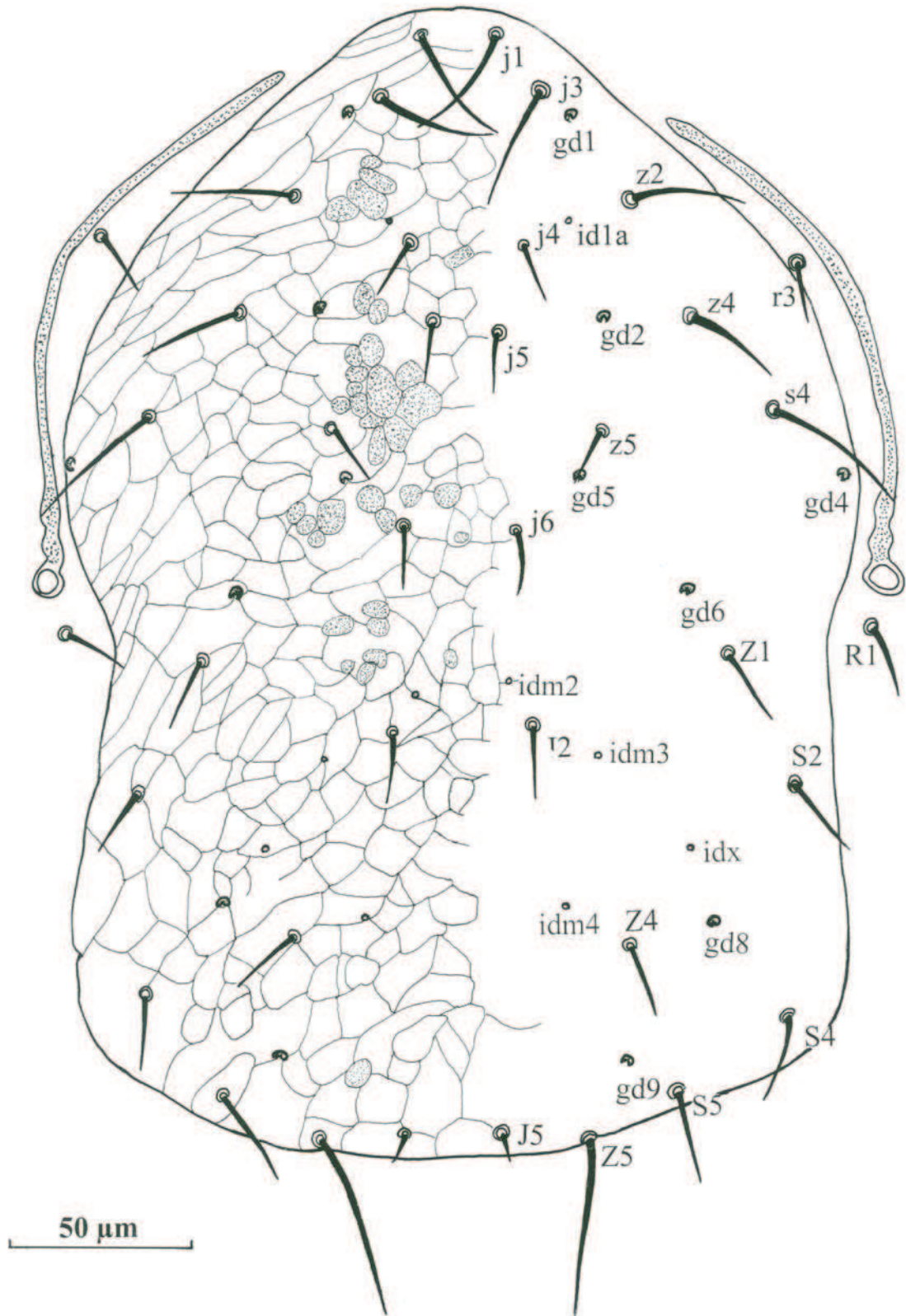


Figure 1. Dorsal shield of the female of *Euseius gallicus* n.sp. (from the holotype)

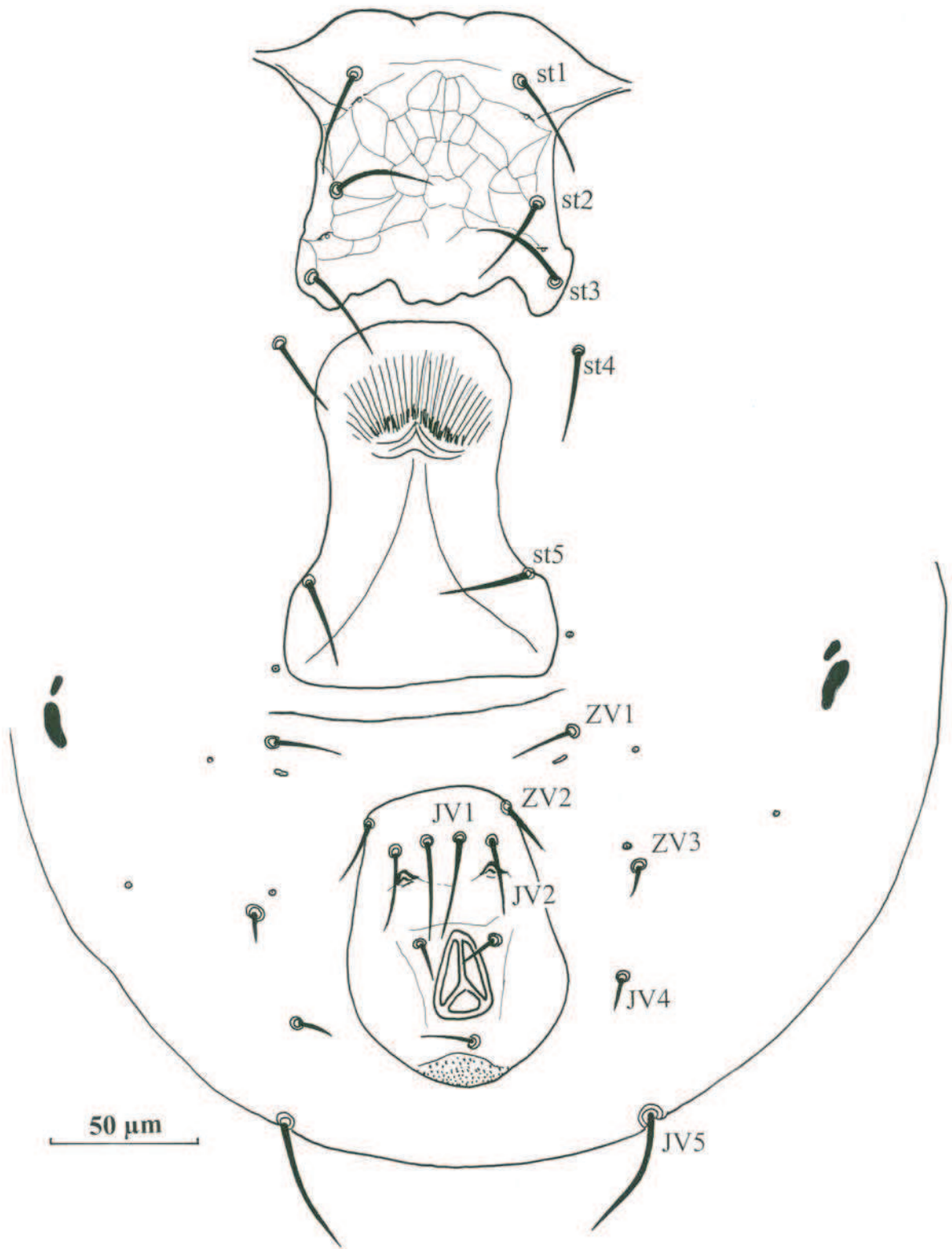


Figure 2. Ventral shields of the female of *Euseius gallicus* n.sp. (from the holotype)

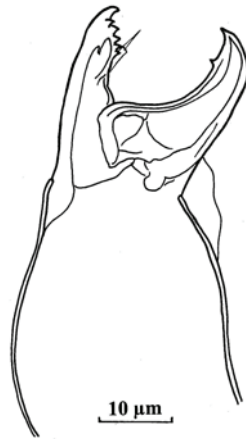


Figure 3. Chelicera of the female of *Euseius gallicus* n.sp. (from the holotype)

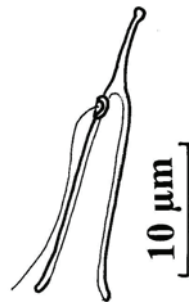


Figure 4. Calyx of spermatheca of the female of *Euseius gallicus* n.sp. (from the holotype)

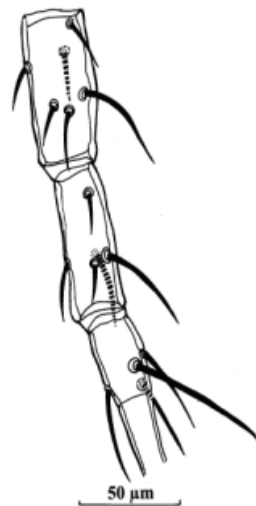


Figure 5. Macrosetae of leg IV of the female of *Euseius gallicus* n.sp. (from the holotype)

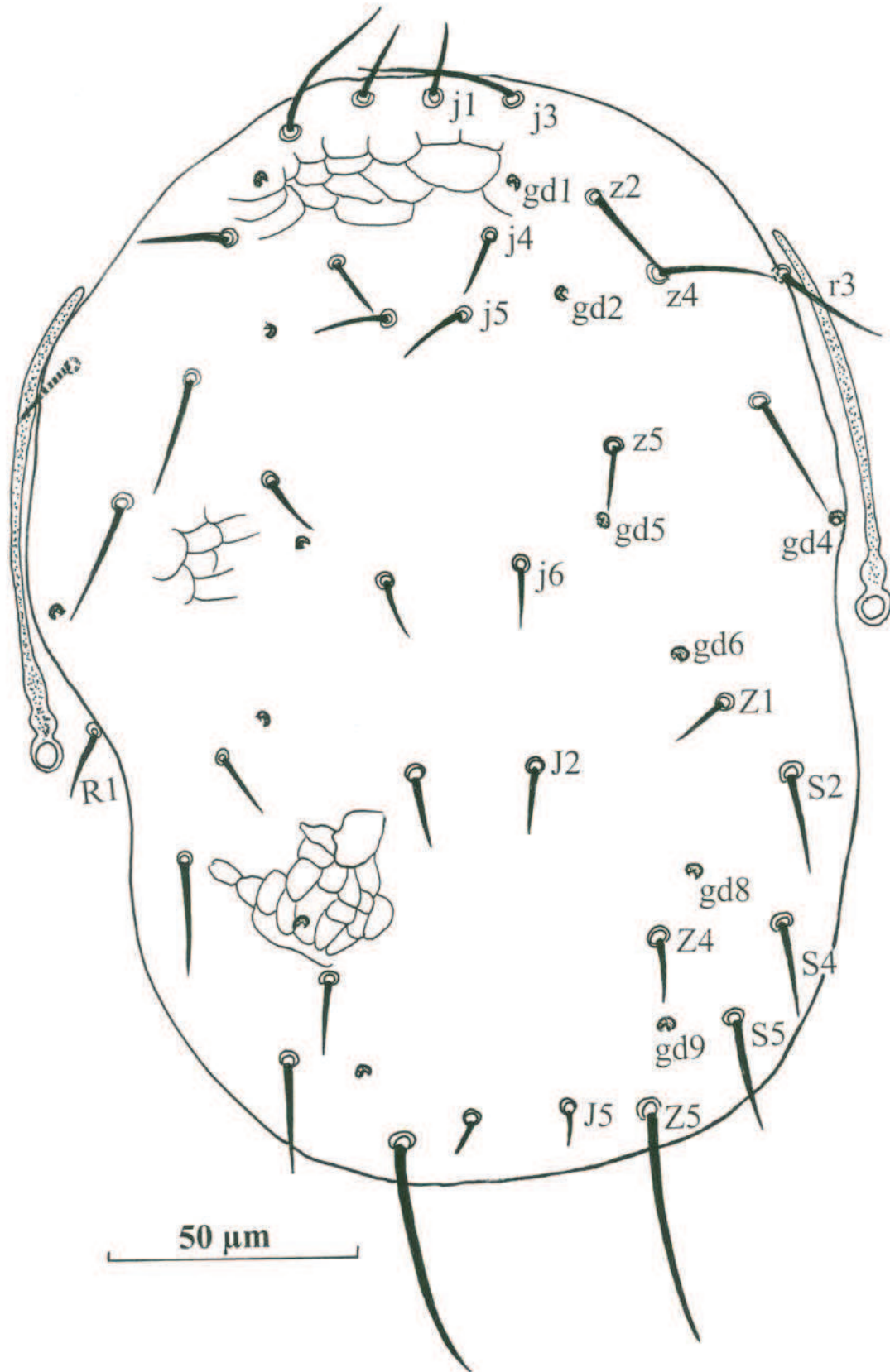


Figure 6. Dorsal shield of the male of *Euseius gallicus* n.sp. (from the allotype)

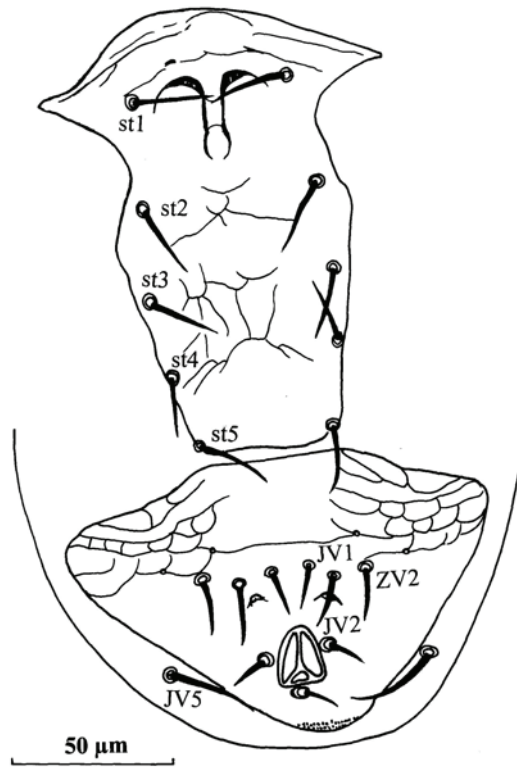


Figure 7. Ventral shields of the male of *Euseius gallicus* n.sp. (from the allotype)

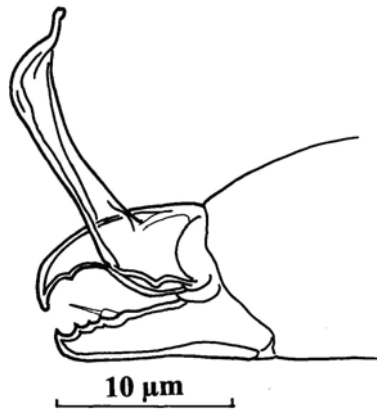


Figure 8. Chelicera of the male of *Euseius gallicus* n.sp. (from the allotype)

CHAPITRE IV. PARTIE B. TAXONOMIE INTEGRATIVE ET ESPECES MORPHOLOGIQUEMENT PROCHES : EXEMPLE DE *PHYTOSEIULUS PERSIMILIS* ATHIAS-HENRIOT ET *PHYTOSEIULUS MACROPILIS* (BANKS).

Comme nous l'avons déjà indiqué dans le chapitre I, le diagnostic spécifique au sein des espèces de la famille des Phytoseiidae est essentiellement basé sur la chaetotaxie du dorsum et notamment sur la longueur des soies qu'il porte (Chant et McMurtry, 1994, 2006a, b ; Tixier *et al.*, 2006a,b, 2008a,b). La délimitation des espèces morphologiquement proches est donc l'une des questions à laquelle les taxonomistes de cette famille sont confrontés. Ils doivent de ce fait trouver des solutions afin d'éviter de mettre en synonymie des espèces distinctes.

En effet, certaines espèces se distinguent parfois par un ou deux caractères, comme le nombre de dents sur le mors mobile des chélicères, la présence / absence d'un solénostome sur le bouclier dorsal ou encore par la forme de la spermathèque (Tixier *et al.*, 2006a). Or, ces caractères sont souvent difficiles à observer et leur valeur diagnostique reste parfois controversée (Athias-Henriot, 1969, 1971, 1975 ; Chant et McMurtry, 1994, 2007).

Dans ce contexte, l'application du barcoding permettrait, par l'utilisation des caractères moléculaires, de mieux appréhender le diagnostic spécifique de ces entités et de statuer sur la valeur diagnostique des caractères morphologiques utilisés pour les séparer.

IV.B.1. Présentation et objectifs de l'étude

Phytoseiulus persimilis Athias-Henriot est une espèce morphologiquement très proche de *Phytoseiulus macropilis* (Banks). Peu de caractères morphologiques permettent de distinguer ces deux entités. D'après Takahashi et Chant (1993b), ces deux espèces se différencient par la nature de la soie StIV qui est lisse (« smooth ») pour *P. persimilis* et barbulée (« serrated ») pour *P. macropilis*. Les longueurs des soies j6, Z1 et Z4, situées sur le bouclier dorsal, présenteraient également d'après ces mêmes auteurs une valeur diagnostique : elles sont plus courtes pour *P. macropilis* que pour *P. persimilis* (Takahashi et Chant, 1993b). L'étendue de la variation de ces longueurs de soies, étudiée à partir de 5 spécimens par espèce,

était comme suit : pour *P. persimilis* : j6 (145-160), Z1 (105-115) et Z4 (131-138) ; et pour *P. macropilis* : j6 (123-135), Z1 (95-101) et Z4 (105-123). Même si aucun chevauchement n'a été observé entre ces deux espèces dans l'étude réalisée par Takahashi et Chant (1993b), le nombre de spécimens mesurés étant faible (<10), on est en droit de se demander si cette absence de chevauchement aurait existé si un plus grand nombre d'individus avait été pris en considération. En effet, des études précédentes ont montré que les longueurs de soies pouvaient varier considérablement au sein d'une même espèce (Athias- Henriot, 1960 ; Tixier *et al.*, 2003b, 2006a,b, 2008a,b), et des chevauchements entre les variations intra- et interspécifiques ont régulièrement été mis en évidence au sein des espèces de cette famille, lorsqu'un nombre important d'individus était pris en considération.

L'autre caractère, également utilisé pour délimiter ces deux espèces, est la localisation de la paire de soies préanales JV2 (sur ou en dehors du bouclier ventrianal). Cette soie se situe généralement à l'extérieur de la plaque ventrianale (« off ») pour *P. persimilis* et à l'intérieur (« on ») pour *P. macropilis* (Takahashi et Chant, 1993b). Cependant, dans une étude réalisée par McMurtry (1983), une grande variabilité de ce caractère au sein d'une population de *P. macropilis* originaire du Guatemala a été observée. En effet, sur 25 spécimens femelles de *P. macropilis*, 12 présentaient la soie JV2 à l'extérieur de la plaque ventrianale, comme pour *P. persimilis*. En revanche, pour tous les individus identifiés comme *P. persimilis*, cette paire de soie était en dehors de la plaque ventrianale. Takahashi et Chant (1993b) ont également constaté une telle variation en observant 87 spécimens femelles de *P. macropilis* originaires de Floride (Etats-Unis). Cinquante et une femelles présentaient la soie JV2 sur la plaque ventrianale, 33 femelles présentaient une des deux soies JV2 en dehors et l'autre sur la plaque ventrianale et enfin 3 femelles présentaient JV2 en dehors de la plaque ventrianale. Du fait de ces variations, des questions se posent donc sur la valeur discriminante de ce caractère.

Cependant, en dépit du faible nombre de caractères qui permettent de différencier ces deux espèces, la validité de ces espèces n'est pas remise en question, car des croisements biologiques ont préalablement montré un isolement reproducteur (Takahashi et Chant, 1993d). L'objectif de ce travail a donc été de déterminer dans quelle mesure le barcode moléculaire pouvait permettre : **(1)** de fiabiliser la valeur diagnostique des caractères morphologiques communément utilisés pour délimiter ces deux espèces ; **(2)** de délimiter plus facilement ces deux espèces autrement que

par des caractères morphologiques, notamment en estimant l'étendue des variations moléculaires intra- et interspécifique.

IV.B.2. Position taxonomique de *Phytoseiulus persimilis* et *P. macropilis*

Phytoseiulus persimilis a été décrite à partir de spécimens récoltés sur des rosiers en Algérie par Athias-Henriot en 1957. *Phytoseiulus macropilis* a été décrite à partir de spécimens récoltés sur des jacinthes d'eau en Floride (Etats-Unis) par Banks en 1906. Ces deux espèces appartiennent au genre *Phytoseiulus*, seul genre de la tribu des Phytoseiulini. Ce genre comprend 4 espèces : *P. macropilis*, *P. persimilis*, *Phytoseiulus longipes* Evans et *Phytoseiulus fragariae* (Denmark et Schicha) (Takahashi et Chant, 1993b ; Chant et McMurtry, 2006a, 2007). Cependant, dans le dernier catalogue mondial de la famille des Phytoseiidae, Moraes *et al.* (2004) inclut dans ce genre une autre espèce, *Phytoseiulus robertsi* (Baker).

IV.B.3. Quelques caractéristiques biologiques de *Phytoseiulus persimilis* et *P. macropilis*

IV.B.3.1. Caractéristiques prédatrices

Ces deux espèces appartiennent au type I d'après le classement de Chant et McMurtry (1997). Elles ne se développent donc qu'en consommant des proies appartenant aux espèces du genre *Tetranychus*.

IV.B.3.2. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio de *Phytoseiulus persimilis*

Les caractéristiques biologiques de *P. persimilis* ont été largement étudiées (i.e. Mori et Chant, 1965 ; Laing, 1968 ; Takafuji et Chant, 1976 ; Ashihara *et al.*, 1978 ; Badii et McMurtry, 1984 ; Chittenden et Saito, 2001 ; Escudero et Ferragut, 2005 ; Kazak, 2006 ; Abdad-Moyano *et al.*, 2008 ; Kazak, 2008 ; Popov et Khudyakova, 2008) du fait de son importance en lutte biologique. Dans la suite de ce paragraphe, seules quelques-unes d'entre elles seront abordées.

❖ Dans des conditions optimales (25 ± 1 °C, 70–80 % d'hygrométrie et une photopériode de 12: 12), la durée de développement du stade œuf au stade adulte est dépendante de l'espèce de proies comme le montre une étude réalisée par Escudero et Ferragut (2005). Ces auteurs ont mis en évidence que la durée de

développement de *P. persimilis* était longue quand il consommait *Tetranychus evansi* (Baker et Pritchard) ($6,91 \pm 0,27$ jours) et relativement plus courte lorsqu'il consommait *Tetranychus turkestanii* (Ugarov et Nikolski) ($4,77 \pm 0,17$ jours) ; *T. urticae* ($4,15 \pm 0,3$ jours) ou *Tetranychus ludeni* Zacher ($3,81 \pm 0,25$ jours). Une autre étude réalisée par Abdad-Moyano *et al.* (2008) montre une durée de développement ($4,44 \pm 0,04$ jours) de *P. persimilis* proche de celle obtenue par Escudero et Ferragut (2005) lorsqu'il consomme *T. urticae*. Kazak (2008) n'observe pas de différence significative dans la durée de développement selon qu'il consomme des larves ($5,79 \pm 0,24$ jours) ou des protonymphes ($5,73 \pm 0,14$ jours) de *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval (synonyme de *T. urticae*).

Bien que l'ensemble des stades de *P. persimilis* en dehors du stade larvaire (qui ne se nourrit pas) consomme tous les stades de développement des tétranyques (Laing, 1968; Ashihara *et al.*, 1978; Chittenden et Saito, 2001), une légère préférence a été observée pour le stade œuf (Takafuji et Chant, 1976; Blackwood *et al.*, 2001).

❖ Le taux de fécondité des femelles (nombre d'œufs pondus par femelle et par jour) est aussi dépendant des espèces de proies consommées. Le taux de fécondité est relativement plus faible lorsqu'il consomme *T. evansi* ($1,17 \pm 0,76$) que *T. turkestanii* ($3,84 \pm 0,35$), *T. urticae* ($3,97 \pm 0,37$) ou *T. ludeni* ($3,79 \pm 0,41$) (Escudero et Ferragut, 2005). Des valeurs proches ont été obtenues ($3,70 \pm 0,10$) par Abdad-Moyano *et al.* (2008) et Kazak (2008) avec *T. urticae* comme proie.

❖ Enfin, la sex ratio est biaisée en faveur des femelles comme pour la majorité des espèces de Phytoseiidae (Helle et Sabelis, 1985a). Cependant, ce paramètre varie en fonction des proies et de leur abondance (Toyashima et Amano, 1998). Elle est de 2 : 1 (femelle : mâle) quand *P. persimilis* consomme *T. turkestanii*, *T. urticae* ou *T. ludeni* et de 1 : 2 (femelle : mâle) lorsqu'il consomme *T. evansi* (Escudero et Ferragut, 2005). Lorsque la densité des proies est faible, la proportion de femelles avoisine souvent les 50 % (Toyashima et Amano, 1998).

Un dernier mot sur la résistance de *P. persimilis* aux conditions environnementales ; lorsque les pourcentages d'hygrométrie relative sont compris entre 70 et 75 %, les œufs et les stades immatures de *P. persimilis* peuvent tolérer des conditions de

température proches de 35 °C mais ils ne survivent pas au-delà de 40 °C (McClanahan, 1968).

IV.B.3.1. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio de *Phytoseiulus macropilis*

Les caractéristiques biologiques de *P. macropilis* ont été moins étudiées que celles de *P. persimilis*.

Dans des conditions optimales de développement, il n'y a pas de différence significative dans la durée de développement du stade œuf au stade adulte, selon qu'il consomme des œufs ($5,7 \pm 0,4$ jours) ou des immatures ($5,5 \pm 0,4$) de *T. urticae* ($4,8 \pm 0,02$) (Silva *et al.*, 2005). Le taux de fécondité des femelles (nombre d'œufs pondus par femelle par jour) observé était de : $1,9 \pm 0,2$ (Ali *et al.*, 1998) ou $2,97 \pm 0,04$ (da Silva *et al.*, 2005) lorsqu'il consomme *T. urticae*.

Enfin, la sex ratio est biaisée en faveur des femelles, comme pour la majorité des espèces de Phytoseiidae (Helle et Sabelis, 1985a). A 25°C, avec *T. urticae* comme proies, la sex ratio est biaisée en faveur des femelles à 72 % (Ali *et al.*, 1998).

IV.B.4. Importance de ces deux espèces en lutte biologique

Phytoseiulus persimilis est généralement utilisée dans des stratégies de lutte biologique par augmentation inondative à travers le monde, notamment dans les cultures sous serre (Zhang, 2003).

C'est à partir de la fin des années 60 que des programmes ont été mis en place pour contrôler *T. urticae* dans les cultures sous serre à l'aide de *P. persimilis*, principalement dans les cultures de concombres et de poivrons (McMurtry, 1991). Actuellement, cette espèce est utilisée pour contrôler *T. urticae* dans de nombreuses cultures à travers le monde (Gerson *et al.*, 2003). En effet, elle a été utilisée par exemple avec succès dans des cultures de : framboises (Charle *et al.*, 1985 ; Waite, 1988), clémentines (Abad-Moyano *et al.*, 2010), concombres et poivrons (Gould *et al.*, 1969 ; Jarošík, 1990), fraises (Battaglia *et al.*, 1990 ; McMurtry, 1991 ; Van de Vrie et Price, 1994), pommes (Steinberg et Cohen, 1992), aubergines (Chermiti, 1992) et enfin sur plantes ornementales (McMurtry *et al.*, 1978 ; Dong *et al.*, 1986 ; Gough, 1991 ; Grafton-Cardwell *et al.*, 1997).

En culture de tomate toutefois, *P. persimilis* à l'instar d'autres prédateurs semble gêné par les trichomes glandulaires (Chatzivasileiadis et Sabelis, 1997 ; Maluf *et al.*, 2001) et son efficacité n'est pas satisfaisante (Drukker *et al.*, 1997 ; Castagnoli *et al.* 1998 ; Kennedy, 2003). Un programme de recherche basé sur l'adaptation d'une population de *P. persimilis* à la tomate, par des sélections successives, a abouti au développement d'une souche qui semblerait tolérante à ces conditions (*P. persimilis* Tomato strain) (Drukker *et al.*, 1997 ; Zhang, 2003). Malheureusement, des problèmes subsistent concernant la transmission de cette tolérance à la descendance. Les conclusions récentes de deux travaux de thèse (Furtado, 2007 ; Ferrero, 2009) ont mis en évidence que deux populations de *P. longipes* originaires d'Argentine et du Brésil pourraient constituer des candidats potentiels pour contrôler les tétranyques sur tomates.

Phytoseiulus macropilis a permis de lutter efficacement contre *Tetranychus yusti* McGregor dans des cultures de Cotton (Saba, 1971) et contre *T. urticae* dans des cultures de plantes ornementales sous serre (Prasad, 1967 ; Hamlen et Lindquist 1981).

IV.B.5. La distribution géographique des deux espèces

Des introductions « commerciales » de *P. persimilis* ont été réalisées dans de nombreuses cultures à travers le monde (Gerson *et al.*, 2003). Elle est aujourd'hui présente sur tous les continents (McMurtry, 1982 ; Takahashi et Chant, 1993a, Moraes *et al.*, 2004). De ce fait, il est très difficile de déterminer l'origine exacte de *P. persimilis*. Si l'on se base sur la distribution géographique de cette espèce avant les années 70 (Kanouh *et al.*, 2010b), elle a été observée **dix fois** dans la région **Ouest Paléarctique** (Algérie, Israël, Italie, Liban et Libye) (Athias-Henriot, 1959, 1960 ; Damiano, 1961 ; Swirski et Amitai, 1968) ; et **quatre fois** dans la région **Néotropicale** précisément au Chili (Gonzalez, 1961 ; Kennett et Caltagirone, 1968). Ceci suggère donc que *P. persimilis* aurait été présente dans la région Ouest-Paléarctique avant son introduction massive pour la lutte biologique.

La distribution géographique de *P. macropilis* est totalement différente. Actuellement, elle est présente dans les régions Néotropicales, Néarctiques, Ouest-Paléarctiques et Ethiopiennes (McMurtry et Croft, 1997 ; Moraes *et al.*, 2004). Avant les années 70, cette espèce était observée essentiellement dans les régions Néotropicales et Néarctiques. Le fait que ces deux espèces aient été signalées de la région

Néotropicale avant leur introduction massive à travers le monde et qu'elles partagent un ancêtre commun avec une autre espèce du même genre (*P. fragariae*), originaire de la région Néotropicale, laisse supposer que *P. macropilis* et *P. persimilis* pourraient avoir une origine Néotropicale (Kanouh *et al.*, 2010b).

IV.B.6. Populations et espèces étudiées

Cinq populations de *P. persimilis* originaires principalement d'Europe et deux populations de *P. macropilis* originaires de la région Néotropicale ont été collectées et analysées dans cette étude. Des mesures morphométriques de trente-deux caractères continus ont été effectuées sur vingt-neuf spécimens de *P. persimilis* et quinze spécimens de *P. macropilis*. Les analyses moléculaires ont été effectuées avec deux marqueurs mitochondriaux. Nous avons analysé: cinquante-quatre spécimens avec le marqueur 12S (420 pb) et vingt-neuf avec le marqueur Cytb (416 pb). Une espèce témoin *P. fragariae* a été choisie pour caractériser les distances interspécifiques. Cette espèce se distingue facilement des deux autres (*P. persimilis* et *P. macropilis*) par la nature de la soie j6 et de la macrosoie StIV, la longueur des soies Z1 et j5 et enfin, l'absence de la soie JV4.

IV.B.7. Article 4. Okassa M., Tixier M.-S., Kreiter S (2010). Morphological and molecular diagnostic of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot and *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari : Phytoseiidae). Experimental and Applied Acarology 59: 291-303.

Abstract

This study focuses on the diagnostic of two species of natural enemies, belonging to the genus *Phytoseiulus* in the family Phytoseiidae (sub-family Amblyseinae): *Phytoseiulus macropilis* and *P. persimilis*. These two species are of primary importance in biological control all over the world. However, they are morphologically very similar and specific diagnostic is difficult. This study utilizes the help of mitochondrial molecular markers (12S rRNA and Cytb mtDNA) to differentiate these two species. Morphological analyses showed significant differences between *P. persimilis* and *P. macropilis* for 17 morphological characters on the 32 considered. However, despite these significant differences, an overlap in the ranges of variation (min-max) is observed for all the characters. Only the serration of the macroseta on the basitarsus (StIV) allows the differentiation between *P. persimilis* and *P. macropilis*. Despite these small morphological differences, molecular results, for both mitochondrial DNA fragments considered (rRNA and Cytb mtDNA) showed a clear delineation between the specimens of *P. macropilis* and *P. persimilis*. This study emphasizes (i) that only one morphological character (serration of the seta StIV) clearly separates these two species; (ii) the usefulness of an automatical molecular and simple diagnostic tool for differentiating accurately these two species and ensure the morphological diagnostic. Further studies are proposed, including more DNA sequences especially for *P. macropilis*.

Keywords: *Phytoseiulus*, Diagnostic, 12S rRNA, Cytb mtDNA, Taxonomy.

Introduction

The mite family Phytoseiidae includes the most efficient natural enemy species of mite pests in the world (Kostiainen and Hoy 1996; McMurty and Croft 1997). Specific diagnostic is thus of primary importance for the success of biological control programs and to ensure quality (purity) of natural enemies released. Species delineation is however often difficult. First, very few characters are available to

distinguish between species of Phytoseiidae because of their microscopic size (less than 500 μm in length) (Chant and McMurtry 1994, 2007). Furthermore, the reliability of some characters to distinguish between species is often questioned. For instance, great variation in idiosomal seta lengths, that are often considered as key diagnostic characters, is reported in the same species (Tixier et al. 2006b). Molecular markers clearly can make a contribution in this area and assist species diagnostic, especially through the recently developed barcoding approaches (Hebert et al. 2003, 2004; Vogler and Monaghan 2007). Furthermore, molecular markers for resolving taxonomic questions are also used more frequently in Acarology (i.e. Navajas & Fenton, 2000; Navajas et al. 2001; Cruickshank 2002; Dabert 2006; Tixier et al. 2006a, b; Niogret and Nicot 2007; Tselila et al. 2007; Hurtado et al. 2007; Niogret and Nicot, 2008; Tixier et al. 2008; Okassa et al. 2009).

This study focuses on the diagnostic of two species of the genus *Phytoseiulus* Evans (sub-family Amblyseiinae): *Phytoseiulus macropilis* (Banks) and *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot. These two species are of primary interest in biological control programs, *P. persimilis* being the most sold natural enemy in the world. *Phytoseiulus macropilis* and *P. persimilis* are considered as two valid species, as previous cross-breeding experiments showed a complete reproductive isolation (Takahashi and Chant 1993d). However, very few characters allow their differentiation. According to Takahashi and Chant (1993b), *P. persimilis* and *P. macropilis* differ by the nature of the macroseta on the basitarsus IV (stIV) and the lengths of three dorsal idiosomal setae j6, Z1 and Z4. The setae stIV of *P. macropilis* are serrated instead of smooth for *P. persimilis*, and the lengths of the setae j6, Z1 and Z4 are slightly longer for *P. persimilis*. However, several studies showed great variations in seta lengths within a same species and thus the low reliability of such characters for species diagnostic (Tixier et al. 2003, 2006 a, b, 2008 a, b). Furthermore, setal serration is not easy to observe and this character is never used alone to discriminate between two species of Phytoseiidae. Thus, the reliability of these characters for differentiating *P. macropilis* and *P. persimilis* is questioned. Another character has been proposed to separate these two species, i.e. the position of the preanal seta JV2. McMurtry (1983) and Takahashi and Chant (1993b) observed this seta outside the ventrianal shield for *P. persimilis*, and on the ventrianal shield of *P. macropilis*. However, for some specimens identified as *P. macropilis*, these authors also observed that this seta was inserted outside the ventrianal shield.

Because of those diagnostic difficulties, this study questions the use of two mitochondrial molecular markers (12S rRNA and Cytb mtDNA) to differentiate these two species.

Material and methods

The populations studied

Five populations of *P. persimilis* and two of *P. macropilis* were considered. Specimens of *P. macropilis* were differentiated from those of *P. persimilis* according to the position of the seta JV2 (on the ventrianal shield for all the specimens of *P. macropilis* examined) and to the serration of StIV. Specimens of a same population were collected from fields on several plants of the same species in a same locality. Mites were collected directly from leaves with a clean fine hair-brush and immediately put in plastic vials filled with alcohol (100 %). To evaluate the intra- and interspecific variation, we try to include samples from throughout the distribution range of the species considered, as much as possible. Four populations of *P. persimilis* were collected in fields (France on *Phaseolus vulgaris* L., Spain on an unknown plant, Tunisia on an unknown plant, Italy on unknown plant) and one originated from a commercial rearing unit: England (Syngenta Bioline) (Table 1). *Phytoseiulus persimilis* is nowadays spread out all around the world, due to biological control releases. Because of these massive introductions, it is very difficult to determine the original distribution range of this species. Nevertheless, if we consider its distribution before 1970 (before large programs of biological control), this species was mainly reported from the West Palaearctic area. The populations of *P. persimilis* here considered were all collected in this latter region.

Just like *P. persimilis*, *P. macropilis* was released in various parts of the world for biological control purpose; it is thus difficult to determine its original distribution range. Before 1970, this species was essentially reported from the Neotropical and Nearctic regions, and from Hawaii (Moraes et al. 2004).

Table 1. Characteristics of collection localities of the different populations and species considered and accession numbers in genbank database.

| Mite species | Location | Host plant | Accession numbers of sequences obtained 12S rDNA | Accession numbers of sequences obtained Cytb mtDNA |
|--------------------------------|-------------|---------------------------|--|--|
| <i>Phytoseiulus persimilis</i> | France | <i>Phaseolus vulgaris</i> | FJ985106 | FJ985069 |
| | | | FJ985107 | FJ985070 |
| | | | FJ985108 | FJ985071 |
| | | | FJ985109 | FJ985072 |
| | | | FJ985110 | FJ985073 |
| | | | FJ985111 | FJ985074 |
| | | | FJ985112 | FJ985075 |
| | | | FJ985113 | |
| | | | GU232498 | |
| | | | GU232499 | |
| <i>Phytoseiulus persimilis</i> | Spain | Unknown plant | FJ985096 | FJ985076 |
| | | | FJ985097 | FJ985077 |
| | | | FJ985098 | FJ985078 |
| | | | FJ985099 | FJ985079 |
| | | | FJ985100 | FJ985080 |
| | | | FJ985101 | |
| | | | FJ985102 | |
| | | | FJ985103 | |
| | | | FJ985104 | |
| | | | FJ985105 | |
| <i>Phytoseiulus persimilis</i> | mass-reared | Rearing units | FJ985114 | FJ985081 |
| | | | FJ985115 | FJ985082 |
| | | | FJ985116 | FJ985083 |
| | | | FJ985117 | FJ985084 |
| | | | FJ985118 | FJ985085 |
| | | | FJ985119 | |
| | | | FJ985120 | |
| | | | FJ985121 | |
| | | | FJ985122 | |
| | | | FJ985123 | |
| <i>Phytoseiulus persimilis</i> | Italy | Unknown plant | GU232500 | GU232491 |
| | | | GU232501 | GU232492 |
| | | | GU232502 | GU232493 |
| | | | GU232503 | |
| | | | GU232504 | |
| <i>Phytoseiulus persimilis</i> | Tunisia | Unknown plant | GU232505 | GU232494 |
| | | | GU232506 | GU232495 |
| | | | GU232507 | GU232496 |
| | | | GU232508 | GU232497 |
| | | | | |
| <i>Phytoseiulus macropilis</i> | Argentina | Solanaceae | FJ985129 | FJ985091 |
| | | | FJ985130 | FJ985092 |
| | | | FJ985131 | FJ985093 |
| | | | FJ985132 | FJ985094 |
| | | | FJ985133 | FJ985095 |
| <i>Phytoseiulus fragariae</i> | Argentina | Solanaceae | FJ985124 | FJ985086 |
| | | | FJ985125 | FJ985087 |
| | | | FJ985126 | FJ985088 |
| | | | FJ985127 | FJ985089 |
| | | | FJ985128 | FJ985090 |

The two populations of *P. macropilis* considered were collected in fields in the Neotropical region (Argentina on *Solanum americanum* Miller, French West Indies, Guadeloupe on *P. vulgaris*) (Table 1). Only the population of *P. macropilis* from Argentina was considered for molecular experiments. The specimens from the French West Indies were mounted on slides and no specimens preserved in alcohol were available. However, in order to analyse more specimens of *P. macropilis*, surveys were carried out in the French West Indies, but no specimen was found. Furthermore, attempts to obtain *P. macropilis* from Hawaii, where this species was studied, were unsuccessful. Specimens of *Phytoseiulus fragariae* Denmark &

Schicha (collected in Argentina) were used as a control in order to assess interspecific genetic distances (Table 1).

Morphological analyses

Forty-four females were mounted on slides in Hoyer's medium and observed with a phase and differential interference contrast microscope (Leica DMLB, Leica Microsystems Parc du Saint-Laurent, Bâtiment Québec, 54 route de Sartrouville, 78232 Le Pecq) (40x magnification). Fifteen females of *P. macropilis* (five from Argentina and 10 from French West Indies) and 29 females of *P. persimilis* (7 from Spain, 4 from Italy, 11 from Syngenta Bioline rearings and 7 from Tunisia) were considered. A total of 32 characters were taken into account. As dorsal seta lengths are usually considered in phytoseiid mite taxonomy, the fifteen dorsal idiosomal setae of females were measured: j1, j3, j4, j5, j6, J5, z2, z4, z5, s4, Z4, Z5, S5, r3 et R1. Other characters, such as the lengths of the setae JV5, the macrosetae on the basitarsus IV (StIV), tibia IV and genu IV and the dimensions (length and width) of the dorsal shield and of the three ventral shields were also taken into account. Seta terminology used in this paper follows that of Lindquist and Evans (1965) as adapted by Rowell et al. (1978) for the Phytoseiidae. All values of measurements are given in micrometers.

Molecular analyses

Mitochondrial DNA (mtDNA) was widely used in taxonomic and population studies for insects (Simon et al. 1994; Roehrdanz and Degrugillier 1998) and for some mites (Navajas et al. 1996; Navajas & Fenton 2000; Otto and Wilson 2001; Cruickshank 2002; Evans and Lopez 2002; Jeyaprakash and Hoy 2002; Warrit et al. 2006; Tixier et al. 2006a, 2006b, 2008a; Okassa et al. 2009). As Cytochrome Oxidase I mtDNA is widely used for species barcoding (Hebert et al. 2003, 2004), we first tried to use this molecular marker. However, despite the use of several primers and of different PCR conditions, difficulties were encountered to amplify this DNA fragment with sufficient regularity. For this, we thus choose to use two other mitochondrial markers: the 12S rRNA, that was successfully used for Phytoseiidae species discrimination (Jeyaprakash and Hoy 2002; Okassa et al. 2009; Tixier et al. 2010) and the Cytb mtDNA fragment. It is the first time that this latter DNA fragment is considered for mite species delineation, but it discriminated successfully between insect species (i.e. Gray et al. 2006; Coeur d'Acier et al. 2007, 2008).

Total DNA was extracted from a single individual using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden). The primers used to amplify the 12S rRNA and the Cytb mtDNA fragments were, respectively: 5'-3' TACTATGTTACGACTTAT and 5'-3' AAAGTAGGATTAGATACCC (Jeyaprakash and Hoy 2002), and 5'-3' TAWRAARTATCAYTCDGGTTKRATATG and 3'-5' CCWTGAGGACAAATAWSWTTYTGAGG. These latter primers were obtained by Wannas Dermauw (University of Ghent, Belgium) for amplifying Cytb mtDNA of *P. persimilis* (W. Dermauw, pers. comm.). Then, the sequences so obtained were compared with the only Cytb mtDNA fragment available for Phytoseiidae in Genbank, contained in the whole mitochondrial genome of *Galendromus occidentalis* (Nesbitt) (Jeyaprakash and Hoy 2007).

A PCR was performed in a total volume of 25 µl containing 2 µl of mite DNA, 2.5 µl (1.5 mM) of buffer 10X (KCl), 1 µl (1 mM) of MgCl₂, 0.5 µl (0.05 mM for each) of dNTP, 0.175 µl (0.7 µM) of each primer, 0.125 µl (0.625 U) of Taq Qiagen and 18.525 µl of water. Thermal cycling conditions were as follows, for the 12S rRNA marker: 95 °C for 1 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 40 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and an additional 5 min at 72 °C; for the Cytb mtDNA marker: 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 92 °C for 20 s, 53 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and an additional 5 min at 72 °C. Electrophoresis was carried out on 1.5 % agarose gel in 0.5 X TBE buffer during 30 min at 100 volts.

PCR products were sequenced using the dynamic ET terminator cycle sequencing kit. Purification of DNA was carried out with Exosap-IT (Amersham). The sequencer used was the Megabase 1,000 apparatus. All DNA fragments were sequenced along both strands. Sequences were analysed and aligned with Geneious v3.5.4 (Drummond *et al.*, 2007). The numbers of sequences obtained for each species considered and their accession number in Genbank database are shown in the table 1.

Data analysis

Morphological analyses. Student tests were performed to determine differences in measurements between the two species considered (StatSoft France 2008). A principal component analysis was processed to determine whether the combination of the morphological characters can differentiate *P. macropilis* and *P. persimilis* (StatSoft France 2008).

Molecular analyses. Molecular analyses were conducted using Mega 4.0.2® (Tamura et al. 2007). The Neighbour joining trees were constructed using the Kimura 2-parameter model and node support was determined using 1000 bootstrap replicates.

Results

Morphological analyses

Significant differences between *P. persimilis* and *P. macropilis* were observed for 17 characters on the 32 considered (Table 2). These differences were very small and standard errors within species are low. An overlap in the ranges of variation (min-max) is observed for all the characters. When combining the present data with those of Takahashi and Chant (1993b) in order to increase the morphological data set, the same result is observed (Table 2). It thus seems difficult to accurately separate these two species, taking into account a single morphological character. On the two axes of the multifactorial analysis (Figure 1) showing 33.3 % of the total variation, these two species are globally well separated. However, some specimens of both species are close to each other. Even if a combination of characters would allow a global differentiation between these two species, caution must be paid because specimens identified as *P. macropilis* or *P. persimilis* could have similar measurements.

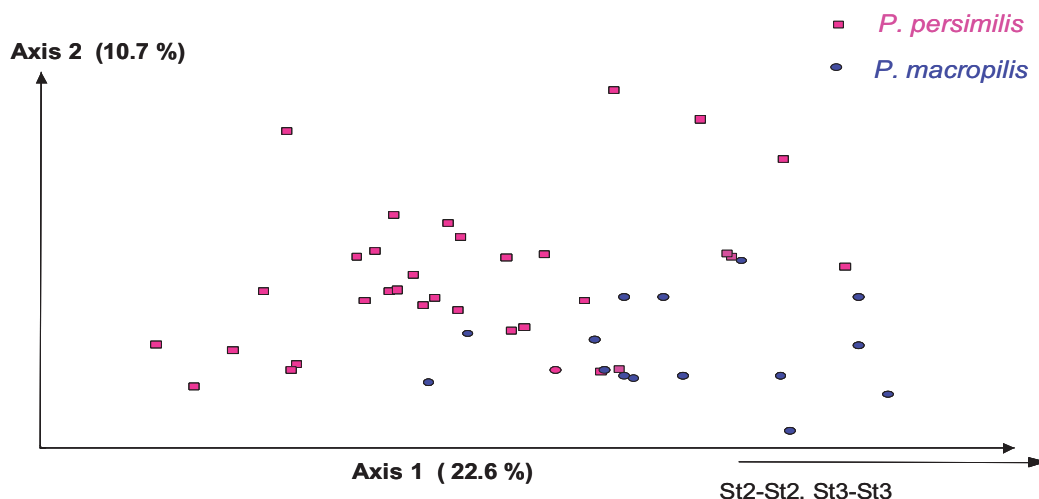


Figure 1. Scatter plots of the first two multifactorial axes for 32 morphological characters of *Phytoseiulus macropilis* and *Phytoseiulus persimilis*. Percentages in axis refer to the amount of variation accounted for by the first and second axis in the multifactorial analysis

Table 2. Mean, Min, Max, Standard Error (SE) for *Phytoseiulus macropilis* and *P. persimilis*, and results of the ANOVA (DSL: dorsal shield length, DSW: dorsal shield width, VAS: ventrianal shield; StIV, GeIV, StiIV: macroseta lengths on the basitarsus, genua, tibia of the leg IV, respectively)

| | <i>P. macropilis</i> | | | | <i>P. persimilis</i> | | | | <i>P</i> | <i>P. macropilis</i> * <i>P. persimilis</i> * | |
|-------------------------|----------------------|----|-----|-----|----------------------|----|-----|-----|----------|---|---------------|
| | Mean | SE | Min | Max | Mean | SE | Min | Max | | | |
| DSL | 320 | 22 | 274 | 350 | 339 | 17 | 316 | 369 | 0.010 | 314 (300-323) | 322 (314-330) |
| DSW | 208 | 12 | 189 | 224 | 227 | 17 | 196 | 256 | 0.001 | 221 (208-230) | 224 (215-232) |
| j1 | 23 | 3 | 18 | 27 | 26 | 2 | 22 | 32 | 0.002 | 23 (20-26) | 28 (25-32) |
| j3 | 40 | 3 | 35 | 45 | 42 | 5 | 31 | 51 | 0.15 | 45 (37-48) | 42 (38-46) |
| j4 | 51 | 2 | 48 | 55 | 52 | 7 | 39 | 72 | 0.34 | 42(40-50) | 50 (48-52) |
| j5 | 67 | 6 | 54 | 75 | 77 | 7 | 62 | 92 | 0.0001 | 64 (55-73) | 69 (65-74) |
| j6 | 152 | 8 | 138 | 164 | 150 | 11 | 114 | 161 | 0.95 | 129 (123-135) | 152 (145-160) |
| J5 | 5 | 0 | 4 | 5 | 5 | 1 | 4 | 8 | 0.03 | 5 (4-6) | 6 (5-6) |
| z2 | 10 | 2 | 8 | 14 | 12 | 2 | 7 | 16 | 0.04 | 16 (15-20) | 12 (10-13) |
| z4 | 56 | 6 | 47 | 66 | 58 | 6 | 39 | 68 | 0.36 | 52 (45-62) | 61 (57-65) |
| z5 | 10 | 2 | 8 | 12 | 10 | 2 | 7 | 15 | 0.97 | 11 (8-10) | 9 (8-12) |
| s4 | 169 | 9 | 153 | 180 | 163 | 14 | 114 | 183 | 0.18 | 158 (145-170) | 165 (159-172) |
| Z1 | 106 | 9 | 88 | 123 | 107 | 7 | 94 | 124 | 0.65 | 97 (95-101) | 110 (105-115) |
| Z4 | 125 | 7 | 110 | 136 | 135 | 8 | 119 | 152 | 0.001 | 117 (105-123) | 134 (131-138) |
| Z5 | 113 | 8 | 99 | 126 | 125 | 6 | 113 | 137 | 0.000006 | 114 (105-125) | 126 (120-132) |
| S5 | 29 | 5 | 22 | 42 | 29 | 5 | 20 | 37 | 0.95 | 34 (23-44) | 32 (25-38) |
| r3 | 23 | 4 | 19 | 28 | 24 | 4 | 17 | 29 | 0.32 | 23 (21-24) | 24 (20-26) |
| R1 | 22 | 3 | 19 | 27 | 29 | 3 | 22 | 33 | 0.0003 | 25 (22-30) | 28 (25-32) |
| JV5 | 40 | 6 | 30 | 48 | 45 | 7 | 32 | 62 | 0.10 | 38 (33-40) | 40 (35-44) |
| STIV | 109 | 7 | 98 | 119 | 123 | 7 | 108 | 132 | 0.000000 | 107 (90-116) | 126 (110-135) |
| GeIV | 76 | 9 | 55 | 87 | 83 | 5 | 69 | 94 | 0.004 | 73 (65-80) | 84 (80-91) |
| StiIV | 37 | 5 | 30 | 45 | 44 | 3 | 38 | 48 | 0.0001 | 34 (30-40) | 45 (40-48) |
| st1-st1 | 53 | 3 | 48 | 56 | 54 | 4 | 47 | 61 | 0.50 | - | - |
| st2-st2 | 75 | 5 | 69 | 83 | 80 | 5 | 69 | 91 | 0.02 | - | - |
| st3-st3 | 88 | 4 | 84 | 96 | 94 | 5 | 83 | 104 | 0.01 | - | - |
| st1-st3 | 72 | 3 | 68 | 77 | 74 | 4 | 67 | 82 | 0.32 | - | - |
| st4-st4 | 100 | 4 | 94 | 105 | 99 | 11 | 82 | 120 | 0.78 | - | - |
| st5-st5 | 78 | 5 | 70 | 85 | 86 | 4 | 76 | 92 | 0.0001 | - | - |
| st2-st3 | 32 | 2 | 28 | 34 | 33 | 2 | 28 | 37 | 0.60 | - | - |
| VAS length | 91 | 6 | 81 | 99 | 81 | 7 | 69 | 90 | 0.00007 | 93 (89-98) | 92 (90-95) |
| VAS width at level JV2 | 61 | 4 | 54 | 69 | 57 | 6 | 48 | 69 | 0.08 | - | - |
| VAS width at level anus | 71 | 4 | 64 | 77 | 77 | 8 | 63 | 95 | 0.02 | - | - |

* Mean (min-max) from Takahashi and Chant (1993b)

Molecular analyses

Fragments of 516 bp and 454 bp were amplified for the mitochondrial 12S rRNA and Cytb mtDNA, respectively. DNA analysis showed quite similar and constant rates of nucleotide substitutions for all the populations and species studied. Among the 516 bp and 454 bp amplified, 440 and 454 were aligned for the 12S rRNA and Cytb mtDNA, respectively. A BLAST search of the Genbank database showed that the sequences aligned with other 12S rRNA and Cytb mtDNA sequences of Phytoseiidae.

For both mitochondrial DNA fragments, no overlap is noted between intra- and interspecific distances for the three species of the genus *Phytoseiulus* considered (Figure 2a, b). The interspecific genetic distances were lower for the 12S rRNA fragment. For this latter molecular marker, the mean genetic distances among the specimens of *P. persimilis* and of *P. macropilis* were 0. For the Cytb mtDNA, intraspecific distances ranged from 0 to 0.6 % (mean = 0.1 % \pm 0.1) for *P. persimilis* and from 0 to 0.3 % (mean = 0.1 % \pm) for *P. macropilis*. For both mitochondrial DNA fragments, the highest genetic distances were observed between *P. persimilis* and *P. fragariae* (12S rRNA: mean = 10.7 % \pm 0; Cytb mtDNA: mean = 21.7 % \pm 0.2), and between *P. macropilis* and *P. fragariae* (12S rRNA: mean = 12.6% \pm 0; Cytb mtDNA: mean = 27 % \pm 0.2), whereas the lowest interspecific distances were observed between *P. macropilis* and *P. persimilis* (12S rRNA: mean = 3.8 % \pm 0; Cytb mtDNA: mean = 14.1 % \pm 0.2). The NJ trees show a clear separation between the specimens of *P. macropilis* and those of *P. persimilis* (Figure 3a, b).

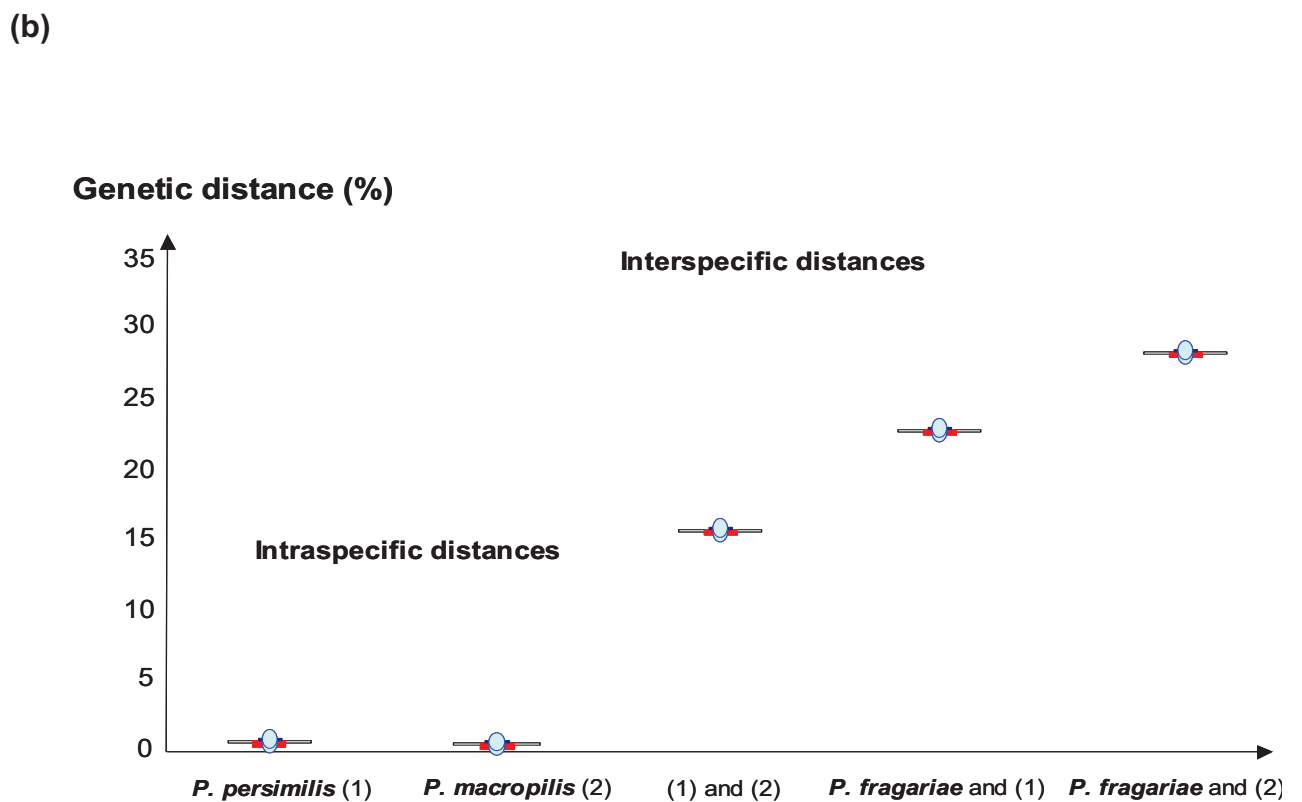
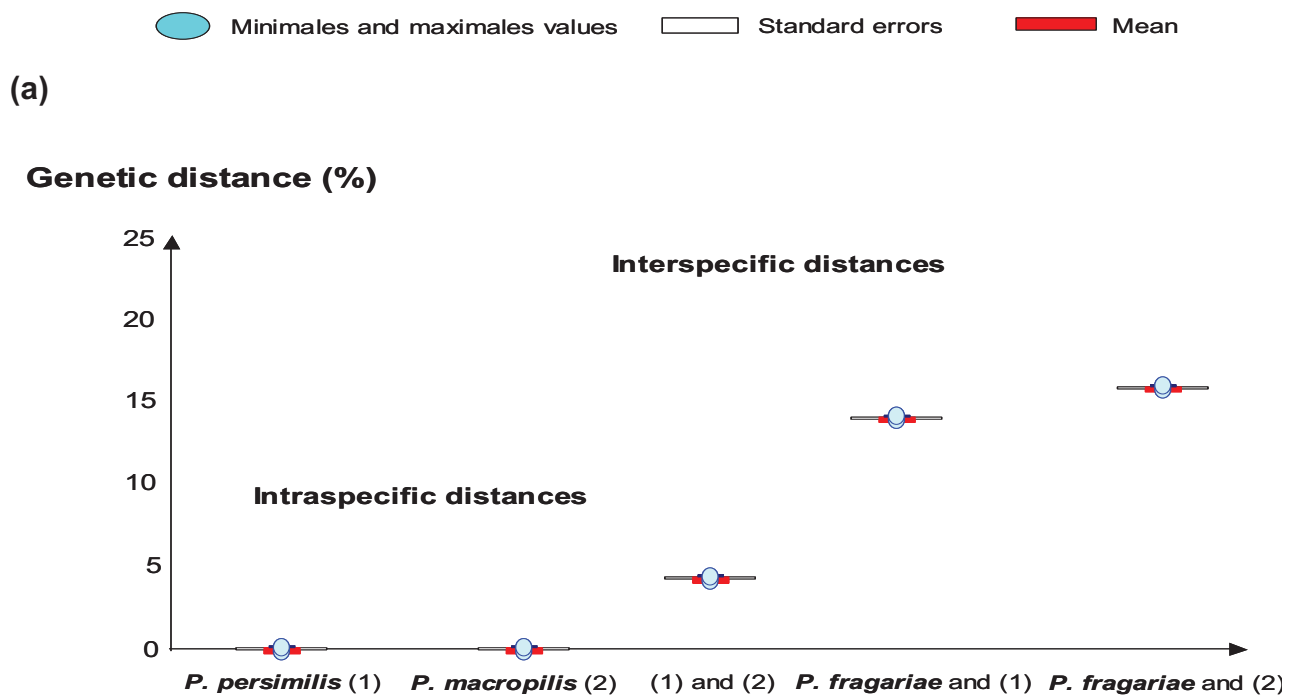


Figure 2. Genetic distances between and within *P. macropilis*, *P. persimilis* and *P. fragariae* for the two molecular marker used 12S rRNA (a) and Cytb mtDNA (b).

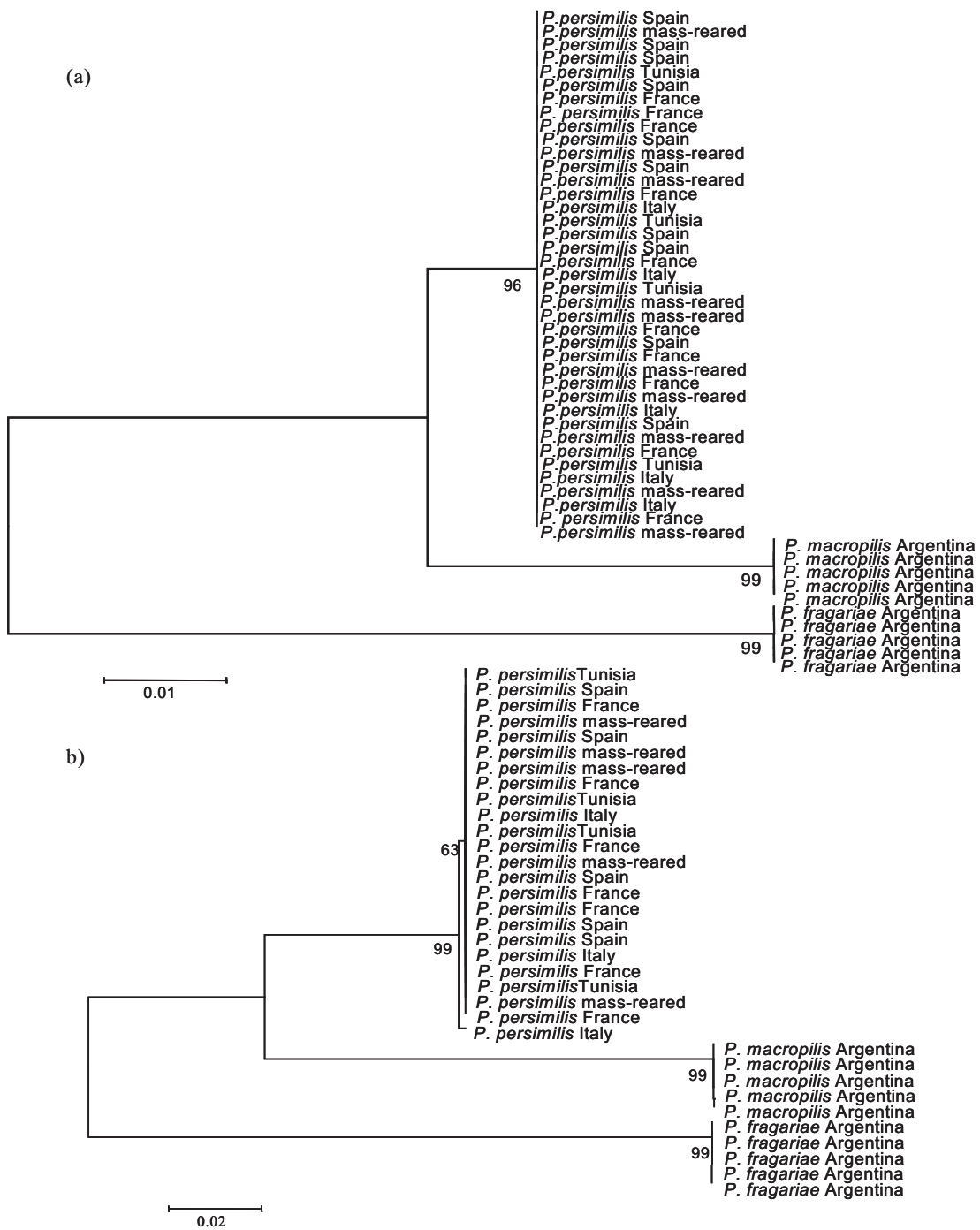


Figure 3. Neighbour joining trees based on genetic distances between the specimens of *P. persimilis*, *P. macropilis* and *P. fragariae* with (a) the 12S rRNA fragment and (b) with the Cytb mtDNA fragment. The numbers at nodes correspond to bootstrap values.

Table 2. Mean, Min, Max, Standard Error (SE) for *Phytoseiulus macropilis* and *P. persimilis*, and results of the ANOVA (DSL: dorsal shield length, DSW: dorsal shield width, VAS: ventrianal shield; StIV, GeIV, StilV: macroseta lengths on the basitarsus, genua, tibia of the leg IV, respectively)

| | <i>P. macropilis</i> | | | | <i>P. persimilis</i> | | | | <i>P</i> | <i>P. macropilis</i> * <i>P. persimilis</i> * | |
|-------------------------|----------------------|----|-----|-----|----------------------|----|-----|-----|----------|---|----------------------|
| | Mean | SE | Min | Max | Mean | SE | Min | Max | | <i>P. macropilis</i> | <i>P. persimilis</i> |
| DSL | 320 | 22 | 274 | 350 | 339 | 17 | 316 | 369 | 0.010 | 314 (300-323) | 322 (314-330) |
| DSW | 208 | 12 | 189 | 224 | 227 | 17 | 196 | 256 | 0.001 | 221 (208-230) | 224 (215-232) |
| j1 | 23 | 3 | 18 | 27 | 26 | 2 | 22 | 32 | 0.002 | 23 (20-26) | 28 (25-32) |
| j3 | 40 | 3 | 35 | 45 | 42 | 5 | 31 | 51 | 0.15 | 45 (37-48) | 42 (38-46) |
| j4 | 51 | 2 | 48 | 55 | 52 | 7 | 39 | 72 | 0.34 | 42(40-50) | 50 (48-52) |
| j5 | 67 | 6 | 54 | 75 | 77 | 7 | 62 | 92 | 0.0001 | 64 (55-73) | 69 (65-74) |
| j6 | 152 | 8 | 138 | 164 | 150 | 11 | 114 | 161 | 0.95 | 129 (123-135) | 152 (145-160) |
| J5 | 5 | 0 | 4 | 5 | 5 | 1 | 4 | 8 | 0.03 | 5 (4-6) | 6 (5-6) |
| Z2 | 10 | 2 | 8 | 14 | 12 | 2 | 7 | 16 | 0.04 | 16 (15-20) | 12 (10-13) |
| Z4 | 56 | 6 | 47 | 66 | 58 | 6 | 39 | 68 | 0.36 | 52 (45-62) | 61 (57-65) |
| Z5 | 10 | 2 | 8 | 12 | 10 | 2 | 7 | 15 | 0.97 | 11 (8-10) | 9 (8-12) |
| s4 | 169 | 9 | 153 | 180 | 163 | 14 | 114 | 183 | 0.18 | 158 (145-170) | 165 (159-172) |
| Z1 | 106 | 9 | 88 | 123 | 107 | 7 | 94 | 124 | 0.65 | 97 (95-101) | 110 (105-115) |
| Z4 | 125 | 7 | 110 | 136 | 135 | 8 | 119 | 152 | 0.001 | 117 (105-123) | 134 (131-138) |
| Z5 | 113 | 8 | 99 | 126 | 125 | 6 | 113 | 137 | 0.000006 | 114 (105-125) | 126 (120-132) |
| S5 | 29 | 5 | 22 | 42 | 29 | 5 | 20 | 37 | 0.95 | 34 (23-44) | 32 (25-38) |
| r3 | 23 | 4 | 19 | 28 | 24 | 4 | 17 | 29 | 0.32 | 23 (21-24) | 24 (20-26) |
| R1 | 22 | 3 | 19 | 27 | 29 | 3 | 22 | 33 | 0.0003 | 25 (22-30) | 28 (25-32) |
| JV5 | 40 | 6 | 30 | 48 | 45 | 7 | 32 | 62 | 0.10 | 38 (33-40) | 40 (35-44) |
| STIV | 109 | 7 | 98 | 119 | 123 | 7 | 108 | 132 | 0.000000 | 107 (90-116) | 126 (110-135) |
| GeIV | 76 | 9 | 55 | 87 | 83 | 5 | 69 | 94 | 0.004 | 73 (65-80) | 84 (80-91) |
| StilV | 37 | 5 | 30 | 45 | 44 | 3 | 38 | 48 | 0.0001 | 34 (30-40) | 45 (40-48) |
| st1-st1 | 53 | 3 | 48 | 56 | 54 | 4 | 47 | 61 | 0.50 | - | - |
| st2-st2 | 75 | 5 | 69 | 83 | 80 | 5 | 69 | 91 | 0.02 | - | - |
| st3-st3 | 88 | 4 | 84 | 96 | 94 | 5 | 83 | 104 | 0.01 | - | - |
| st1-st3 | 72 | 3 | 68 | 77 | 74 | 4 | 67 | 82 | 0.32 | - | - |
| st4-st4 | 100 | 4 | 94 | 105 | 99 | 11 | 82 | 120 | 0.78 | - | - |
| st5-st5 | 78 | 5 | 70 | 85 | 86 | 4 | 76 | 92 | 0.0001 | - | - |
| st2-st3 | 32 | 2 | 28 | 34 | 33 | 2 | 28 | 37 | 0.60 | - | - |
| VAS length | 91 | 6 | 81 | 99 | 81 | 7 | 69 | 90 | 0.00007 | 93 (89-98) | 92 (90-95) |
| VAS width at level JV2 | 61 | 4 | 54 | 69 | 57 | 6 | 48 | 69 | 0.08 | - | - |
| VAS width at level anus | 71 | 4 | 64 | 77 | 77 | 8 | 63 | 95 | 0.02 | - | - |

* Mean (min-max) from Takahashi and Chant (1993b)

Discussion

Morphological differentiation between *P. macropilis* and *P. persimilis*.

Takahashi and Chant (1993b) pointed out the importance of the nature of the macroseta on the basitarsus IV, the lengths of the setae Z4, j6 and Z1 for differentiating *P. macropilis* from *P. persimilis*. In the present study, j6 and Z1 mean lengths are not significantly different between the two species. The length of these two setae is indeed greatly higher for the specimens of *P. macropilis* presently considered than for those reported by Takahashi and Chant (1993b). The length of setae j6 and Z1 does not thus seem to be a reliable character to differentiate *P.*

macropilis from *P. persimilis*. In the same way, even if the mean length of the seta Z4 is significantly different between *P. macropilis* and *P. persimilis*, the variation range (min-max) overlaps. Again, the utility of this single character discriminating between *P. macropilis* and *P. persimilis* could be questioned. As already mentioned for other species of Phytoseiidae mites (Tixier et al. 2003, 2006 a, b, 2008 a, b), this study emphasizes high intraspecific variation of setae lengths, questioning their reliability for species diagnostic. When combining several morphological characters, a global separation between *P. persimilis* and *P. macropilis* is observed. However, caution must be paid as specimens from the two species could have similar measurements. The single character, also pointed out by Takahashi and Chant (1993b), to differentiate *P. macropilis* and *P. persimilis* is thus the serration of the seta StIV. McMurtry (1983) and Takahashi and Chant (1993b) questioned the position of the preanal setae JV2 (on or outside the ventrianal shield) as a reliable diagnostic character. McMurtry (1983) reported that for 12 of 25 females of *P. macropilis* (collected from Guatemala) JV2 was outside the ventrianal shield, and concluded that this character was not reliable. Takahashi and Chant (1993b) also showed that this character was not stable for specimens identified as *P. macropilis*, but in a lesser proportion. When dealing with such small mites, it was impossible to do extractions based on part of a single specimen, using the remainder as a voucher. It is thus impossible to know if the specimens of *P. macropilis* presently molecularly studied had JV2 inserted on or outside of the ventrianal shield. However, the five specimens observed from the same population as the specimens molecularly tested (Argentina), as well as the ten specimens from the French West Indies considered, had this seta on the ventrianal shield. Further studies, where a mass rearing of *P. macropilis* would be carried out, are planned. Molecular analysis on a great number of specimens from this rearing units, would allow comparison of molecular and morphological variations (specimens with or without JV2).

Molecular differentiation between P. macropilis and P. persimilis. At first, very low intraspecific distances were observed. Despite a long period of rearing, the commercialized population of *P. persimilis* does not differ to the wide populations for both mtDNA fragments considered. Furthermore, one can wonder if the intraspecific genetic distances would have been higher if more populations of both *P. macropilis* and *P. persimilis* would have been taken into account. This is particularly true for *P.*

macropilis for which only one population could have been retrieved. However, the same question could also be addressed to *P. persimilis*. Even if several populations of this latter species have been considered, all of them originated from the West Palearctic region. Yet, *P. persimilis* could have originated from this latter region or from the Neotropical one (Kanouh et al. 2010). For this, in further experiments, it would be interesting to take into account also specimens of *P. persimilis* from the Neotropical region. Genetic variation could actually exist between specimens of a same species according to their location (Tixier et al. 2010).

Despite the small morphological differences between *P. macropilis* and *P. persimilis*, a clear delineation between specimens of these two taxa was observed for the two mitochondrial DNA fragments considered (12S rRNA and Cytb mtDNA). The present study thus emphasizes the reliability of the two molecular markers (12S rRNA and Cytb mtDNA) to differentiate between the two taxa considered. The 12S rRNA fragment has been already used successfully to differentiate species among the family Phytoseiidae (Jeyaprakash & Hoy 2002; Okassa et al. 2009; Tixier et al. 2010), but it is the first time that Cytb mtDNA sequences are used for this aim. The present results shows its reliability to separate specimens from *P. macropilis* and *P. persimilis*.

Even if a clear genetic delineation between specimens identified as *P. macropilis* and *P. persimilis* was observed, the mean genetic distance between these two taxa remains weak (3.8 % for 12S rRNA). In other studies also using the 12S rRNA fragment (Jeyaprakash and Hoy 2002; Okassa et al. 2009; Tixier et al. 2010), genetic distances range from 9 to 22 % between two species of the same genus and from 0 to 3 % between specimens of a same species. Therefore, the taxonomic significance of the weak genetic differentiation between *P. macropilis* and *P. persimilis* is questionable, as its mean value is intermediate between the intra- and interspecific variations previously assessed. However, no overlap between intra- and interspecific genetic distances was observed. Furthermore, the maximum value observed in literature (3 %) between specimens from a same species was observed only once between two specimens of *Euseius finlandicus* (Oudemans). For all other specimens belonging to the same species, intraspecific genetic distances were very close to 0 % (Okassa et al. 2009; Tixier et al. 2010). All these elements, associated to the clear delineation also obtained with the Cytb mtDNA, seem thus to support the species status of *P. persimilis* and *P. macropilis*. The weak genetic distance between them

would confirm that these two taxa are two sister species, phylogenetically very close and recently diverged (Takahashi and Chant 1993a, c; Kanouh et al. 2010).

Conclusion

The present study emphasizes several important features. At first, the two morphological characters allowing a clear delineation between *P. macropilis* and *P. persimilis* are the serration of the macroseta StIV and the position of JV2. For this latter character, other experiments taking into account more specimens of *P. macropilis* have, however, to be conducted. Secondly, the use of molecular techniques allow a clear differentiation of specimens identified as *P. persimilis* and *P. macropilis*, which could emphasize the development of automatical molecular and simple diagnostic tools for taxa diagnostic, with direct applications in biological control programs. Lastly, these techniques would allow taxa differentiation whatever the development stage considered (i.e. immature stages), whereas with morphological observations, the diagnostic is essentially based on females. More experiments are however required especially analyses of different life stages of each species and analyses of more specimens and populations of *P. macropilis* and *P. persimilis* through out the world.

Acknowledgements

We are very grateful to Francisco Ferragut (University of Valencia, Spain), Mrs Blum, (Bioline Syngenta England) and Maxime Ferrero for their help in getting the specimens of *Phytoseiulus*, and to Wannes Dermauw (University of Ghent, Belgium) for Cytb mtDNA primers design.

References

- Chant DA, McMurtry JA (1994) A review of the sub-families Phytoseiinae and Typhlodrominae (Acari: Phytoseiidae). *Int. J. Acarol.* 20(4): 223-310.
- Chant DA, McMurtry JA (2007) Illustrated keys and diagnoses for the genera and subgenera of the Phytoseiidae of the world (Acari: Mesostigmata). Indira Publishing House, 220pp.

- Coeur d'Acier A, Jousselin E, Martin J F, Rasplus JY (2007) Phylogeny of the genus *Aphis* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 42(3): 598-611.
- Coeur d'acier A, Cocuzza G, Jousselin E, Cavalieri V, Barbagallo S (2008) Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Zool. Scr.* 37(2): 175-193.
- Cruickshank RH (2002) Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Syst. Appl. Acarol.* 7: 3-14.
- Dabert M (2006) DNA markers in the phylogenetics of the Acari. *Biol. Letters* 43(2): 97-107.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones- Havas S, Thierer T., Wilson A (2007) Geneious v3.5, available from: <http://www.geneious.com/> (accessed in March 2009).
- Evans JD, Lopez DL (2002) Complete mitochondrial DNA sequence of the important honey bee pest, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Exp. Appl. Acarol.* 27: 69-78.
- Gray DA., Barnfield P, Seifried M, Richards MH (2006) Molecular divergence between *Gryllus rubens* and *Gryllus texensis*, sister species of field crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Can.Entomol.* 138(3) : 305-313.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal Soc. Biol. Sc.* 270: 313–321.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10): 312.
- Hurtado MA, Ansaloni T, Cros-Arteil S, Jacas JA, Navajas M (2007) Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata : Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain : use for species discrimination. *Ann. Appl. Biol.* 153: 167-174.
- Jeyaprakash A, Hoy MA (2002) Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae). *Biol. Contr.* 25(2): 136-142.
- Jeyaprakash A, Hoy MA. (2007) The mitochondrial genome of the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Arthropoda: Chelicerata: Acari: Phytoseiidae) is unexpectedly large and contains several novel features. *Gene* 391: 264-274.

- Kanouh M, Tixier MS, Okassa M, Kreiter S (2010) Phylogenetic and biogeographic analysis of the genus *Phytoseiulus* (Acari: Phytoseiidae). Submitted to Zoologica Scripta.
- Kostiainen TS, Hoy MA (1996) The Phytoseiidae as biological control agents of pest mites and insects. A bibliography. Monograph 17, University of Florida, Agricultural Experiment Station, 355 pp.
- Lindquist E, Evans GW (1965) Taxonomic concepts in the Ascidae, with a modified setal nomenclature for the idiosoma of the Gamasina (Acarina: Mesostigmata). Memorium of the Entomological Society of Canada, 47, 64pp.
- McMurtry JA (1983) Phytoseiids mites from Guatemala, with descriptions of two new species and redefinitions of the genera *Euseius*, *Typhloseiopsis*, and the *Typhlodromus occidentalis* species-group (Acari: Mesostigmata). Int. J. Entomol. 25: 249-272.
- McMurtry JA, Croft BA (1997) Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. Annu. Rev. Entomol. 42: 291-321.
- Navajas M, Gutierrez J, Lagnel J, Boursot P (1996) Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites : a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. Bull. Entomol. Res. 86: 407-417.
- Navajas M, Fenton B (2000) The application of molecular markers in the study of diversity in acarology. Exp. Appl. Acarol. 24(10/11): 751-774
- Navajas M, Gutierrez J, Gotoh T (2001) Synonymy between two spider mite species: *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangea* (Acari: Tetranychidae), shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments. Bull. Entomol. Res. 91: 117-123.
- Niogret J, Nicot A (2007) Combination of morphological characters and ITS-sequence to characterize a new species *Macrocheles* (Acari: Macrochelidae) Zootaxa 1873: 39-49.
- Niogret J, Nicot A (2008) Combined approach using morphology and ITS-sequence for description of three new species of *Macrocheles* (Acari: Macrochelidae). Zootaxa 1386: 19-29.
- Okassa M, Tixier M-S, Cheval B, Kreiter S (2009) Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). Can. J. Zool. 87: 689-698.

- Otto JC, Wilson KJ (2001) Assessment of the usefulness of ribosomal 18s and mitochondrial COI sequences in Prostigmata phylogeny. Proceedings of the 10th International Congress of Acarology. CSIRO Publishing, Melbourne, 2001.
- Roehrdanz RL, Degrugillier ME (1998) Long sections of mitochondrial DNA amplified from fourteen orders of insects using conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 91(6): 771-778.
- Rowell HJ, Chant DA, Hansell RIC (1978) The determination of setal homologies and setal patterns on the dorsal shield in the family Phytoseiidae. Can. Entomol. 110: 859-876.
- StatSoft France (2008) STATISTICA (logiciel d'analyse de données), version 7.1. www.statsoft.fr. (accessed in March 2009).
- 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. Ann. Entomol. Soc. Am. 87(6): 651-701.
- Takahashi F, Chant DA (1993a) Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). I Geographic distribution. Int. J. Acarol. 19(1): 15-22.
- Takahashi F, Chant DA (1993b) Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). II. Taxonomic Review. Int. J. Acarol. 19 (1), pp.23-36.
- Takahashi F, Chant DA (1993c) Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). III. Cladistic Analysis. Int. J. Acarol. 19 (3), pp.233-241.
- Takahashi F, Chant DA (1993d) Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). IV. Reproductive isolation. Int. J. Acarol. 19 (4), pp.305-311.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4.02.: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- Tixier M-S, Kreiter S, Cheval B, Auger P (2003) Morphometric variation between populations of *Kampimodromus aberrans* (Oudemans)(Acari: Phytoseiidae): implications for the taxonomy of the genus. Inv. Syst. 17: 349-358.

- Tixier M-S, Kreiter S, Ferragut F, Cheval B (2006a) The suspected synonymy of *Kampimodromus hmiminai* McMurtry and *K. adrianae* (Acari: Phytoseiidae): morphological and molecular investigations. *Can. J. Zool.* 84 (8): 1216-1222.
- Tixier M-S, Kreiter S, Barbar Z, Ragusa S, Cheval B (2006b) The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy. *Zool. Scripta* 35: 115-122.
- Tixier M-S, Kreiter S, Croft BA, Cheval B (2008a) *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) from USA: morphological and molecular assessment of its identity. *Bull. Entomol. Res.* 98: 125-134.
- Tixier M-S, Guichou S, Kreiter S (2008b) Morphological variation in the biological control agent *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae): consequences for diagnostic reliability and synonymies. *Inv. Syst.* 22: 453-469.
- Tixier M-S, Ferrero M, Okassa M, Guichou S, Kreiter S (2010) On the specific identity of specimens of *Phytoseiulus longipes* Evans (Mesostigmata: Phytoseiidae) showing different feeding behaviours: morphological and molecular analyses. *Bull. Entomol. Res.* doi:10.1017/S0007485309990617
- Tselila BD, Melamed S, Gerson S, Morin S (2007) ITS2 sequences as barcodes for identifying and analysing spider mites (Acari: Tetranychidae) *Exp. Appl. Acarol.* 41: 169-181.
- Warrit N, Smith DR, Lekprayoon C (2006) Genetic subpopulations of *Varroa* mites and their *Apis cerana* hosts in Thailand. *Apidologie* 37: 19-30.

CHAPITRE IV. PARTIE C. LA TAXONOMIE INTEGRATIVE POUR ETUDIER L'ETENDUE DE LA VARIATION INTRASPECIFIQUE ET SES LIMITES AVEC LA VARIATION INTERSPECIFIQUE POUR FIABILISER LE DIAGNOSTIC SPECIFIQUE

Une espèce est définie par un ensemble d'attributs descriptifs ou caractères, qui peuvent être morphologiques ou moléculaires. Les variations de ces attributs au sein d'une même espèce constituent la variation intraspécifique. La connaissance de cette variation associée à celle de la variation interspécifique permet de caractériser chaque entité ainsi que les caractères qui la définissent.

Au sein de la famille des Phytoseiidae, le diagnostic spécifique est essentiellement basé sur la chaetotaxie du dorsum et notamment sur la longueur des soies qu'il porte. Il a cependant été montré que ces longueurs pouvaient parfois varier considérablement au sein d'une même espèce (Athias-Henriot, 1962 ; Tixier *et al.*, 2003b, 2006b, 2008a,b). Ainsi, des chevauchements entre variations intra- et interspécifiques ont été mis en évidence. Ce constat soulève donc certaines questions sur la validité de ces caractères pour différencier les entités spécifiques.

La variation intraspécifique a été très peu étudiée chez les Phytoseiidae, les études portant sur un nombre important d'individus appartenant à une même espèce étant rares. Les descriptions de nouvelles espèces ne prennent en considération qu'une seule population et bien souvent un faible nombre d'individus (< 20), le risque de synonymie, du fait d'une mauvaise caractérisation de la variation intraspécifique, est donc très important. Ceci d'autant plus que la validité de ces caractères morphologiques est peu testée expérimentalement et que leur valeur de diagnostic repose sur des opinions et dires d'experts.

L'application d'une approche comme le barcode moléculaire pourrait faciliter le diagnostic spécifique à l'intérieur de la famille des Phytoseiidae. Les approches moléculaires permettent en effet d'augmenter le nombre de caractères considérés (minimum 400 caractères pour les plus petits fragments d'ADN contre 50 caractères pour les approches morphologiques). La comparaison de ces résultats permettrait ainsi de tester la valeur diagnostic de certains caractères morphologiques communément utilisés pour la délimitation des espèces.

Parallèlement, l'application du « concept biologique de l'espèce » (Mayr, 1942) par la réalisation de croisements entre différentes entités peut aussi être appliqué, dans le même objectif qui est celui de déterminer la validité diagnostic des caractères (Croft, 1970 ; McMurtry *et al.*, 1976 ; Hoying et Croft, 1977 ; McMurtry et Badii, 1989 ; Messing et Croft, 1991 ; Tixier *et al.*, 2006a). Cependant, bien que ce concept ait donné des résultats probants dans de nombreuses études, les contraintes expérimentales liées à la biologie des Phytoseiidae rendent l'application de cet outil relativement laborieux comme énoncé dans la partie A du chapitre II.

IV.C.1. Le cas de l'espèce *Neoseiulus californicus*

La variation intraspécifique de *N. californicus* avait déjà été étudiée préalablement par Tixier *et al.* (2008b) sur quarante-trois caractères mesurés sur 300 spécimens appartenant à dix populations collectées à travers le monde. L'étude présentée ici complète les travaux précédents en prenant en compte, d'une part, davantage de populations et, d'autre part, en combinant des approches moléculaires et morphologiques. La variation moléculaire a été caractérisée par l'étude de trois régions du génome sur l'ensemble des spécimens et des populations de *N. californicus*, considérés dans cette étude à l'aide de deux marqueurs moléculaires mitochondriaux (12S et Cytb) et un marqueur nucléaire (ITS). Les questions auxquelles nous tenterons de répondre dans cette étude sont : (1) Quelle est l'étendue de la variation intraspécifique? (2) Est-elle nettement inférieure à la variation interspécifique? (3) Existe-t-il une congruence entre les caractères moléculaires et les caractères morphologiques communément utilisés pour le diagnostic spécifique au sein de cette famille?

La réponse à ces questions, présente des conséquences finalisées importantes, notamment pour les professionnels qui utilisent cette espèce pour contrôler des espèces nuisibles dans diverses cultures.

IV.C.1.1. Position taxonomique de *Neoseiulus californicus* (McGregor)

Cette espèce a été décrite sous le nom de *Typhlodromus californicus* en 1954 par McGregor, à partir d'un spécimen mâle qui avait été collecté sur des feuilles de citronnier en Californie (Moraes *et al.*, 1986, 2004). *Neoseiulus californicus* appartient à la sous-famille des Amblyseiinae, à la tribu des Neoseiulini et au genre *Neoseiulus*

Hughes, qui comprend 335 espèces décrites (Chant et McMurtry, 2003a ; Moraes *et al.*, 2004 ; Chant et McMurtry, 2007). La distinction des espèces de ce genre est difficile du fait de : (1) l'absence de clé d'identification au sein du genre et (2) la grande variation intraspécifique des caractères communément utilisés pour le diagnostic, notamment les longueurs des soies (Tixier *et al.*, 2008b). Les difficultés liées à l'observation de caractères morphologiques discriminants, ainsi que les difficultés inhérentes au diagnostic morphologique (voir chapitre II.B.§1-1-2), ont conduit les taxonomistes à mettre plusieurs fois en synonymie cette espèce.

IV.C.1.2. *Neoseiulus californicus* et les synonymies.

Deux espèces nommées *Neoseiulus mungeri* McGregor et *Neoseiulus chilensis* Dosse ont longtemps été mises en synonymie avec *N. californicus* (Moraes *et al.*, 2004).

Neoseiulus californicus et *Neoseiulus mungeri* ont été d'abord considérées comme synonymes par Chant (1959) et par Schuster et Pritchard (1963) ensuite. Ces derniers ont publié une nouvelle description de *N. californicus* basée sur des spécimens femelles collectés sur des feuilles de citronniers et des feuilles des noix de pécan en Californie. Cependant, Ragusa et Vargas (2002) ont mis en évidence des différences au niveau de la dentition des chélicères entre différents spécimens décrits comme *N. californicus*. En effet Athias-Henriot (1977) a observé la présence de 3 dents sur le mors mobile des chélicères alors que McGregor (1954) et Schuster et Pritchard (1963) n'en avaient observé qu'une seule. Tixier *et al.* (2008b) ont proposé une re-description de *N. californicus* basée sur 300 spécimens collectés dans le monde entier et, tout comme Athias-Henriot (1977), ont observé la présence de 3 dents sur le mors mobile.

Athias-Henriot (1977) a suspecté *N. chilensis* d'être un synonyme de *N. californicus*. Des études morphométriques ont récemment montré des différences significatives entre des spécimens originaires du Chili (comme *N. chilensis*) et d'autres individus de *N. californicus* collectés à travers le monde (Tixier *et al.*, 2008b). De telles différences auraient pu laisser penser que *N. chilensis* et *N. californicus* étaient deux espèces valides. Toutefois, des croisements entre *N. californicus* et *N. chilensis* (McMurtry et Badii, 1989a ; Kreiter et Barthes, non publié) et des analyses moléculaires (Guichou *et al.*, 2006) ont confirmé que *N.*

chilenensis était bien synonyme de *N. californicus*, malgré les différences morphologiques observées.

Ces deux exemples montrent bien les difficultés rencontrées pour le diagnostic spécifique de cette espèce sur la base des caractères morphologiques.

IV.C.1.3. Quelques caractéristiques biologiques de *Neoseiulus californicus*

Les caractéristiques biologiques de *N. californicus* ont été abondamment étudiées (Raworth *et al.*, 1994 ; Walzer et Schausberger, 1999a, b ; Castagnoli et Simoni, 2003 ; Gotoh *et al.*, 2004 ; Escudero et Ferragut, 2005 ; Gotoh *et al.*, 2006) du fait de l'intérêt agronomique de cette espèce.

IV.C.1.3.1. Caractéristiques prédatrices

Neoseiulus californicus appartient à la catégorie fonctionnelle n°II des prédateurs Phytoseiidae selon la classification proposée par McMurtry et Croft (1997). Cela indique que cette espèce se nourrit préférentiellement d'espèces de la famille des Tetranychidae [par exemple: *Tetranychus* sp., *Panonychus ulmi* (Koch)] et parfois de pollen. *Neoseiulus californicus* peut également se nourrir de petits insectes.

Cependant, sur les dix-sept caractères étudiés par Croft *et al.* (1998), onze indiquent que *N. californicus* s'apparenterait plus à un prédateur généraliste. Ainsi, certains auteurs qui ne prennent en compte que la variation du régime alimentaire considèrent *N. californicus* comme une espèce généraliste (Schausberger et Croft, 2000). En effet *N. californicus* peut survivre quelques jours en l'absence de proies en se nourrissant exclusivement de pollen (Malais et Ravensberg, 2003).

IV.C.1.3.2. Durée de développement, taux de fécondité et sex ratio

La **durée de développement** de *N. californicus* de l'œuf au stade adulte à 25°C varie entre 5 et 8 jours quand elle se nourrit d'espèces du genre *Tetranychus* (*Tetranychus urticae* Koch, *Tetranychus turkestani* Ugarov et Nikolski, *Tetranychus ludeni* Zaher et *Tetranychus evansi* Baker et Pritchard (Escudero et Ferragut, 2005). Le taux de fécondité moyen d'une femelle est de 65 œufs/femelle quand elle se nourrit de *T. urticae* (Ehara et Amano, 1993).

Enfin, la sex ratio est biaisée en faveur des femelles (51,2 %) comme pour la plupart des espèces de Phytoseiidae (Helle et Sabelis, 1985a).

IV.C.1.4. Importance de cette espèce en lutte biologique

Neoseiulus californicus est produite en masse et commercialisée pour contrôler les acariens nuisibles aux cultures, notamment dans les serres. Ce prédateur est par exemple utilisé pour lutter contre *T. urticae*, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (le tarsonème du Bégonia) ou *Steneoaronemus pallidus* (Banks) (le tarsonème du fraisier/cyclamen). Il se rencontre également naturellement dans la végétation spontanée aux alentours des parcelles. En 1998, *N. californicus* était le prédateur le plus présent « naturellement » dans le Sud-est de la France et en Midi-Pyrénées pour réguler les pullulations de *P. ulmi* (acarien rouge de la vigne et des arbres fruitiers) dans les vergers de pommiers.

IV.C.1.5. Répartition géographique

Actuellement, *N. californicus* a une répartition mondiale. Il est difficile de déterminer l'origine de cette espèce, étant donné qu'elle a été introduite dans de nombreux pays pour lutter biologiquement contre les espèces nuisibles aux cultures. *Neoseiulus californicus* a été répertoriée dans 17 pays d'Europe, d'Amérique (Sud et Nord), d'Afrique du Nord et d'Asie (Moraes *et al.*, 2004).

IV.C.1.7. Populations et espèces étudiées

Quinze populations de *N. californicus* ont été collectées à travers le monde et analysés dans cette étude. Des mesures morphométriques de trente trois caractères continus ont été effectués sur 333 spécimens. Les analyses moléculaires ont été effectuées avec 3 marqueurs. Nous avons analysé : cent vingt-quatre spécimens pour le marqueur 12S ARNr (420 pb), soixante-sept pour le marqueur Cytb (416 pb) et enfin cinquante-huit pour le marqueur ITS (710 pb). Pour estimer la variation interspécifique et déterminer si les marqueurs utilisés permettaient de séparer *N. californicus* d'une autre espèce du même genre, une espèce témoin a été ajoutée à cette étude : *Neoseiulus picanus* Ragusa. Des caractères, comme entre autres la forme de la spermathèque, la longueur du péritrème ainsi que le nombre et la forme des solénostomes sur le bouclier dorsal, permettent de différencier facilement ces deux espèces.

IV.C. 1.8. Article 5. Okassa M., Tixier M.-S., Guichou S., Kreiter S. Molecular and morphological variations within the species *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae): consequences for diagnostic and biological control. En cours de soumission.

Abstract

Neoseiulus californicus (McGregor) is an important biological control agent used worldwide to control pest mites in many crops. Its accurate identification is thus essential to ensure biological control success. The aim of this study was to characterize molecular and morphological intraspecific variations in order to ensure the diagnostic. Morphological and molecular (12S rRNA, Cytb mtDNA, and ITS) analyses were carried out on fifteen populations collected all over the world. The genetic distances between the specimens of *N. californicus* and another related species were high and no overlap was observed, sustaining the reliability of such molecular approaches to assist specific diagnostic. Furthermore, the genetic distances between populations of *N. californicus* were very low and overlap between intra- and inter- populations distances were observed, except for two populations collected in France (Marsillargues and Midi-Pyrénées). The mitochondrial differentiation between these two latter populations and the others questioned their specific status (cryptic species). However, these mtDNA variations were not sustained by nuclear variation nor by morphological analyses. Indeed, even if significant morphological differences were observed between the populations considered, these differences were very small and the standard errors within each population very low. We thus concluded that all the populations studied belong to the species *N. californicus*, despite unexpected high mitochondrial variations. This study thus displays the importance of an integrative taxonomic approach for avoiding misidentifications. A discussion on the mtDNA variations in relation to diagnostic reliability is developed.

Keywords: *Neoseiulus californicus*, biological control, barcoding multilocus, morphology.

Introduction

Several species of the family Phytoseiidae are predators of mite pests and thus present a great interest in biological control (Kostiainen & Hoy 1996; McMurtry & Croft 1997). Phytoseiidae species are presently considered as morphospecies (Cain 1954) as their identification and description are essentially based on morphological characters. The main characters used for species diagnostic are dorsal shield and leg chaetotaxy, spermatheca shape and cheliceral dentition (i.e. Chant & McMurtry 1994, 2007). However, this identification system presents some limits when intermediate morphological patterns between two species are observed, especially for seta lengths (Tixier *et al.* 2003, 2006a,b, 2008a,b). Furthermore, because little thing is known on the reliability of characters used for species discrimination, the diagnostic decision is particularly difficult, particularly when differences are tiny and/or concern only one character (Tixier *et al.* 2006a). To assist diagnostic, molecular markers have been recently used for Phytoseiidae (Tixier *et al.* 2006a,b, 2008a, 2010; Okassa *et al.* 2009, 2010). However, within both morphological and molecular approaches, the accurate characterisation of intraspecific variations constitutes a key point to delineate specific entities from populations of a same species (Wiens & Servedio 2000, Dayrat 2005, Meier 2008, Cardoso *et al.* 2009). The present study focuses on the molecular and morphological intraspecific variations of the species *Neoseiulus californicus* (McGregor), an efficient natural enemy used worldwide to control mite pests in many crops, especially in greenhouses and orchards (i.e. Castagnoli *et al.* 1999; Escudero & Ferragut 2005; Gotoh *et al.* 2006; Palevsky *et al.* 2008). Tixier *et al.* (2008b) recently redescribed this species and showed a quite high morphological variation taking into account ten populations worldwide. In the present study, we used these previous results for morphological aspects, adding five other populations and assessing molecular intraspecific variations using three molecular markers (12S rRNA, Cytb mtDNA and ITS).

Material and methods

Populations and species studied

Neoseiulus californicus, described on lemon tree at Riverside (California, USA), is now worldwide essentially because of human introductions for biological control purposes. Fifteen worldwide populations of *N. californicus* were considered: 14 were field collected in 11 countries (Brazil, France, Chile, Greece, Italy, Japan, South Korea, South Africa, Spain, Tunisia, USA) on six plant supports and the 15th one was a mass-reared strain commercialized by Koppert TM The Netherlands, initially originated from California (Table 1).

The morphological data used for ten populations were those obtained by Tixier *et al.* (2008b). The five additional populations presently considered were collected from France (Midi-Pyrénées, Marsillargues), USA, South Africa and South Korea (Table 1). These specimens were collected directly on leaves with fine and clear hairbrush and immediately put in plastic vials filed with alcohol (100%).

In addition, for molecular experiments, one population of a species morphologically close to *N. californicus* : *Neoseiulus picanus* Ragusa was considered as a control, to assess interspecific genetic distances. This population was collected in Argentina on *Sida* sp. (Malvaceae).

Table 1. Characteristics of the fourteen populations of *N. californicus* and *N. picanus* as the out-group species, numbers of specimens considered for morphological and molecular analyses with the 12S rRNA, Cytb mtDNA and ITS markers.

| Species | Country | Locality | Plant support | Number of females measured | Genbank accession number of 12S rRNA sequences | Genbank accession number of Cytb mtDNA sequences | Genbank accession number of ITS sequences |
|------------------------|---------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|--|--|---|
| <i>N. californicus</i> | France | Mauguio | <i>Solanum melongena</i> | 30 | JF278903 | JF278908 | JF279184 |
| | | | | | JF278904 | JF278909 | JF279185 |
| | | | | | JF278905 | JF278910 | JF279186 |
| | | | | | JF278906 | JF278911 | |
| | | | | | JF278907 | | |
| <i>N. californicus</i> | France | Marsillargues | <i>Malus</i> sp. | 9 | JF278912 | JF279187 | JF279064 |
| | | | | | JF278913 | JF279188 | JF279065 |
| | | | | | JF278914 | | JF279066 |
| | | | | | JF278915 | | JF279067 |
| | | | | | JF278916 | | JF279068 |
| <i>N. californicus</i> | France | Midi-pyrénées | <i>Vitis</i> sp. | 4 | JF278917 | JF279189 | JF279069 |
| | | | | | JF278918 | JF279190 | JF279070 |
| | | | | | JF278919 | JF279191 | JF279071 |
| | | | | | JF278920 | JF279192 | JF279072 |
| | | | | | JF278921 | | JF279073 |
| <i>N. californicus</i> | USA | California Koppert | rearing units | 30 | JF278922 | JF278927 | JF279193 |
| | | | | | JF278923 | JF278928 | JF279194 |
| | | | | | JF278924 | JF278929 | JF279195 |
| | | | | | JF278925 | JF278930 | JF279196 |
| | | | | | JF278926 | JF278931 | JF279078 |
| <i>N. californicus</i> | USA | New york | <i>Malus</i> sp. | 5 | JF278932 | JF278935 | JF279197 |
| | | | | | JF278933 | JF278936 | JF279198 |
| | | | | | JF278934 | | JF279199 |
| | | | | | | | JF279200 |
| | | | | | | | JF279082 |
| <i>N. californicus</i> | Chile | La cruz | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 30 | JF278937 | JF278940 | JF279201 |
| | | | | | JF278938 | JF278941 | JF279202 |
| | | | | | JF278939 | JF278942 | JF279203 |
| | | | | | | JF278943 | JF279084 |
| | | | | | | | JF279085 |
| <i>N. californicus</i> | Brazil | Piracicaba | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 30 | JF278944 | JF278948 | JF279204 |
| | | | | | JF278945 | JF278949 | JF279205 |
| | | | | | JF278946 | JF278950 | JF279206 |
| | | | | | JF278947 | JF278951 | JF279207 |
| | | | | | | | JF279208 |
| <i>N. californicus</i> | Tunisia | Tozeur | <i>Convolvus arvensis</i> | 30 | JF278952 | JF278955 | JF279209 |
| | | | | | JF278953 | JF278956 | JF279210 |
| | | | | | JF278954 | JF278957 | JF279091 |
| | | | | | | | JF279092 |
| | | | | | | | |
| <i>N. californicus</i> | Spain | Valencia | <i>Fragaria vesca</i> | 30 | JF278958 | JF278963 | JF279211 |
| | | | | | JF278959 | JF278964 | JF279212 |
| | | | | | JF278960 | JF278965 | JF279213 |
| | | | | | JF278961 | JF278966 | JF279214 |
| | | | | | JF278962 | JF278967 | JF279215 |
| <i>N. californicus</i> | Italy Sicily | Palermo | <i>Fragaria vesca</i> | 30 | JF278968 | JF278972 | JF279216 |
| | | | | | JF278969 | JF278973 | JF279217 |
| | | | | | JF278970 | JF278974 | JF279218 |
| | | | | | JF278971 | JF278975 | JF279219 |
| | | | | | | JF278976 | JF279220 |
| <i>N. californicus</i> | Italy Tuscany | Firenze | <i>Fragaria vesca</i> | 30 | JF278977 | JF278982 | JF279221 |
| | | | | | JF278978 | JF278983 | JF279222 |
| | | | | | JF278979 | JF278984 | JF279223 |
| | | | | | JF278980 | JF278985 | JF279224 |
| | | | | | JF278981 | JF278986 | JF279105 |
| <i>N. californicus</i> | Greece | Thessaloniki | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 30 | JF278987 | JF278992 | JF279225 |
| | | | | | JF278988 | JF278993 | JF279226 |
| | | | | | JF278989 | JF278994 | JF279227 |
| | | | | | JF278990 | JF278995 | JF279228 |
| | | | | | JF278991 | JF278996 | JF279229 |
| <i>N. californicus</i> | Japan | Ibaraki | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 30 | JF278997 | JF279001 | JF279230 |
| | | | | | JF278998 | JF279002 | JF279231 |
| | | | | | JF278999 | JF279003 | JF279232 |
| | | | | | JF279000 | JF279004 | JF279233 |
| | | | | | | JF279005 | JF279234 |
| <i>N. californicus</i> | South Africa | unknown plant support | | 6 | JF279006 | JF279011 | JF279235 |
| | | | | | JF279007 | JF279012 | JF279236 |
| | | | | | JF279008 | JF279013 | JF279237 |
| | | | | | JF279009 | JF279014 | JF279238 |
| | | | | | JF279010 | JF279015 | JF279239 |
| <i>N. californicus</i> | South Korea | Jeju | <i>Citrus reticulat</i> | 30 | | | JF279240 |
| | | | | | JF279016 | JF279021 | JF279241 |
| | | | | | JF279017 | JF279022 | JF279242 |
| | | | | | JF279018 | JF279023 | JF279243 |
| | | | | | JF279019 | JF279024 | JF279244 |
| <i>N. picanus</i> | Argentina | Mercedes | <i>Sida</i> sp. | - | JF279020 | JF279025 | JF279245 |
| | | | | | | | JF279246 |
| | | | | | | | JF279247 |
| | | | | | | | JF279248 |
| | | | | | JF279026 | JF279027 | JF279249 |
| | | JF279250 | | | | | |
| | | JF279113 | | | | | |
| | | JF279114 | | | | | |
| | | JF279115 | | | | | |
| | | JF279116 | | | | | |
| | | JF279117 | | | | | |
| | | JF279118 | | | | | |
| | | JF279119 | | | | | |
| | | JF279120 | | | | | |
| | | JF279121 | | | | | |

Molecular analyses

DNA extraction

Total DNA was individually extracted using the DNeasy Tissue DNA extraction Kit (Qiagen, Hilden) according to the DNA extraction protocol « Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells » (Spin-Column Protocol) adapted for extracting total DNA from mites (Kanouh *et al.* 2010; Tixier *et al.* 2010).

DNA amplification

A nuclear ribosomal DNA marker (ITS) and two mitochondrial DNA markers (12S rRNA and Cytochrome b mtDNA) were used. Primers for the amplification of the DNA fragments were as follows: ITS, 5'-3' AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG and 3'-5' ATATGCTTAAATTCAGGGGG (Navajas *et al.* 1999); 12S rRNA, 5'-3' TACTATGTTACGACTTAT and 3'-5' AACTAGGATTAGATACCC (Jeyaprakash & Hoy 2002); and Cytb mtDNA, 5'-3' TAWRAARTATCAYTCDGGTTKRATATG and 3'-5' CCWTGAGGACAAATAWSWTTYTGAGG (Wannes Dermauw, University of Ghent, Belgium, pers. comm.). The PCR reactions were performed in a 25 µl volume, containing 4 µl of mite DNA, 2.5 µl (1 mM) of buffer 10X, 1 µl (1.5 mM) of MgCl₂, 0.5 µl (0.05 mM for each) dNTPs, 0.175 µl (0.7 µM) for each primer, 0.125 µl (0.625 U) of Taq Qiagen and 16.525 µl of water. Thermal cycling conditions were as follows, for the ITS marker: 92 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 92°C for 15 s, 50°C for 45 s and 72°C for 1 min, and 72°C for 7 min; for the 12S rRNA marker: 95°C for 1 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 40°C for 30 s and 72°C for 1 min, and 72°C for 5 min; for the Cytb mtDNA marker: 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 92°C for 20 s, 53°C for 1 min and 72°C for 1 min, and an additional 5 min at 72°C. Electrophoresis was carried out on a 1.5 % agarose gel in 0.5 X TBE buffer during 20 min at 135 volts.

DNA sequencing

PCR products were sequenced using CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (CEQ[™] 2000XL DNA Analysis System, Beckman, Beckman Coulter, USA). All DNA fragments were sequenced along both strands. Sequences were analysed and aligned with Geneious v3.5.4 (Drummond *et al.* 2007). The numbers of sequences obtained and their accession number in the Genbank database are shown in the Table 1.

Data analyses

A preliminary analysis was conducted on the coding Cytb mtDNA sequences to check for the absence of stop codons using Mesquite (Maddison & Maddison 2010).

Incongruence Length Difference (ILD) (Farris *et al.* 1994) was calculated to examine possible conflicting signals among the three components of the data set. Despite an absence of incompatibility between the DNA data sets (ILD= 0.1), the trees obtained will not be presented: this would lead to a too great information loss as the number of DNA sequences obtained for each DNA marker was unequal (Table 1).

Parsimony analysis Separate analyses were conducted for each data set (three loci) using parsimony in PAUP*, v.4.0b.10 (Swofford 2002). A heuristic search procedure repeated 100 times was applied, with randomized taxa additions and branch-swapping algorithm (TBR). Node support was determined using 1,000 bootstrap replicates.

Bayesian analysis. The best-fit substitution model was determined by Modeltest 3.06 (Posada & Crandall 1998) for each defined partition (one partition per gene) through hierarchical likelihood-ratio tests (LRTs). The model of evolution GTR was selected by the LRTs with a proportion of invariable sites and a gamma distribution. The GTR model was implemented in MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). The number of categories used to approximate the gamma distribution was set at 4, and four Markov chains were run for 100,000 generations. Stabilization of model parameters (burn-in) occurred around 250 generations. The results were presented in the form of a 50 % majority-rule consensus tree.

Morphological analyses

Three hundred and three females were mounted on slides and measured with a 40x magnification phase contrast microscope (Table 1).

Characters considered. As dorsal seta lengths are usually used for phytoseiid species differentiation, the lengths of the 19 dorsal idiosomal and interscutal setae were assessed: j1, j3, j4, j5, j6, J2, J5, s4, S2, S4, S5, z2, z4, z5, Z1, Z4, Z5, r3 and R1. We also measured the width and length of the dorsal and ventrianal

shields, the distance between the setae of the sternal and genital shields, the lengths of the macrosetae on the basitarsus of the leg IV and of the caudo-ventral seta (JV5). Thirty three characters were considered in total. Terminology for setal notation follows that of Lindquist and Evans (1965) as adapted by Rowell *et al.* (1978) for the Phytoseiidae.

Data analyses. A multiple variance analysis (and Newman and Keuls means comparison test) (Statsoft France 2008) was performed to determine differences between the populations for the 33 morphological characters measured. Furthermore, as unexpected high levels of mtDNA divergence were observed between two groups of populations, student tests were carried out to determine differences in measurements between specimens belonging to these two latter groups (StatSoft France 2008). A principal component analysis was also processed to determine whether the combination of the morphological characters can differentiate these specimens (StatSoft France 2008).

Results and discussion

Molecular analyses

Among the 420, 416 and 710 base pairs (bp) amplified, 399, 408 and 653 bp were aligned for the 12S rRNA, Cytb mtDNA, and ITS genes, respectively. DNA analyses showed quite similar and constant rates of nucleotide substitutions for all the populations and species studied. A BLAST search in the Genbank database showed that the sequences aligned with other sequences of Phytoseiidae. The preliminary analysis conducted on the sequences coding for the Cytb mtDNA showed the absence of Nuclear mitochondrial pseudogenes (Numts).

For all the analyses, specimens of *N. californicus* are included in a same clade well separated from the control species *N. picanus* (Figures 1, 2). The genetic distances separating these two specific entities are much higher (12S: 12.5 ± 1.9 %, Cytb: 24 ± 0.5 % and ITS: 3.7 ± 0.05 %) than the intraspecific ones (Table 2). Within the clade including all the specimens identified as *N. californicus*, two main sub-clades are however observed for the two mtDNA markers (Figures 1a,b; 2a,b). One of these two main sub-clades contains the specimens collected in France-Marsillargues and France Midi-Pyrénées (group 1), whereas the second one contains all the other specimens considered (group 2). Furthermore, the

distances observed between the two sub-clades were quite high (12S rRNA: 4.7 ± 0.18 %, Cytb mtDNA: 9.8 ± 1.6 %) and no overlapping was observed between the intra-group genetic distances. It should be noted that within each clade the genetic distances were close to 0 %, despite the high number of populations (and specimens) included, particularly in the group 2. As in previous studies, carried out on species of the same sub-family (Amblyseinae) with the same mtDNA markers, the mean intraspecific genetic distances rarely overpassed 2% (Okassa *et al.* 2009, 2010; Tixier *et al.* 2010), one can wonder if these two sub-clades could correspond to two cryptic species. However, with the nuclear marker (ITS), all the specimens are mixed and the two main sub-clades are no more observed (Figures 1c, 2c). With this latter marker, the mean genetic distance within the species *N. californicus* was very low (0 ± 0.06 %) and similar to ones previously observed with the same DNA marker within a Phytoseiidae species (Tixier *et al.* 2006a; Kanouh *et al.* 2010). Results obtained with the ITS marker suggest thus that the specimens included in the two clades emphasized with mtDNA markers would belong to a same and unique species.

To determine if morphological differences exist between specimens belonging to the two groups emphasized by mtDNA analyses, morphological analyses were carried out.

Table 2. Mean (Standard Error: SE), minimal and maximal values of the genetic distances (%) among all the specimens of *N. californicus* (intraspecific), among the specimens of each group emphasized by mtDNA markers (intra-group), between the specimens belonging to these two latter groups (inter-group) and between *N. californicus* and the related species *N. picanus* (interspecific) for the 12S rDNA, Cytb mtDNA and ITS fragments.

| | | 12S | Cytb | ITS |
|---|---------|------------|-----------|------------|
| Intraspecific genetic distances | Mean | 0.8 (1.6) | 1.7 (3.6) | 0 (0.06) |
| | Min-Max | 0-5.2 | 0-10.5 | 0-0.4 |
| Intragroup genetic distances | Mean | 0.1 (0.21) | 0.1 (0.1) | – |
| | Min-Max | 0-1 | 0-0.9 | |
| Intergroup (1) and (2) genetic distances | Mean | 4.7 (0.18) | 9.8 (1.6) | – |
| | Min-Max | 4.1-5.2 | 9.8-10.5 | |
| Interspecific genetic distances | Mean | 12.5 (1.9) | 24 (0.5) | 3.7 (0.05) |
| | Min-Max | 11.9-13.1 | 23.8-25.8 | 3.5-3.9 |

Morphological analyses

Significant differences are observed in 18 measurements between the specimens included in the two clades emphasized by mtDNA analyses (Table 3). However, these differences were very small and the standard errors within the populations were very low. Furthermore, min. and max. values of each character are overlapping between the two groups and all populations considered. On the two axes of the multifactorial analysis (Figure 3) showing 44.4% of the total variation, no separated groups were observed. Only 13 specimens from France Midi-Pyrénées are distant from the others. No morphological difference was thus observed between all the specimens studied, suggesting like results obtained with the ITS marker that all of them belong a same species.

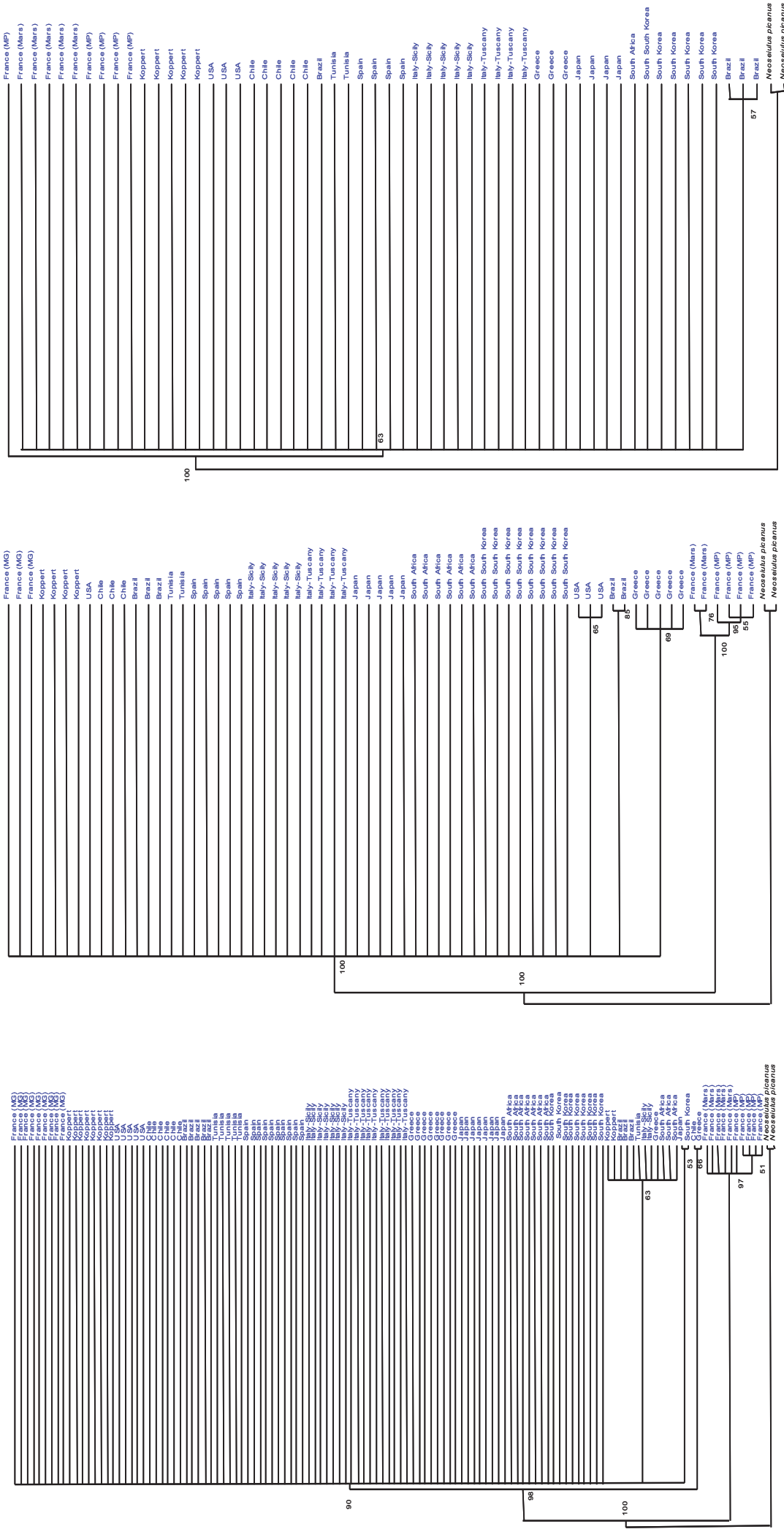


Figure 1. Majority-rule consensus trees ^b obtained after Parsimony analysis carried out on the fourteen populations of *N. californicus* and *N. picanus* as an out-group species, with the 12S rRNA (a), Cytb mtDNA (b) and ITS (c) markers (France (Mars): France Marsillargues, France (MP): France Midi-Pyrénées, France (MG): France Mauguio).

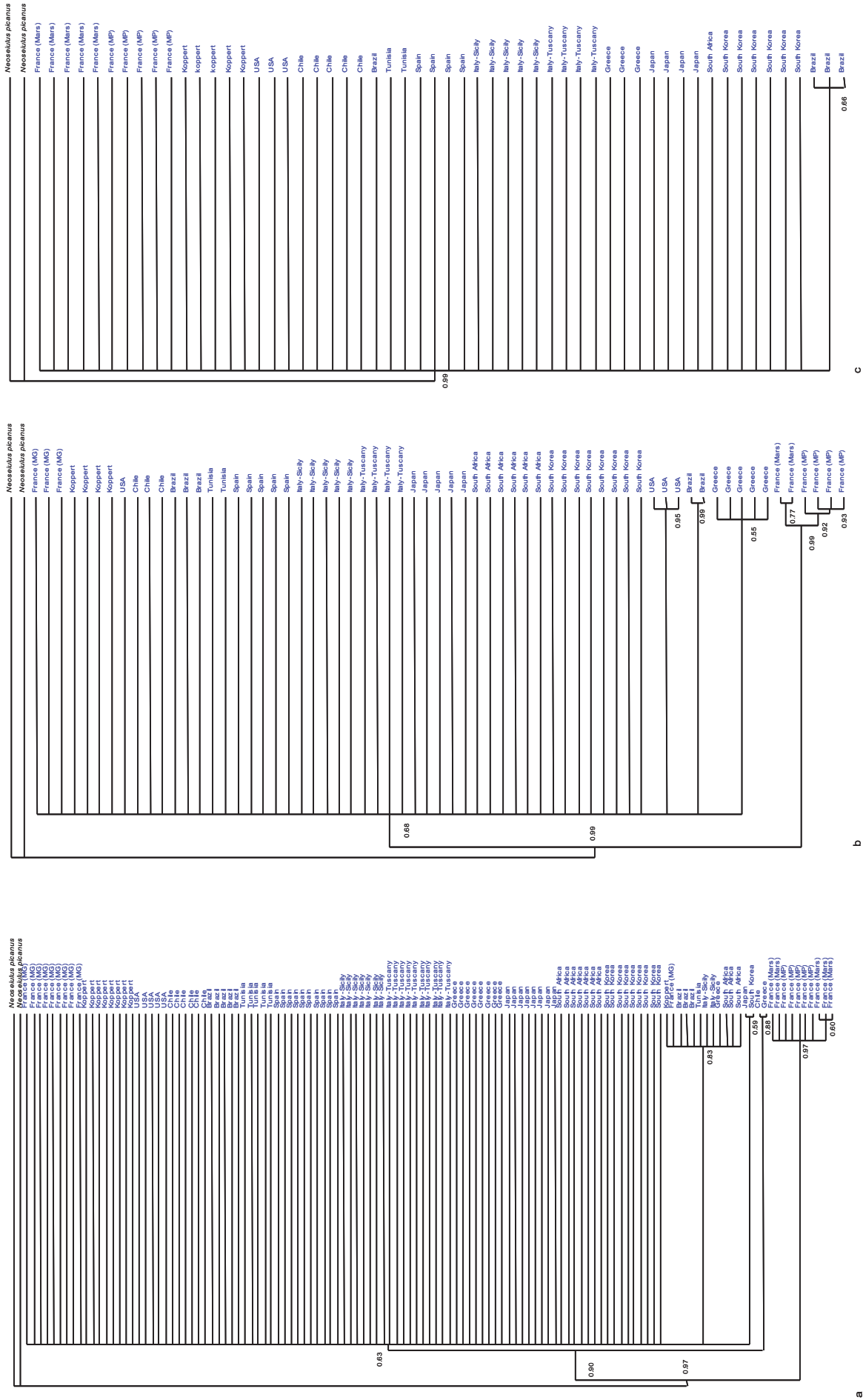


Figure 2. Majority-rule consensus trees obtained after Bayesian analysis carried out on the fourteen populations of *N. californicus* and *N. picanus* as an outgroup species, with the 12S rRNA (a), Cytb mtDNA (b) and ITS (c) markers (France (Mars): France Marsillargues, France (MP): France Midi-Pyrénées, France (MG): France Mauguio).

Table 3. Mean, Standard Error (SE), Minimal and Maximal values of the 33 morphological characters considered for each population of *N. californicus* and for each group (1 and 2) emphasized by the mtDNA analysis and ANOVA results. France (Mars): France-Marsillargues, France (MP): France Midi-Pyrénées, France (MG): France Mauguio (DSL: Dorsal Shield Length, DSW: Dorsal Shield Width, VAS: Ventrianal shield).

| | | France (Mars) | France (MP) | France (MG) | South Africa | USA | South Korea | Spain | Chile | Italy-Sicily | Koppert | Italy-Tuscany | Greece | Japan | Brazil | Tunisia | P | Group 1 | Group 2 | P |
|---------|-----------|---------------|-------------|-------------|--------------|---------|-------------|----------|---------|--------------|---------|---------------|----------|----------|----------|---------|--------|----------|----------|---------|
| DSL | Mean (SE) | 375 (10) | 369 (13) | 368 (10) | 379 (9) | 363 (9) | 349 (6) | 365 (11) | 372 (9) | 369 (12) | 366 (9) | 362 (14) | 370 (17) | 363 (12) | 372 (10) | 362 (9) | 0.0000 | 373 (11) | 367 (12) | 0.04 |
| | Min-Max | 359-391 | 351-380 | 345-383 | 367-389 | 353-375 | 341-348 | 341-384 | 341-393 | 335-390 | 335-382 | 330-406 | 339-405 | 340-386 | 352-401 | 344-377 | | | 351-391 | 330-406 |
| DSW | Mean (SE) | 154 (6) | 146 (1) | 155 (6) | 153 (4) | 144 (4) | 141 (2) | 165 (9) | 161 (5) | 155 (7) | 150 (7) | 150 (7) | 162 (13) | 150 (9) | 150 (11) | 147 (9) | 0.0000 | 151 (6) | 154 (10) | 0.95 |
| | Min-Max | 146-162 | 144-147 | 141-167 | 149-159 | 138-149 | 139-145 | 148-181 | 148-168 | 141-175 | 135-164 | 137-165 | 141-189 | 132-168 | 131-176 | 130-167 | | | 144-162 | 130-189 |
| j1 | Mean (SE) | 22 (3) | 22 (3) | 22 (1) | 23 (1) | 22 (2) | 20 (2) | 21 (1) | 24 (1) | 22 (1) | 22 (2) | 20 (1) | 22 (1) | 23 (2) | 23 (1) | 21 (1) | 0.0000 | 22 (3) | 22 (2) | 0.16 |
| | Min-Max | 19-29 | 19-25 | 20-25 | 21-25 | 21-25 | 17-22 | 18-23 | 18-26 | 20-24 | 19-26 | 18-24 | 19-24 | 18-26 | 20-25 | 18-24 | | | 19-29 | 17-26 |
| j3 | Mean (SE) | 27 (2) | 29 (6) | 33 (2) | 33 (2) | 32 (2) | 26 (2) | 31 (2) | 35 (2) | 33 (2) | 31 (3) | 28 (2) | 30 (2) | 30 (1) | 32 (2) | 30 (1) | 0.0000 | 28 (3) | 31 (3) | 0.00 |
| | Min-Max | 22-29 | 22-34 | 30-36 | 30-36 | 30-35 | 23-28 | 27-34 | 27-39 | 29-35 | 22-37 | 25-34 | 26-33 | 28-33 | 27-35 | 27-33 | | | 22-34 | 22-39 |
| j4 | Mean (SE) | 20 (2) | 23 (3) | 23 (2) | 22 (2) | 21 (3) | 18 (2) | 22 (2) | 24 (2) | 23 (2) | 21 (2) | 19 (1) | 22 (2) | 22 (1) | 23 (2) | 22 (2) | 0.0000 | 20 (2) | 22 (2) | 0.00 |
| | Min-Max | 17-21 | 18-24 | 20-25 | 20-25 | 18-25 | 16-22 | 19-26 | 19-27 | 20-27 | 16-24 | 16-21 | 18-26 | 20-24 | 20-27 | 18-27 | | | 17-24 | 16-27 |
| j5 | Mean (SE) | 19 (2) | 22 (1) | 23 (2) | 23 (2) | 21 (3) | 18 (1) | 22 (2) | 24 (2) | 23 (2) | 22 (2) | 19 (1) | 22 (2) | 22 (1) | 23 (2) | 21 (1) | 0.0000 | 20 (2) | 22 (2) | 0.00 |
| | Min-Max | 16-22 | 21-22 | 18-27 | 21-25 | 18-24 | 17-20 | 19-26 | 19-28 | 18-26 | 18-26 | 16-22 | 18-26 | 21-24 | 19-25 | 19-24 | | | 16-22 | 16-28 |
| j6 | Mean (SE) | 24 (3) | 27 (2) | 28 (2) | 26 (2) | 24 (2) | 21 (1) | 27 (2) | 30 (2) | 28 (2) | 26 (2) | 23 (2) | 27 (2) | 26 (2) | 28 (2) | 26 (2) | 0.0000 | 25 (3) | 27 (3) | 0.03 |
| | Min-Max | 19-28 | 25-30 | 23-32 | 23-29 | 21-26 | 19-25 | 22-30 | 22-33 | 23-31 | 21-29 | 19-28 | 22-33 | 21-29 | 24-31 | 21-29 | | | 19-30 | 19-33 |
| J2 | Mean (SE) | 30 (3) | 26 (1) | 32 (2) | 28 (2) | 29 (2) | 27 (2) | 32 (2) | 35 (2) | 34 (2) | 31 (2) | 29 (2) | 31 (2) | 30 (2) | 32 (2) | 31 (2) | 0.0000 | 29 (3) | 32 (3) | 0.00 |
| | Min-Max | 27-33 | 25-27 | 29-37 | 25-30 | 27-33 | 24-30 | 29-36 | 29-40 | 27-37 | 26-35 | 25-32 | 27-37 | 27-33 | 32-36 | 26-34 | | | 25-33 | 24-40 |
| J5 | Mean (SE) | 11 (1) | 12 (2) | 12 (1) | 12 (1) | 12 (2) | 11 (1) | 13 (1) | 12 (1) | 12 (1) | 13 (1) | 12 (1) | 12 (1) | 13 (1) | 13 (1) | 13 (1) | 0.0000 | 11 (1) | 12 (1) | 0.00 |
| | Min-Max | 9-13 | 10-14 | 11-15 | 10-14 | 9-14 | 40-51 | 10-15 | 10-14 | 10-13 | 11-15 | 10-14 | 9-15 | 11-16 | 10-15 | 11-16 | | | 9-15 | 11-16 |
| z2 | Mean (SE) | 26 (2) | 27 (2) | 30 (3) | 30 (2) | 29 (1) | 22 (2) | 27 (2) | 33 (3) | 30 (2) | 29 (2) | 26 (2) | 28 (4) | 28 (2) | 29 (2) | 27 (2) | 0.0000 | 26 (2) | 29 (3) | 0.05 |
| | Min-Max | 23-29 | 25-29 | 24-40 | 24-31 | 27-31 | 19-24 | 21-30 | 21-37 | 26-34 | 26-36 | 22-34 | 20-40 | 22-30 | 25-33 | 22-33 | | | 23-29 | 19-40 |
| z4 | Mean (SE) | 26 (3) | 29 (4) | 31 (2) | 29 (4) | 28 (3) | 24 (4) | 28 (2) | 33 (3) | 32 (3) | 30 (2) | 26 (3) | 28 (3) | 28 (2) | 30 (3) | 29 (3) | 0.0000 | 27 (3) | 29 (3) | 0.00 |
| | Min-Max | 21-30 | 25-32 | 28-35 | 24-36 | 23-31 | 23-32 | 23-32 | 26-36 | 26-34 | 20-31 | 23-33 | 24-32 | 24-37 | 24-35 | | | | 21-32 | 20-37 |
| z5 | Mean (SE) | 20 (1) | 22 (1) | 23 (2) | 23 (3) | 21 (2) | 18 (4) | 22 (1) | 24 (2) | 22 (1) | 22 (1) | 20 (1) | 22 (2) | 22 (1) | 23 (1) | 21 (1) | 0.0000 | 21 (1) | 22 (2) | 0.02 |
| | Min-Max | 18-23 | 21-23 | 19-26 | 19-27 | 19-23 | 17-21 | 20-25 | 20-27 | 20-25 | 19-24 | 17-22 | 18-26 | 18-24 | 20-25 | 19-25 | | | 18-23 | 17-27 |
| s4 | Mean (SE) | 31 (4) | 28 (6) | 36 (2) | 38 (3) | 35 (3) | 29 (2) | 36 (2) | 40 (3) | 37 (3) | 37 (2) | 31 (3) | 33 (3) | 34 (3) | 35 (3) | 34 (2) | 0.0000 | 31 (4) | 35 (4) | 0.03 |
| | Min-Max | 25-38 | 22-33 | 32-41 | 35-41 | 31-37 | 27-32 | 31-40 | 31-44 | 33-43 | 28-40 | 27-38 | 27-39 | 27-39 | 29-40 | 27-38 | | | 22-38 | 27-44 |
| Z1 | Mean (SE) | 28 (2) | 30 (2) | 33 (2) | 33 (3) | 32 (1) | 28 (2) | 33 (2) | 37 (2) | 33 (2) | 32 (2) | 29 (3) | 32 (3) | 31 (3) | 32 (3) | 30 (2) | 0.0000 | 29 (2) | 32 (3) | 0.00 |
| | Min-Max | 27-32 | 28-32 | 30-37 | 30-39 | 31-33 | 26-30 | 29-37 | 29-42 | 30-37 | 29-39 | 27-37 | 25-37 | 24-37 | 20-36 | 27-34 | | | 27-32 | 20-42 |
| Z4 | Mean (SE) | 48 (2) | 54 (6) | 54 (2) | 49 (3) | 53 (2) | 47 (3) | 51 (3) | 52 (2) | 54 (2) | 54 (2) | 47 (3) | 52 (3) | 48 (2) | 50 (2) | 50 (2) | 0.0000 | 49 (3) | 51 (3) | 0.07 |
| | Min-Max | 45-51 | 49-58 | 47-58 | 47-52 | 52-55 | 42-51 | 42-54 | 42-55 | 50-58 | 48-59 | 44-54 | 45-60 | 45-52 | 44-53 | 42-54 | | | 45-58 | 42-60 |
| Z5 | Mean (SE) | 68 (5) | 68 (7) | 71 (2) | 68 (4) | 73 (2) | 68 (2) | 74 (3) | 67 (3) | 70 (3) | 71 (3) | 67 (3) | 70 (4) | 68 (3) | 71 (4) | 69 (3) | 0.0000 | 68 (5) | 70 (4) | 0.16 |
| | Min-Max | 61-74 | 62-75 | 64-75 | 64-74 | 72-77 | 64-74 | 64-79 | 64-73 | 64-76 | 63-75 | 61-75 | 63-78 | 62-75 | 63-78 | 62-75 | | | 61-75 | 59-79 |
| S2 | Mean (SE) | 38 (2) | 40 (3) | 41 (2) | 40 (2) | 40 (2) | 34 (2) | 41 (2) | 44 (3) | 42 (2) | 40 (2) | 36 (3) | 39 (2) | 37 (2) | 39 (2) | 38 (2) | 0.0000 | 39 (2) | 40 (3) | 0.44 |
| | Min-Max | 35-41 | 37-43 | 37-46 | 37-41 | 38-42 | 30-36 | 36-46 | 36-48 | 36-48 | 33-45 | 30-41 | 33-44 | 35-41 | 35-45 | 33-41 | | | 35-43 | 30-48 |
| S4 | Mean (SE) | 34 (4) | 37 (2) | 38 (2) | 39 (3) | 37 (1) | 30 (2) | 37 (4) | 38 (3) | 37 (2) | 39 (2) | 33 (2) | 38 (3) | 37 (2) | 38 (4) | 35 (2) | 0.0000 | 35 (3) | 37 (3) | 0.40 |
| | Min-Max | 29-39 | 35-39 | 34-41 | 35-44 | 35-38 | 27-33 | 29-44 | 29-43 | 32-42 | 30-43 | 27-37 | 32-45 | 32-41 | 30-45 | 29-39 | | | 29-39 | 27-45 |
| S5 | Mean (SE) | 30 (2) | 36 (6) | 31 (2) | 32 (2) | 33 (3) | 27 (1) | 31 (2) | 32 (2) | 32 (3) | 33 (2) | 31 (3) | 33 (2) | 32 (2) | 31 (3) | 29 (2) | 0.0000 | 32 (4) | 31 (3) | 0.25 |
| | Min-Max | 26-32 | 30-41 | 24-35 | 30-34 | 29-37 | 23-29 | 22-35 | 22-36 | 29-42 | 30-36 | 27-38 | 29-37 | 27-36 | 23-35 | 24-32 | | | 26-41 | 22-42 |
| r3 | Mean (SE) | 22 (2) | 21 (4) | 24 (2) | 24 (2) | 23 (3) | 21 (2) | 23 (1) | 28 (2) | 25 (2) | 25 (2) | 23 (2) | 23 (2) | 25 (2) | 25 (2) | 24 (2) | 0.0000 | 22 (2) | 25 (2) | 0.00 |
| | Min-Max | 20-26 | 16-23 | 21-27 | 20-25 | 20-27 | 18-23 | 20-25 | 20-32 | 22-30 | 22-30 | 21-28 | 18-28 | 21-28 | 19-29 | 19-27 | | | 16-26 | 18-32 |
| R1 | Mean (SE) | 19 (1) | 23 (3) | 23 (1) | 22 (1) | 25 (3) | 19 (1) | 22 (1) | 26 (2) | 23 (2) | 23 (2) | 22 (2) | 22 (1) | 24 (1) | 24 (2) | 22 (1) | 0.0000 | 20 (2) | 23 (2) | 0.00 |
| | Min-Max | 18-21 | 20-25 | 20-25 | 21-24 | 21-28 | 17-20 | 20-24 | 20-29 | 21-28 | 17-25 | 19-25 | 19-24 | 23-26 | 22-28 | 20-24 | | | 18-25 | 17-29 |
| st1-st1 | Mean (SE) | 54 (2) | 49 (5) | 50 (2) | 53 (3) | 50 (2) | 50 (2) | 50 (1) | 53 (2) | 50 (1) | 50 (2) | 49 (2) | 50 (1) | 50 (1) | 51 (1) | 50 (2) | 0.0000 | 52 (4) | 50 (2) | 0.00 |
| | Min-Max | 52-56 | 42-54 | 47-53 | 49-57 | 47-53 | 48-52 | 47-52 | 47-58 | 45-53 | 45-54 | 46-52 | 47-54 | 47-52 | 49-54 | 47-54 | | | 42-56 | 45-58 |
| st2-st2 | Mean (SE) | 64 (1) | 58 (6) | 60 (2) | 64 (2) | 60 (3) | 59 (2) | 61 (2) | 62 (2) | 62 (2) | 59 (3) | 60 (2) | 60 (3) | 58 (2) | 59 (2) | 57 (2) | 0.0000 | 62 (4) | 60 (3) | 0.00 |
| | Min-Max | 62-65 | 50-63 | 57-63 | 60-66 | 57-64 | 56-61 | 56-65 | 56-65 | 58-69 | 56-64 | 56-63 | 56-67 | 56-63 | 56-64 | 56-61 | | | 50-65 | 55-68 |
| st3-st3 | Mean (SE) | 75 (2) | 70 (8) | 71 (2) | 73 (2) | 72 (2) | 72 (1) | 71 (3) | 72 (3) | 72 (3) | 70 (3) | 69 (3) | 71 (3) | 69 (3) | 71 (3) | 69 (3) | 0.0000 | 73 (6) | 71 (3) | 0.00 |
| | Min-Max | 73-78 | 57-75 | 65-76 | 70-76 | 69-73 | 70-75 | 65-75 | 65-76 | 64-81 | 64-78 | 64-82 | 65-79 | 64-79 | 64-78 | 64-74 | | | 57-78 | 64-82 |
| st1-st3 | Mean (SE) | 66 (2) | 63 (7) | 66 (2) | 67 (1) | 68 (1) | 64 (2) | 67 (2) | 67 (2) | 66 (2) | 66 (2) | 64 (2) | 65 (2) | 66 (2) | 64 (2) | 65 (2) | 0.0000 | 65 (4) | 66 (2) | 0.33 |
| | Min-Max | 63-69 | 54-69 | 60-69 | 66-69 | 67-68 | 62-68 | 62-69 | 62-75 | 62-71 | 63-71 | 59-69 | 60-69 | 61-69 | 60-69 | 60-68 | | | 54-69 | 59-75 |
| st4-st4 | Mean (SE) | 81 (9) | 73 (5) | 82 (10) | 81 (6) | 81 (6) | 75 (7) | 77 (8) | 90 (13) | 83 (11) | 86 (10) | 91 (18) | 80 (10) | 94 (16) | 94 (10) | 84 (6) | 0.0000 | 78 (8) | 85 (13) | 0.12 |
| | Min-Max | 67-95 | 68-79 | 61-102 | 70-85 | 74-89 | 67-87 | 58-93 | 58-142 | 69-129 | 62-116 | 73-143 | 60-101 | 68-136 | 78-117 | 74-96 | | | 67-95 | 58-143 |
| st5-st5 | Mean (SE) | 67 (3) | 70 (10) | 70 (3) | 70 (3) | 72 (2) | 61 (3) | 70 (3) | 69 (3) | 69 (4) | 69 (3) | 66 (6) | 71 (3) | 66 (3) | 70 (4) | 68 (3) | 0.0000 | 68 (6) | 68 (4) | 0.24 |
| | Min-Max | 62-72 | 58-80 | 64-76 | 66-75 | 69-75 | 58-66 | 60-75 | 60-73 | 62-75 | 61-73 | 41-73 | 66-79 | 63-78 | 60-73 | 60-73 | | | 58-80 | 41-79 |
| st2-st3 | Mean (SE) | 26 (1) | 28 (4) | 28 (1) | 27 (2) | 29 (1) | | | | | | | | | | | | | | |

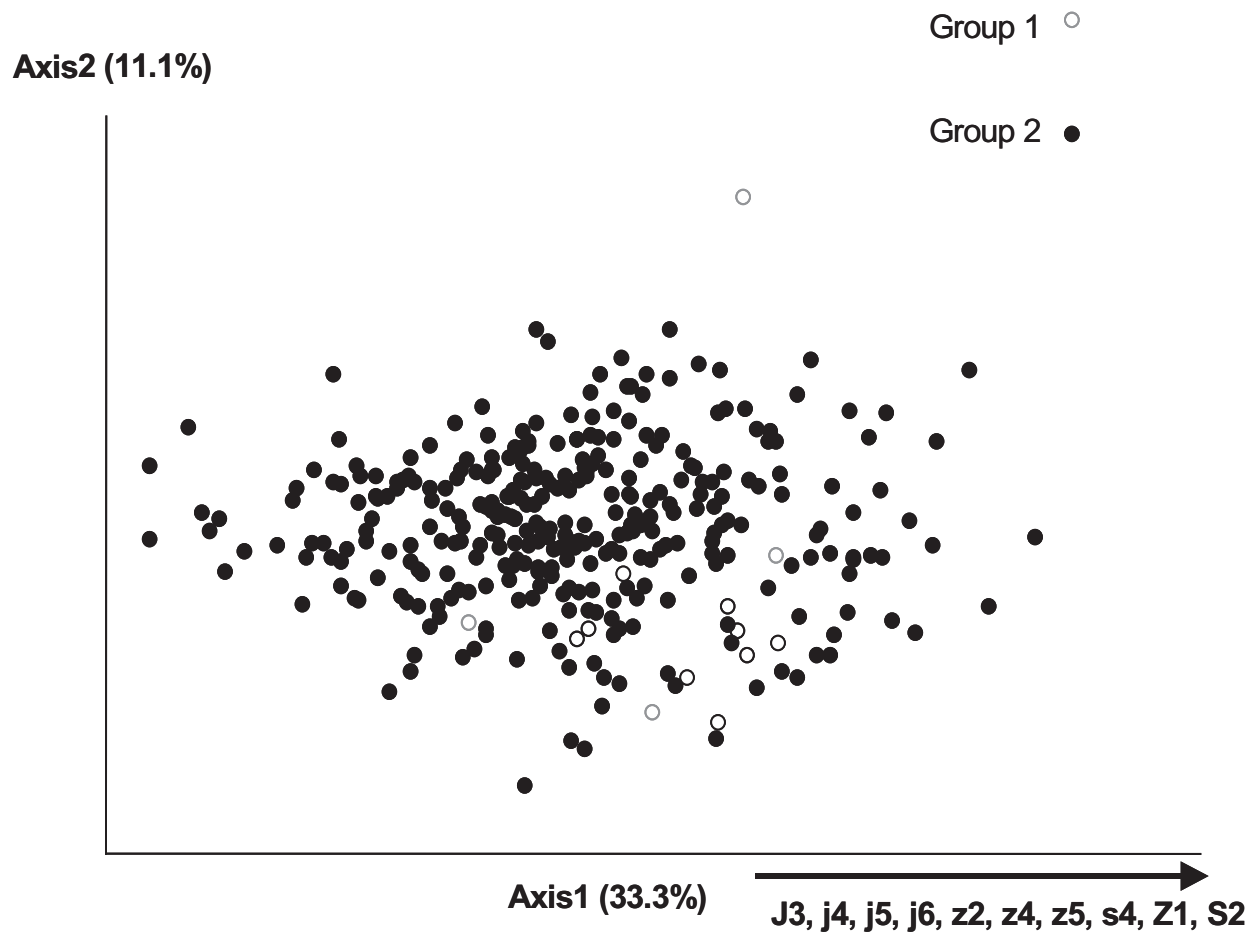


Figure 3. Scatter plots of the first two multifactorial axes for 33 morphological characters of *N. californicus*. Percents in axis refer to the amount of variation accounted for by the first and second axes in the multifactorial analysis. Group 1 contains specimens collected from France (Marsillargues and Midi-Pyrénées), group 2 contains specimens collected in France-Mauguio, South Africa, South Korea, Japan, Brazil, Greece, Tunisia, Chile, Italy-Tuscany, Italy-Sicily, Spain, USA (commercial strain Koppert) and USA (New-York state).

Conclusion

The present study is the first one characterising the intraspecific variation of a species of Phytoseiidae using molecular markers (barcoding mtilocus), considering a so high number of specimens. The intraspecific variation of this species has been previously investigated by Tixier *et al.* (2008b), only on morphological characters.

The main result is an unexpected high mtDNA variation mainly due to two populations (France-Marsillargues and France Midi-Pyrénées), well separated from the 13 others considered. These mt DNA variations were so high compared to previous results, that we wonder on the occurrence of two cryptic species within the specimens identified as *N. californicus*. However, both ITS marker and morphological analyses allowed to conclude that despite this high mt variation, all the populations considered belong to the same species. Kanouh *et al.* (2010) also showed an unexpected high intraspecific genetic variation with the same two mitochondrial DNA markers (12S rRNA and Cytb mtDNA), questioning the reliability of mitochondrial markers for specific diagnostic. However, in the present case, these markers well separated *N. californicus* and *N. picanus* despite the high genetic distances observed within *N. californicus*. Futhermore, if we calculate the threshold cutt-off value (10 x mean intraspecific genetic distance) suggested by Hebert *et al.* (2003, 2004) for delineating species, the cut-off limit between intra and interspecific varitions would be of 8% (10 x 0.8) and 17% (10 x 1.7) for the 12S rRNA and Cytb mtDNA markers, respectively. If such treshold cutt-off values were applied, we would conclude that *N. californicus* and *N. picanus* are two different species and that all the specimens identified as *N. californicus* belong to the same species (maximum intraspecific distances: 12S RNA = 5.2% and Cytb mtDNA = 10.5%). The application of the threshold proposed by Hebert *et al.* (2003, 2004) thus leads to similar conclusions as the ones emphasized with the nuclear marker (ITS) and morphological analyses. This study displays the importance to apply an integrative taxonomic approach for avoiding misidentifications. Furthermore, some questions can be emphasized concerning the high mitochondrial variations within the species *N. californicus*. The populations considered are worldwide collected and no correlation between geographic and genetic distances was observed. Indeed, on one hand, the two

genetic distant populations were both collected in France. On the other hand, very remoted populations (Brazil, Japan, South Africa for instance) were very similar (intraspecific distances near to 0%). In further investigations, It would be interesting to determine how these results (and the absence of variations) could be linked to the history of commercial introductions of this species in the world.

Acknowledgments

We thank all the scientists that provide the mite populations for this study: Dr Castagnoli and Dr Liguori for the Italy - Tuscany population, Dr Ferragut for the Spanish population, Dr Ragusa for the Italy - Sicily population, Dr de Moraes for the Brazilian population, Dr Gotoh for the Japanese population, Dr Broufas for the Greek population, Dr Lebdi-Grissa for the Tunisian population, Dr Vargas for the Chilean population, Professor Croft for the USA population, Dr Jung for the South Korean population, Dr Ueckermann for the South African population and the company koppert. Thank you also to Mr Tronel and Mr Bonafos for the France-Marsillargues and France Midi-Pyrénées populations, respectively. Data used in this work were (partly) produced through the technical facilities of the “Montpellier Environnement Biodiversité” Research Federation

References

- Cain, A.J. (1954). *Animal species and evolution*. Hutchinson, London, 190p.
- Cardoso, A., Serrano, A. & Vogler, A. P. (2009). Morphological and molecular variation in tiger beetles of the *Cicindela hybrida* complex: is an 'integrative taxonomy' possible? *Molecular Ecology*, 18, 648-64.
- Castagnoli, M., Simoni, S. & Biliotti, N. (1999). Mass-rearing of *Amblyseius californicus* (Acari: Phytoseidae) on two alternative food sources. In: Bruin, J., Geest, L.P.S., Sabelis, M.W. eds. , *Ecology and Evolution of the Acari.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp 425-431.
- Chant, D. A. & McMurtry, J. A. (1994). A review of the sub-families Phytoseiinae and Typhlodrominae (Acari: Phytoseiidae). *International Journal of Acarology*, 20(4), 223-310.

- Chant, D.A. & McMurtry, J.A. (2007). *Illustrated keys and diagnoses for the genera and subgenera of the Phytoseiidae of the world (Acari: Mesostigmata)*. Indira Publishing House, 220pp.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of Linnean Society*, 85, 407-415.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer, T. & Wilson, A. (2007). Geneious v3.5, available from: <http://www.geneious.com/> (accessed in March 2009).
- Escudero, L.A. & Ferragut, F. (2005). Life-history of predatory mites *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) on four spider mite species as prey, with special reference to *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Biological Control*, 32, 378-384.
- Gotoh, T., Tsuchiya, A. & Kitashima, Y. (2006). Influence of prey on developmental performance, reproduction and prey consumption of *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology*, 40, 189–204.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S. L. & de Waard J.R. (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, B 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, L.Y., Zemlak, T.S. & Francis, C.M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PloS Biology*, 2, 10e312.
- Jeyaprakash, A. & Hoy, M.A. (2002). Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari:Phytoseiidae). *Biological Control*, 25, 136-142.
- Kanouh, M., Tixier, M.-S., Okassa, M. & Kreiter, S. (2010). Phylogenetic and biogeographic analysis of the genus *Phytoseiulus* (Acari: Phytoseiidae). *Zoologica Scripta*, 39, 450–461.
- Kostiainen, T. & Hoy, M.A. (1996). *The Phytoseiidae as Biological Control Agents of Pest Mites. A Bibliography (1960-1994)*. University of Florida, IFAS Publication, Florida Agricultural Experiment Station, Monograph 17. 355p.
- Lindquist, E. & Evans, G.W. (1965). Taxonomic concepts in the Ascidae, with a modified setal nomenclature for the idiosoma of the Gamasina Acarina: Mesostigmata. *Memorium of the Entomological Society of Canada*, 47, pp 64.

- McMurtry, J.A & Croft, B.A (1997). Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annual Review of Entomology*, 42, 291-321.
- Meier, R. (2008). DNA sequences in taxonomy: opportunities and challenges. In *The New Taxonomy*. Edited by: Wheeler QD. CRC Press, Taylor and Francis Group, 95-127. .
- Navajas, M., Lagnel, J., Fauvel, G. & Moraes, G.J. de (1999). Sequence variation of Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Experimental and Applied Acarology*, 23, 851–859.
- Okassa, M., Tixier, M.-S, Cheval, B. & Kreiter, S. (2009). Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). *Canadian Journal of Zoology*, 87, 689-698.
- Okassa, M., Tixier, M.-S. & Kreiter, S. (2010). Morphological and molecular diagnostic of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari : Phytoseiidae). *Experimental Applied Acarology*, 52, 291-303.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818.
- Rowell, H.J., Chant, D. A. & Hansell, R.I.C. (1978). The determination of setal homologies and setal patterns on the dorsal shield in the family Phytoseiidae (Acarina: Mesostigmata). *Canadian Entomologist*, 110, 859-876.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- StatSoft France 2008. STATISTICA version 7.1. www.statsoft.fr.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.08b. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Palevsky, E., Walzer, A., Gal, S. & Schausberger, P. (2008). Evaluation of dry-adapted strains of the predatory mite *Neoseiulus californicus* for spider mite control on cucumber, strawberry and pepper. *Experimental and Applied Acarology*, 45, 15–27.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Cheval, B. & Auger, P. (2003). Morphometric variation between populations of *Kampimodromus aberrans* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae): implications for the taxonomy of the genus. *Invertebrate systematics*, 17, 349-358.

- Tixier, M.-S, Kreiter, S., Ferragut, F. & Cheval, B. (2006a). The suspected synonymy of *Kampimodromus hmiminai* McMurtry and *K. adrianae* (Acari: Phytoseiidae): morphological and molecular investigations. *Canadian Journal of Zoology*, 84, 1216-1222.
- Tixier, M.-S, Kreiter, S., Barbar, Z., Ragusa, S. & Cheval, B. (2006b). The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy. *Zoologica Scripta*, 35, 115-122.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Croft, B.A. & Cheval, B. (2008a). *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) from USA: morphological and molecular assessment of its density. *Bulletin of Entomological Research*, 98, 125–134
- Tixier, M.-S., Guichou, S. & Kreiter, S. (2008b). Morphological variation in the biological control agent *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae): consequences for diagnostic reliability and synonymies. *Invertebrate systematics*, 22, 453-469.
- Tixier, M.-S, Ferrero, M., Okassa, M., Guichou, S. & Kreiter, S. (2010). On the specific identity of specimens of *Phytoseiulus longipes* Evans (Mesostigmata: Phytoseiidae) showing different feeding behaviours: morphological and molecular analyses. *Bulletin of Entomological Research*, 17, 1-11.
- Wiens, J.J. & Servedio, M.R. (2000). Species delimitation in systematics: Inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 267, 631-636.

V.C.2. Le cas de l'espèce *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* Scheuten

La découverte d'espèces cryptiques a été l'un des arguments avancé par les défenseurs du barcoding (voir chapitre II.B § 2-2). En effet, plusieurs complexes d'espèces cryptiques ont été mis en évidence dans de nombreux groupes taxonomiques par l'utilisation d'une telle démarche (voir chapitre II.B § 3). Les marqueurs moléculaires n'ont été utilisés que très récemment au sein de la famille des Phytoseiidae (Navajas et Fenton, 2000 ; Jeyaprakash et Hoy, 2002 ; Tixier *et al.*, 2006a,b, 2008a, 2010) et nous n'avons pas encore assez de recul pour déterminer dans quelle mesure ils pourraient mettre en évidence des espèces cryptiques. Comme seuls les caractères morphologiques sont aujourd'hui utilisés pour le diagnostic spécifique (Chant et McMurtry, 1994, 2006a, b), l'utilisation du barcoding permettrait, comme dans d'autres groupes taxonomiques de déceler également l'existence d'espèces cryptiques au sein de la famille des Phytoseiidae. La mise en évidence d'espèces cryptiques est en effet particulièrement importante, d'une part pour réévaluer le nombre d'espèces au sein d'un groupe taxonomique, mais d'autre part pour surtout associer les caractéristiques biologiques et géographiques à l'espèce concernée. Afin de déterminer l'existence potentielle d'espèces cryptiques au sein des Phytoseiidae, il est cependant nécessaire au préalable de caractériser l'étendue de la variation intraspécifique au sein de chaque entité, ceci pour ne pas surestimer le nombre d'espèces.

IV.C.2.1. Objectif de l'étude

Cette étude s'intéresse à l'étendue de la variation intraspécifique d'une espèce de Phytoseiidae : *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* Scheuten. Quatre régions du génome ont été considérées : trois marqueurs mitochondriaux (12S, Cytb et COI) et un marqueur nucléaire (ITS). Etant donné qu'une variation intraspécifique élevée a été observée avec les marqueurs mitochondriaux, nous avons cherché à déterminer si notre échantillon contenait une seule espèce ou deux espèces cryptiques. Afin de tester ces deux hypothèses, des études morphologiques et des croisements ont été réalisées.

IV.C.2.2. Position taxonomique de *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri*

Typhlodromus (Typhlodromus) pyri a été décrite sous le nom de *Typhlodromus pyri* par Scheuten en 1857 à partir de spécimens collectés sur *Pyrus communis* (L.). Cette espèce appartient à la sous famille des Typhlodrominae, à la tribu des Typhlodromini, tribu comprenant deux autres genres : *Typhloseiulus* et *Neoseiulella*. Le genre *Typhlodromus*, proposé par Scheuten (1857) avec *T. (T.) pyri* comme espèce type (Chant et Yoshida-Shaul, 1987 ; Chant et McMurtry, 1994, 2007) est divisé en deux sous-genres : le sous-genre *Typhlodromus (Anthoseius)* qui est caractérisé par la présence de la soie S5 et le sous genre *Typhlodromus (Typhlodromus)* qui est caractérisé par l'absence de cette même soie. Ce dernier sous-genre comprend actuellement 57 espèces (Moraes *et al.*, 2004 ; Chant et McMurtry, 2007).

IV.C.2.3. *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* et les synonymies

Typhlodromus (Typhlodromus) pyri a été mise plusieurs fois en synonymie avec *Typhlodromus (Typhlodromus) tiliae* Oudemans (Chant *et al.*, 1974, ; Karg, 1982). Ces deux espèces ont été considérées par la suite comme deux espèces valides (Chant et Yoshida-Shaul, 1987). En effet, *T. (T.) pyri* et *T. (T.) tiliae* se différencient par le nombre de solénostomes sur le bouclier dorsal : *T. (T.) pyri* en possède trois alors que *T. (T.) tiliae*, quatre.

Typhlodromus (Typhlodromus) pyri a été également suspectée d'être un synonyme de *Typhlodromus (Typhlodromus) tubifer* Wainstein; cependant cette synonymie a été réfutée par Chant et Yoshida-Shaul (1987), du fait d'un nombre de dents différent sur le mors mobile des chélicères. D'après la dernière révision du catalogue, il n'existerait pas d'espèce synonyme de *T. (T.) pyri*. Les principales caractéristiques morphologiques qui permettent de clairement la différencier des 56 autres espèces du sous-genre sont : la présence de 3 solénostomes sur le bouclier dorsal, de 8 soies sur le genou II et la forme en tube du calyx de la spermathèque.

IV.C.2.4. Quelques caractéristiques biologiques de *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri*

IV.C.2.4.1. Type de prédation

Typhlodromus (Typhlodromus) pyri est un prédateur généraliste polyphage qui appartient à la catégorie fonctionnelle III définie par McMurtry et Croft (1997).

IV.C.2.4.1.2. Durée de développement, taux de fécondité des femelles et sex ratio

Les caractéristiques biologiques de *T. (T.) pyri* ont été très étudiées (Duso et Camporese, 1991 ; Wei et Walde, 1997 ; Roda et Nyrop, 2003 ; Pozzebon *et al.*, 2009) du fait de l'intérêt agronomique de cette espèce.

- ❖ Dans des conditions optimales (26-27 °C et 70-90 % HR), la durée de développement du stade œuf au stade adulte de *T. (T.) pyri* est dépendante de l'espèce de proie consommée : *P. ulmi* (6,61 jours), *Eotetranychus carpini* (Oudemans) (6,33 jours), *Colomerus vitis* (Pagenstecher) (6,41 jours) et *Mesembryanthemum criniflorum* (7,08 jours) (Duso et Camporese, 1991). Pozzebon *et al.* (2009) obtiennent des valeurs légèrement plus élevées lorsque *T. (T.) pyri* consomme, soit des proies constituées de *T. urticae* (8,15 ± 0,9 jours), soit du pollen (8,02 ± 0,13).
- ❖ Quand les conditions sont optimales, le taux de fécondité (nombre d'œufs pondus / femelle / jour) semble être proche de 1 (0,90 ± 0,1 : Genini *et al.* 1991 ; 1,02 : MacRae et Croft, 1993), ceci lorsque *T. (T.) pyri* consomme *T. urticae*. Lorsqu'il consomme *P. ulmi*, un taux de fécondité d'une valeur de 1,02 a été observé (Duso et Camporese, 1991). Cependant, selon le stade de la proie, le taux de fécondité peut également varier. Ainsi, Overmeer (1981) a montré un taux de fécondité de 0,6 œuf / femelle / jour lorsqu'il consommait tous les stades de *P. ulmi*, et de 0,7 lorsqu'il ne consommait que les larves.
- ❖ Enfin, la sex ratio est biaisée en faveur des femelles comme pour la plupart des espèces de Phytoseiidae (Helle et Sabelis, 1985a). Cette valeur est supérieure à 60 % dans des conditions optimales de développement lorsque *T. (T.) pyri* consomme *T. urticae* ou du pollen (Pozzebon *et al.*, 2009).

IV.C.2.5. Importance de cette espèce en lutte biologique

Typhlodromus (Typhlodromus) pyri est généralement utilisée dans des stratégies de lutte par conservation ou par inoculation. *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* a permis de lutter efficacement contre *P. ulmi* dans des vergers de pommiers (Duso et Pasqualetto, 1993; Solomon *et al.*, 1993; Schausberger, 1998) et dans les vignobles (Moraes *et al.*, 1986 ; Camporese et Duso, 1996; Papaioannou-Souliotis *et al.*, 1999) en Europe. Cette espèce a aussi été utilisée pour lutter contre *T. urticae* sur des cultures de fraises (Zacharda et Hluchy, 1996). Elle est présente dans les cultures mais également de façon spontanée dans les zones non cultivées (Tuovinen et Rokx, 1991 ; Duso *et al.*, 1993b ; Tuovinen, 1994 ; Tixier *et al.*, 1998). Compte tenu de son importance majeure en lutte biologique, son identification correcte est primordiale.

IV.C.2.6. Distribution géographique

Typhlodromus (Typhlodromus) pyri est une espèce originaire de la région Ouest Paléarctique qui a été introduite en Amérique du Nord (Putman et Herne, 1966 ; Sanford, 1967 ; Downing et Moilliet, 1971 ; Madsen et Morgan, 1975 ; Denmark, 1992) et en Nouvelle-Zélande (Collyer, 1964 ; Thomas et Chapman, 1978 ; Schicha, 1980) pour le contrôle biologique (Zhang, 2003 ; Moraes *et al.*, 2004 ; Tixier *et al.*, 2008c).

IV.C.2.7. Populations et espèces étudiées

Neuf populations de *T. (T.) pyri* ont été collectées, principalement en Europe et aux États-Unis. Ces populations étaient originaires soit de parcelles cultivées (vigne et pommiers), soit de zones non cultivées. Des mesures morphométriques de trente-quatre caractères continus ont été effectuées sur quatre-vingt-quatre spécimens. Les analyses moléculaires ont été effectuées à l'aide de quatre marqueurs. Nous avons analysé : trente-quatre spécimens pour le marqueur 12S (420 pb), quarante pour le marqueur Cytb (416 pb), vingt-neuf pour le marqueur COI (708pb) et enfin cinquante-huit pour le marqueur ITS (710 pb). Pour estimer la variation interspécifique, une espèce témoin a été étudiée: *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus* Ragusa. Des caractères entre autres comme le nombre de soies sur le genou II, la longueur

du péritrème, ainsi que le nombre de solénostomes sur le bouclier dorsal, permettent de différencier facilement ces deux espèces.

Enfin, des croisements biologiques ont été réalisés afin de confirmer ou infirmer la présence d'un complexe d'espèces cryptiques au sein des spécimens identifiés comme *T. (T.) pyri*.

IV.C.2.8. Article 6. Okassa M., Tixier M.-S., Kreiter S. An integrative taxonomical approach for specific diagnostic:the case of *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* (Scheuten) (Acari: Phytoseiidae). En cours de soumission.

Abstract

Phytoseiidae species are predators of great agronomic interest, and their accurate identification is required for ensuring biological control success of many pests in the world. As knowledge of intraspecific variation is essential for avoiding misidentification (false synonymies or overestimation of species number), the boundaries of the intraspecific variations of one species of Phytoseiidae: *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* were presently investigated for a set of molecular markers and morphological characters. Cladograms obtained with the three mitochondrial DNA fragments considered showed two sub-clades whereas both nuclear DNA fragment and morphological analyses did not show such a structuration. To conclude on the existence of two or one species, cross-breeding experiments were carried out. No reproductive incompatibilities between populations belonging to the two sub-clades were observed. Therefore, despite the great intraspecific variation emphasized by the three mt DNA markers; all the specimens considered belong to the same species. The present study clearly underlines the necessity to use multiple approaches for species definition (integrative taxonomy) and the caution that must be paid using only mitochondrial markers for specific diagnostic.

Keywords : molecular markers, morphology, cross experiments

Introduction

The great challenge of Taxonomy is to develop operational methods for delimiting species (Cracraft 2000; Sites & Marshall 2004). Species are still essentially defined according to their morphological attributes. The basic procedure of most alpha-level systematic studies is to compare character distributions between geographical samples and determine which sets of populations are delimited by seemingly fixed diagnostic differences (Wiens & Servedio 2000). Species recognition is thus based on non-overlapping differences between putative species. However, this criterion is rarely tested, whereas a wrong interpretation of the character signification can clearly lead to false synonymies (cryptic species) or to an overestimation of the number of species (Wiens & Servedio 2000). To assist morphological diagnostic, molecular markers (barcoding approach) are more and more used (Hebert et al. 2003, 2004a,b; Moritz & Cicero 2004). Within this approach, species delimitation is mainly based on the absence of overlapping between intra- and interspecific genetic distances, and lineage-specific threshold cut-offs were proposed (Hebert et al. 2004b). However, calibrations of a unique cut-off value are problematic as the magnitude of sequence divergence can vary among lineages (Hebert & Gregory 2005; Prendini 2005; Will et al. 2005; Hickerson et al. 2006; Meier et al. 2006; Rubinoff et al. 2006). Molecular diagnostic approach leads thus to the same questionnements as those previously addressed for the morphological single-character-system (Wiens & Servedio 2000): what is the variability of one or more characters (genetic distances, morphological characters) expected within a single species? To answer this question, the present study aims to characterize molecular and morphological intraspecific variations of the mite species *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) *pyri* (Scheuten), family Phytoseiidae. This species is an efficient natural enemy of pest mites especially in European orchards and vineyards (Duso & Pasqualetto 1993; McMurtry & Croft 1997). The identification of these microscopic organisms (less than 500 μm in length) is essentially based on morphological characters, even if recently, molecular approaches were applied to resolve some diagnostic questions (Jeyaprakash & Hoy 2002; Tixier et al. 2006a,b, 2008a,b; 2010; Okassa et al. 2009, 2010; Kanouh et al. 2010). In the present study, an integrative taxonomic approach is proposed to solve taxonomic questions raised, as other cases in

literature (Bickford et al. 2007; Tan et al. 2010), finding unexpected high levels of mtDNA divergence between several populations assumed to belong to a same species.

Material and Methods

Populations studied

Typhlodromus (*Typhlodromus*) *pyri* is a West-Palaeartic species, introduced in other parts of the world (i.e. North America) for biological control purposes (Moraes et al. 2004; Tixier et al. 2008c). Nine populations, sampled in seven countries and on four plants were considered (Austria, Belgium, France, Hungary, Italy, Poland, USA) (Table 1). Specimens of *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) *exhilaratus* Ragusa collected in France on vine were also analysed as a control to assess interspecific genetic distances.

Molecular analyses

DNA mite extraction. Total genomic DNA was individually extracted from several females per population or species, using a Qiagen DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the DNA extraction protocol « Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells » (Spin-Column Protocol) adapted for extracting total DNA from mites (Kanouh et al. 2010).

Markers used. A nuclear (ITS) and three mitochondrial markers (12S rRNA, Cytochrome b mtDNA and Cytochrome oxidase I mtDNA) were used. Primers and thermal cycling are shown in the Table 2. The PCR reactions were performed in a 25 µl volume, containing 4 µl of mite DNA, 2.5 µl (1 mM) of buffer 10X, 1 µl (1.5 mM) of MgCl₂, 0.5 µl (0.05 mM for each) dNTPs, 0.175 µl (0.7 µM) for each primer, 0.125 µl (0.625 U) of Taq Qiagen and 16.525 µl of water. and for COI mtDNA marker: Electrophoresis was carried out on a 1.5 % agarose gel in 0.5 X TBE buffer during 20 min at 135 volts.

Table 1. Characteristics of the nine populations of *T.(T.) pyri* and the out-group species studied and their accession numbers in the Genbank database, for 12S rRNA, Cytb mt DNA, COI mt DNA and ITS markers.

| Species | Country | Locality | Plant support | Number of females measured | Number of sequences obtained 12S rRNA | Number of sequences obtained Cytb mtDNA | Number of sequences obtained COI mtDNA | Number of sequences obtained ITS |
|----------------------------|----------|---------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---|--|----------------------------------|
| <i>T. (T.) pyri</i> | France | Mercantour | <i>Cornus sanguinea</i> | 10 | JF279058 | JF279283 | JF279169 | JF279150 |
| | | | | | JF279059 | JF279284 | JF279170 | JF279151 |
| | | | | | JF279060 | JF279285 | JF279171 | JF279152 |
| | | | | | JF279061 | | | JF279153 |
| <i>T. (T.) pyri</i> | France | Burgundy | <i>Vitis vinifera</i> | 10 | JF279041 | JF279274 | JF279156 | JF279140 |
| | | | | | JF279042 | JF279275 | JF279157 | JF279141 |
| | | | | | JF279043 | JF279276 | JF279158 | JF279142 |
| | | | | | JF279044 | JF279277 | JF279159 | JF279143 |
| | | | | | JF279045 | JF279278 | JF279160 | JF279144 |
| | | | | | JF279046 | JF279279 | JF279161 | |
| | | | | | JF279047 | JF279280 | | |
| | | | | | JF279048 | JF279281 | | |
| | JF279282 | | | | | | | |
| <i>T. (T.) pyri</i> | France | Valleraugue | <i>Rubus</i> sp. | 3 | JF279049 | JF279266 | JF279162 | JF279145 |
| | | | | | JF279050 | JF279267 | JF279163 | JF279146 |
| | | | | | JF279051 | JF279268 | JF279164 | JF279147 |
| | | | | | JF279052 | JF279269 | JF279165 | JF279148 |
| | | | | | JF279053 | | | JF279149 |
| | | | | | JF279055 | | | |
| <i>T. (T.) pyri</i> | USA | New York | <i>Malus</i> sp. | 9 | JF279056 | JF279270 | JF279166 | JF279132 |
| | | | | | JF279057 | JF279271 | JF279167 | JF279133 |
| | | | | | | JF279272 | JF279168 | |
| | | | | | | JF279273 | | |
| <i>T. (T.) pyri</i> | Belgium | - | <i>Malus</i> sp. | 12 | JF279028 | JF279251 | - | JF279130 JF279131 |
| <i>T. (T.) pyri</i> | Austria | Vienna | <i>Vitis vinifera</i> | 10 | JF279029 | JF279252 | JF279172 | JF279134 |
| | | | | | JF279030 | JF279253 | JF279173 | JF279135 |
| | | | | | JF279031 | JF279254 | JF279174 | JF279136 |
| | | | | | JF279032 | | | JF279137 JF279138 JF279139 |
| <i>T. (T.) pyri</i> | Poland | - | <i>Malus</i> sp. | 8 | JF279037 JF279038 | JF279255 JF279256 | JF279181 | - |
| <i>T. (T.) pyri</i> | Italy | Padova | <i>Vitis vinifera</i> | 11 | JF279039 | JF279257 | JF279179 | JF279126 |
| | | | | | JF279040 | JF279258 | JF279180 | JF279127 |
| | | | | | | JF279259 | | JF279128 |
| | | | | | | JF279260 | | JF279129 |
| <i>T. (T.) pyri</i> | Hungary | Raposka | <i>Vitis vinifera</i> | 11 | JF279033 | JF279261 | JF279175 | JF279122 |
| | | | | | JF279034 | JF279262 | JF279176 | JF279123 |
| | | | | | JF279035 | JF279263 | JF279177 | JF279124 |
| | | | | | JF279036 | JF279264 | JF279178 | JF279125 |
| | | | | | | JF279265 | | |
| <i>T. (T.) exhilaratus</i> | France | Restinclières | <i>Vitis vinifera</i> | - | JF279062 JF279063 | JF279286 JF279287 | JF279182 JF279183 | JF279154 JF279155 |

DNA sequencing. PCR products were sequenced using Dynamic ET Terminator Cycle Sequencing kit, and purified using ExoSAP-IT (Amersham). The sequencer used was the Megabase 1,000 apparatus. DNA fragments were sequenced along both strands. Sequences were aligned and analyzed with Geneious v3.5.4 (Drummond *et al.* 2007). The numbers of sequences obtained with their accession number in the Genbank database are presented in the table 1.

Data analyses. A preliminary analysis was conducted on the coding sequences (Cytb and COI mtDNAs) to check for the absence of stop codons using Mesquite (Maddison & Maddison 2010).

Incongruence Length Difference (ILD) (Farris *et al.* 1994) was calculated to examine possible conflicting signals among the four components of the data set. Despite an absence of incompatibility between the DNA data sets (ILD= 0.2), the trees obtained will not be presented: this would lead to a too great information loss as the number of DNA sequences obtained for each DNA marker was unequal.

The distance matrices were elaborated using the Kimura 2- parameter model. Separate analyses were conducted for each data set (four loci) using both parsimony and bayesian approaches. For parsimony analyses heuristic search procedure repeated 1,000 times was applied, with randomized taxa additions and branch-swapping algorithm (TBR). Node support was determined using 1,000 bootstrap replicates (PAUP*, v.4.0b.10 / Swofford 2002). For bayesian analyses, the best-fit substitution model was determined by Modeltest 3.06 (Posada & Crandall 1998) for each gene through hierarchical likelihood-ratio tests (LRTs). The model of evolution GTR was selected by the LRTs with a proportion of unvariable sites and a gamma distribution. The GTR model was implemented in MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). The number of categories used to approximate the gamma distribution was set at 4, and four Markov chains were run for 100,000 generations. Stabilization of model parameters (burn-in) occurred around 250 generations.

Table 2. Primers and PCR thermal cycling conditions for the four DNA fragments considered

| DNA fragment | Primers | PCR Thermal cycling conditions |
|--------------|--|---|
| COI mtDNA | 5'-3' TTTCAACWAATCATAAAGATATTGG 3'-5'TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA | 3 min 95°C 35 cycles: 1 min 94°C 1.5 min 48°C 1 min 72°C 5 min 72°C. |
| Cytb mtDNA | 5'-3' TAWRAARTATCAYTCDGGTTKRATATG 3'-5' CCWTGAGGACAAATAWSWTT YTGAGG | 3 min 94°C 35 cycles: 20 s 92°C 1 min 53°C 1 min 72°C 5 min 72°C |
| 12S rRNA | 5'-3' TACTATGTTACGACTTAT 3'-5' AA ACTAGGATTAGATACCC | 1 min 95°C 35 cycles: 30s 94°C 30s 40°C 1 min 72°C 5 min 72°C |
| ITS | 5'-3' AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG 3'-5' ATATGCTTAAATTCAGGGGG | 2 min 92 °C 35 cycles : 15s 92°C, 45s 50°C 1min 72°C 7 min 72°C |

Morphological analyses

Eighty-four females of *T. (T.) pyri* were mounted on slides in Hoyer's medium and observed with a phase and differential interference contrast microscope (Leica DMLB, Leica Microsystems SAS, Rueil-Malmaison, France) (40x magnification).

Characters considered. As dorsal seta lengths are currently used to discriminate between phytoseiid species, the eighteen dorsal idiosomal setae of females were measured: j1, j3, j4, j5, j6, J5, z2, z3, z4, z5, s4, s6, Z4, Z5, S2, S5, r3 and R1. The lengths of the seta JV5, the macroseta on the basitarsus IV, tibia IV and genu IV and the dimensions (length and width) of the dorsal and of the three ventral shields were also considered. A total of 34 characters were taken into account. Terminology for setal notation follows that of Lindquist and Evans (1965) as adapted by Rowell *et al.* (1978) for the Phytoseiidae.

Data analyses. Variance analyses (ANOVAs) (and Newman and Keuls means comparison test) were performed to determine differences between the populations for the 34 morphological characters measured. Furthermore, as unexpectedly high mt DNA divergences were found between two groups of populations, student tests were performed to determine differences in measurements between specimens belonging to these latter groups. A principal component analysis was also processed to determine whether the combination of the morphological characters can differentiate these specimens (Statsoft France 2008).

Optimal sample size required to assess morphological and molecular intraspecific variations

To determine the optimal number of *T. (T.) pyri* females needed to accurately assess the morphological intraspecific variation, the relation $N = 10000 * z_{\alpha/2}^2 * SE^2 / (E^2 * x^2)$ was used, where SE is the standard error, x is the mean, E is the deviation accepted around the mean (10 %) and $z_{\alpha/2}$ the value of the student table corresponding to $\alpha=0.05$ and $n=84$ ($z_{\alpha/2} = 1.99$) (Tixier *et al.* 2008b).

To determine the number of *T. (T.) pyri* needed to accurately assess the molecular intraspecific variation, we plotted the cumulative number of specimens with the corresponding intraspecific distances observed for each DNA fragment. For this, the number of specimens was inferred from the number of pairwise distances

using the following relation $D = n(n-1) / 2$, where D is the number of pairwise distances, and n is the corresponding number of specimens considered. Then, ten models, currently used for species-accumulation curves, were examined (i.e. Tjorve 2003; Mora *et al.* 2008): Power ($y=a*x^b$), negative exponential ($y=a/b*(1-\exp(-b*x))$), Clench ($y=a*(x/(b+x))$), Weibull ($y=a*(1-\exp(-b*x^c))$), Morgan-Mercer-Flodin ($y=a*x^{(c/(b+x^c))}$), Chapman-Richards ($y=a*(1-\exp(-b*x))^c$), Beta-P ($y=a*(1-(1+(x/c)^d)^{-b})$), Michaelis-Menten ($y=(a*x)/(1+(b*x))$), asymptotic ($y=a-(b*(c^x))$) and logarithmic ($y=(1-\exp(-b))*\log(1+(1-\exp(-b))*a*x)$) functions. Models were fitted by non-linear regression using Statistica software (Statsoft France 2008). The simplest models (with two parameters) were fitted using the Simplex & Quasi-Newton algorithm. However, this method was not able to fit the complex functions (more than two parameters), thus Hooke-Jeeves or Rosenbrock algorithms were used in these latter cases. The coefficient of determination (R^2) and Akaike's information criterion (AIC) were used to assess overall model performance. The value of asymptote determined by iteration estimates the number of specimens useful to characterize the overall molecular variation of *T.(T.) pyri* with the four DNA markers.

Cross experiments

Strains studied. Cross experiments were carried out between two populations belonging to the two sub-clades obtained with the mtDNA fragments. Both populations were collected on vineyards, one in France - Burgundy (group 1) and the other in Austria - Vienna (group 2). The populations were mass-reared in separated climatic chambers (25°C, 70% HR, 16L : 8D) for several months on eggs of *Tetranychus urticae* Koch.

Experimental protocol. A deutonymph of each population was isolated and put in a rearing cell (plastic disk confined with wet cotton barriers) with one male of the same (control) or the other population. The males were not removed throughout the experiment. Mites were fed with eggs of *T. urticae*, provided each two days without limitation. Observations were carried out each two days until the death of the female. The fecundity and the offspring viability until the adulthood were evaluated. Backcrosses were also carried out. Deutonymphs from the first

generation were isolated and mated with corresponding males. The number of eggs and descendant sex ratio were assessed.

Data analysis. ANOVAs were performed to compare fecundity and durations of the female surviving period and preoviposition period between the different crosses carried out (Statsoft France 2008).

Results and discussion

Molecular analyses

Among amplified fragments of 420, 416, 708 and 710 base pairs (bp), 399, 408, 666 and 653 bp were aligned for the 12S rRNA, Cytb mtDNA, COI mtDNA and ITS genes, respectively. DNA analyses showed quite similar and constant rates of nucleotide substitutions for all the populations and species studied. A BLAST search in the Genbank database showed that the sequences aligned with others of Phytoseiidae. The preliminary analyses conducted on the sequences coding for COI and Cytb mtDNAs showed the absence of Nuclear mitochondrial pseudogenes (Numts) in our data set.

For all the analyses carried out, the clade including all the specimens identified as *T. (T.) pyri* is well separated from the control species *T. (T.) exhilaratus* and the mean genetic distances between these two entities are much higher than intraspecific ones (Figures 1, 2; Table 3). For the analyses carried out with the three mitochondrial markers, the specimens of *T. (T.) pyri* are included in two main sub-groups. For the bayesian analysis conducted with the COI mtDNA marker, even a greater genetic structuration is observed (Figure 2c). The sub-group 1 contains the specimens collected in USA and France and the sub-group 2 contains the specimens from the other countries. No overlap between intra and inter-group genetic distances was observed for the 12S rRNA and COI mtDNA (and a weak one for the Cytb mtDNA) and the mean genetic distances among the specimens identified as *T. (T.) pyri* were quite high (12S rRNA: 2.2 ± 1.7 %; Cytb mtDNA: 5.1 ± 3.2 %; COI mtDNA: 6.1 ± 4.2 %) in regards to the intraspecific variations (rarely overpassing 2%) previously observed with the same genes for species of the family Phytoseiidae, sub-family Amblyseiinae (Okassa *et al.* 2009, 2010; Tixier *et al.* 2010). It could be thus assumed that the two sub-clades belong to two different species. However, when comparing our data to the unique

molecular study dealing with species belonging to the same sub-family as *T. (T.) pyri* (Typhlodrominae), the intraspecific distance presently obtained was smaller than the one previously obtained (Kanouh *et al.* 2010). For this and contrarily to what we assumed previously, the two sub-clades would belong to the same species and *T.(T.) pyri* would be characterized by high mtDNA variations. This conclusion is confirmed by the results obtained with the nuclear marker (ITS) for which the two sub-clades emphasized with mtDNA markers are not observed (Figures 1d, 2d). The intraspecific genetic distances of *T. (T.) pyri*, ranging from 0 to 1.2 % (Table 3), is similar to the intraspecific distances obtained with this same DNA fragment for other species of the family Phytoseiidae (belonging to both sub-families Amblyseiinae and Typhlodrominae) (Tixier *et al.* 2006a, Kanouh *et al.* 2010).

Table 3. Mean, standard error (SE), minimal and maximal values of the K2-P genetic distances among the specimens of *T.(T.) pyri* (intraspecific), among the specimens of the two groups emphasized by mtDNA markers (intragroup), between the specimens belonging to these latter two groups (intergroup) and between *T. (T.) pyri* and the related species *T.(T.) exhilaratus* (interspecific) for the 12S rDNA, Cytb mtDNA, COI mtDNA and ITS fragment

| | | 12S rRNA | Cytb mtDNA | COI mtDNA | ITS |
|---|--------------|-------------|---------------|--------------|-----------|
| Intraspecific genetic distances | Mean (SE) | 2.2 (1.7) | 5.1 (3.2) | 6.1 (4.2) | 0.8 (0.4) |
| | Min-Max | 0-4.7 | 0-10.3 | 0-11.3 | 0-1.2 |
| Intragroup genetic distances | Mean (SE) | 0.6 (0.7) | 3.7 (2.1) | 1.5 (1.2) | - |
| | Min-Max | 0-1.9 | 0-7.2 | 0-3.9 | - |
| Intergroup (1) and (2) genetic distances | Mean (SE) | 3.9 (0.3) | 7.97 (1.43) | 9.4 (1.8) | - |
| | Min-Max | 3.1-4.7 | 5.6-10.3 | 4.8-11.3 | - |
| Interspecific genetic distances | Mean (SE) | 26.1 (0.3) | 30.96 (1.7) | 23.5 (1.2) | 4.8 (0.1) |
| | Min-Max | 25.5-26.7 | 28.6-33.4 | 21.4-24.9 | 4.4-5.1 |

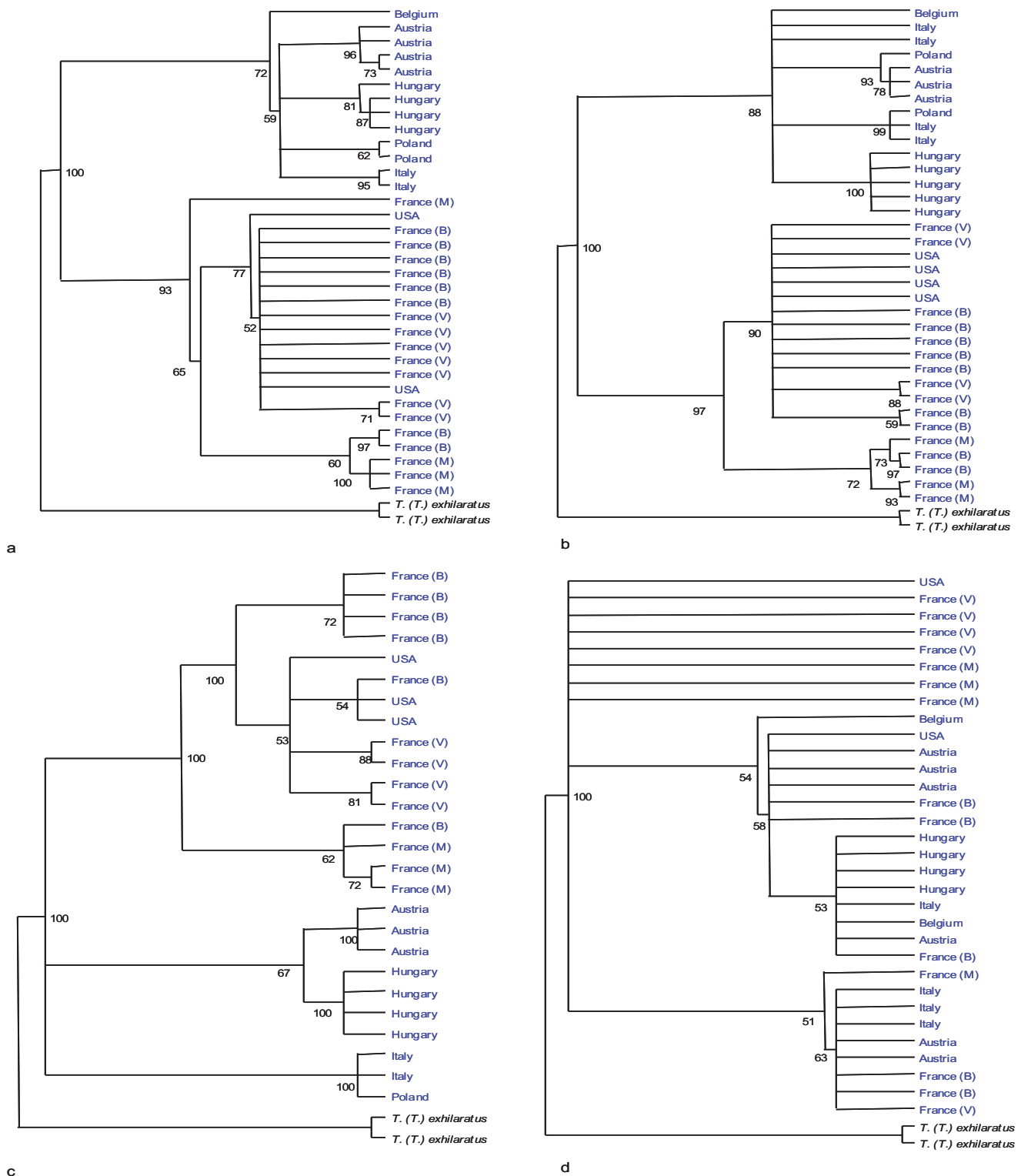


Figure 1. Majority-rule consensus trees obtained after parsimony carried out on the nine populations of *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* and *T. (T.) exhilaratus* as an outgroup with 12S rDNA (a), Cytb mtDNA (b), COI mtDNA (c) and ITS (d) markers (France (M): France Mercantour, France (V): France Valraugue, France (B): France Burgundy).

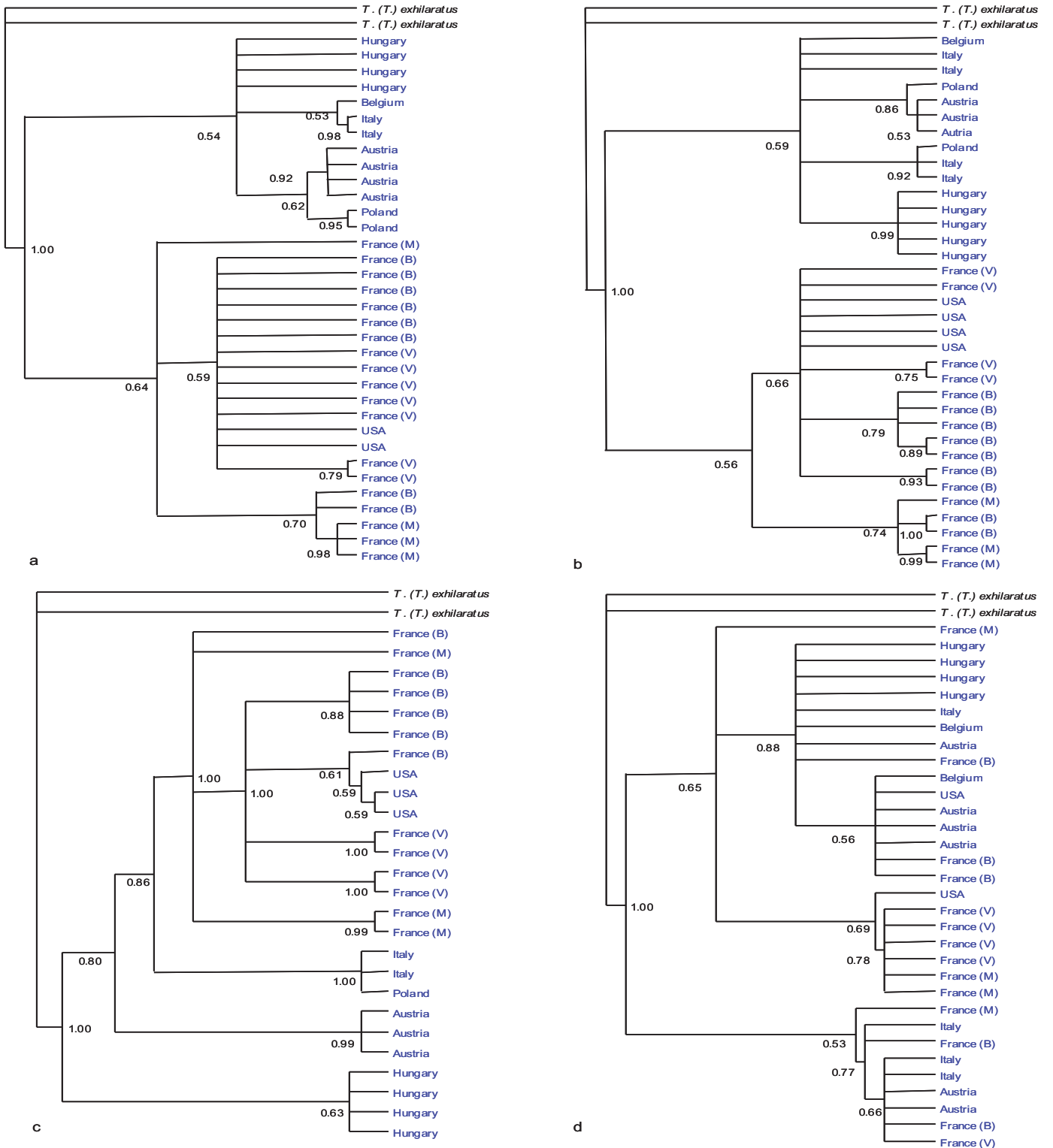


Figure 2. Majority-rule consensus trees obtained after bayesian analysis carried out on the nine populations of *Typhlodromus (Typhlodromus) pyri* and *T. (T.) exhilaratus* as an outgroup with 12S rRNA (a), Cytb mtDNA (b), COI mtDNA (c) and ITS (d) markers (France (M): France Mercantour, France (V): France Valraugue, France (B): France Burgundy).

Morphological analyses

Significant differences are observed in some measurements between the populations considered and between the two population groups. In the former analyses, 20 characters on the 34 considered are significantly different between the populations considered, whereas in the latter one, only four characters significantly differ between the two sub-groups (Table 4). All these differences were very small and the standard errors within the populations were very low. Furthermore, range values (min–max) for all the characters were overlapping between all populations and the two sub-groups considered. On the two axes of the multifactorial analysis (Figure 3) showing 29.98% of the total variation, no separated groups were either observed.

Morphological analyses thus do not support the two groups emphasized by mtDNA analyses. Just like the nuclear DNA fragment, morphological analyses suggest that all the specimens belong the same species.

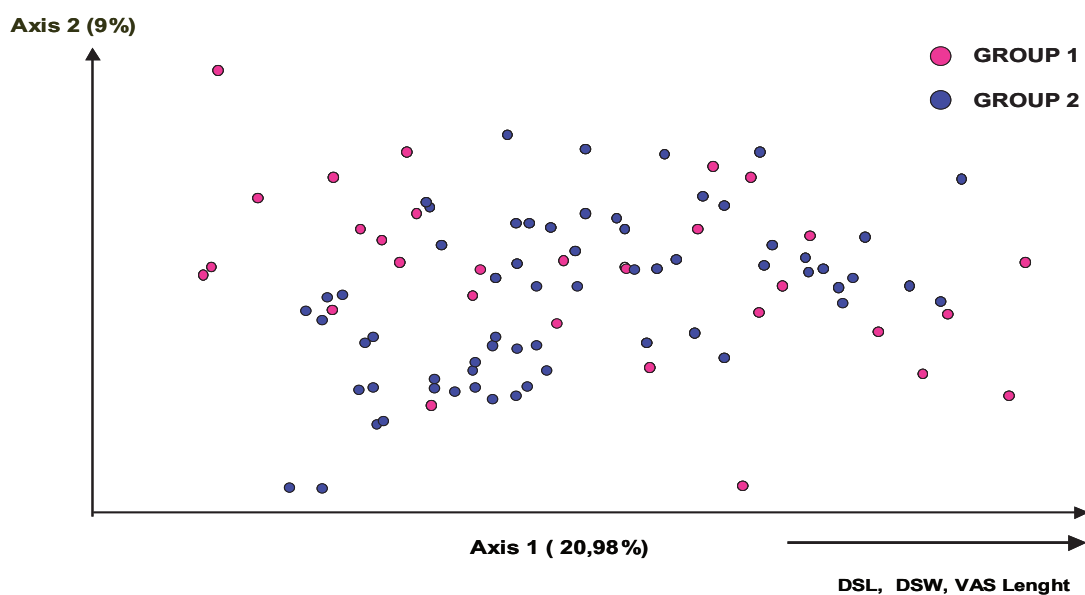


Figure 3. Scatter plots of the first two multifactorial axes for 32 morphological characters of *T.(T.) pyri*. Percents in axes refer to the amount of variation accounted for by the first and second axis in the multifactorial analysis. **Group 1** contains specimens collected from France (Burgundy, Mercantour and Valleraugue) and USA, **group 2** contains specimens collected in Belgium, Austria, Italy, Hungary and Poland.

Table 4. Mean, standard error (SE), coefficient variation (VC %), minimum and maximum values of the 34 characters considered for each population of *T. (T.) pyri* and for each group (1 and 2) emphasized by the mtDNA analysis and ANOVA results (DSL: Dorsal Shield Length, DSW: Dorsal Shield Width, VAS: Dorsal Shield Area):

| | | Austria | Italy | Belgium | Poland | USA | Hungary | France (V) | France (B) | France (M) | P | Min-Max | Group 1 | Group 2 | P | VC (%) |
|-------------------------|-----------|----------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|---------|---------|----------|----------|------|--------|
| DSL | Mean (SE) | 322 (5) | a 303 (14) | bc 325 (11) | a 322 (7) | a 336 (6) | d 311 (8) | ab 311 (0) | ab 315 (12) | ab 294 (11) | c 0.00 | 278-346 | 316 (13) | 314 (19) | 0.60 | 5 |
| | Min-Max | 315-331 | 278-331 | 306-340 | 315-331 | 327-346 | 300-326 | - | 293-333 | 280-307 | | | 278-340 | 280-346 | | |
| DSW | Mean (SE) | 171 (16) | ab 162 (7) | a 172 (5) | ab 168 (6) | ab 180 (5) | b 168 (7) | ab 174 (14) | ab 164 (9) | a 146 (7) | a 0.00 | 133-207 | 168 (9) | 164 (16) | 0.09 | 7 |
| | Min-Max | 158-207 | 151-176 | 162-180 | 157-175 | 172-186 | 155-180 | 164-184 | 154-182 | 133-159 | | | 151-207 | 133-186 | | |
| j1 | Mean (SE) | 19 (3) | a 19 (3) | a 19 (2) | a 21 (3) | a 21 (1) | a 20 (3) | a 19 (1) | a 20 (2) | a 20 (4) | a 0.72 | 13-31 | 19 (3) | 20 (3) | 0.20 | 13 |
| | Min-Max | 15-23 | 13-22 | 15-22 | 17-23 | 19-23 | 15-24 | 18-20 | 17-24 | 17-31 | | | 13-24 | 17-31 | | |
| j3 | Mean (SE) | 28 (2) | a 26 (4) | a 28 (4) | a 28 (3) | a 27 (2) | a 26 (3) | a 23 (4) | a 26 (3) | a 27 (2) | a 0.29 | 19-32 | 27 (3) | 26 (3) | 0.27 | 11 |
| | Min-Max | 24-30 | 21-31 | 24-31 | 23-31 | 23-30 | 20-32 | 19-27 | 22-31 | 22-29 | | | 20-32 | 19-31 | | |
| j4 | Mean (SE) | 19 (2) | b 16 (2) | a 16 (1) | a 17 (1) | ab 16 (2) | ab 18 (2) | ab 17 (1) | ab 16 (2) | a 17 (2) | ab 0.00 | 13-22 | 17 (2) | 16 (2) | 0.14 | 11 |
| | Min-Max | 16-21 | 13-21 | 13-18 | 16-19 | 13-20 | 15-22 | 16-18 | 13-18 | 15-20 | | | 13-22 | 13-20 | | |
| j5 | Mean (SE) | 19 (1) | b 16 (2) | a 16 (1) | ab 18 (2) | ab 18 (2) | ab 17 (2) | ab 16 (2) | ab 16 (2) | ab 17 (2) | ab 0.05 | 13-21 | 17 (2) | 17 (2) | 0.43 | 11 |
| | Min-Max | 17-21 | 13-20 | 15-18 | 15-20 | 16-20 | 15-21 | 14-17 | 14-18 | 15-19 | | | 13-21 | 14-20 | | |
| j6 | Mean (SE) | 21 (4) | a 17 (1) | b 18 (1) | ab 21 (2) | a 20 (2) | ab 19 (1) | ab 18 (2) | ab 17 (3) | ab 19 (2) | ab 0.00 | 14-28 | 19 (2) | 18 (2) | 0.82 | 13 |
| | Min-Max | 17-28 | 16-18 | 16-19 | 18-24 | 17-23 | 18-20 | 17-20 | 14-21 | 16-22 | | | 16-28 | 14-23 | | |
| J2 | Mean (SE) | 25 (2) | a 23 (2) | a 23 (1) | a 24 (3) | a 23 (2) | a 23 (2) | a 24 (0) | a 23 (3) | a 24 (2) | a 0.40 | 19-29 | 23 (2) | 23 (2) | 0.83 | 9 |
| | Min-Max | 22-27 | 20-25 | 21-25 | 20-29 | 20-25 | 20-25 | - | 19-26 | 20-27 | | | 20-29 | 19-27 | | |
| J5 | Mean (SE) | 6 (1) | a 5 (1) | a 6 (1) | a 7 (1) | a 6 (1) | a 5 (1) | a 6 (0) | a 6 (1) | a 6 (1) | a 0.31 | 4-8 | 6 (1) | 6 (1) | 0.65 | 18 |
| | Min-Max | 4-7 | 4-7 | 4-7 | 5-8 | 4-8 | 4-6 | - | 4-7 | 4-7 | | | 4-8 | 4-8 | | |
| z2 | Mean (SE) | 20 (1) | a 19 (2) | a 18 (1) | a 19 (2) | a 20 (2) | a 18 (3) | a 18 (1) | a 19 (2) | a 19 (3) | a 0.22 | 13-26 | 19 (2) | 19 (2) | 0.34 | 10 |
| | Min-Max | 18-21 | 16-21 | 16-21 | 16-20 | 18-23 | 13-22 | 17-19 | 16-23 | 15-26 | | | 13-22 | 15-26 | | |
| z3 | Mean (SE) | 25 (3) | a 24 (3) | a 26 (1) | a 26 (3) | a 25 (3) | a 26 (3) | a 27 (1) | a 27 (4) | a 25 (2) | a 0.23 | 20-36 | 26 (2) | 26 (3) | 0.63 | 11 |
| | Min-Max | 21-29 | 21-29 | 24-27 | 21-30 | 21-29 | 20-30 | 27-28 | 24-36 | 23-28 | | | 20-30 | 21-36 | | |
| z4 | Mean (SE) | 26 (2) | ab 23 (3) | a 24 (3) | a 28 (1) | b 26 (2) | ab 26 (2) | ab 25 (2) | ab 27 (3) | ab 26 (3) | ab 0.03 | 15-34 | 25 (3) | 26 (3) | 0.21 | 11 |
| | Min-Max | 23-29 | 20-28 | 15-27 | 27-29 | 23-28 | 24-31 | 23-26 | 23-31 | 22-34 | | | 15-31 | 22-34 | | |
| z5 | Mean (SE) | 18 (1) | a 17 (1) | a 17 (2) | a 18 (2) | a 19 (1) | a 18 (1) | a 17 (2) | a 17 (1) | a 17 (1) | a 0.02 | 14-21 | 17 (2) | 18 (2) | 0.81 | 9 |
| | Min-Max | 15-19 | 16-20 | 14-20 | 15-20 | 17-21 | 16-20 | 16-19 | 15-19 | 15-19 | | | 14-20 | 15-21 | | |
| s4 | Mean (SE) | 30 (2) | a 30 (3) | a 31 (3) | a 30 (2) | a 28 (2) | a 29 (3) | a 30 (1) | a 29 (2) | a 28 (3) | a 0.31 | 23-39 | 30 (3) | 29 (2) | 0.01 | 9 |
| | Min-Max | 27-33 | 27-38 | 28-39 | 28-33 | 26-31 | 23-35 | 29-30 | 25-32 | 23-32 | | | 23-32 | 23-32 | | |
| s6 | Mean (SE) | 34 (2) | a 30 (3) | a 32 (2) | a 35 (4) | b 35 (2) | ab 32 (3) | a 34 (1) | ab 32 (4) | a 32 (2) | a 0.00 | 26-39 | 32 (3) | 33 (3) | 0.53 | 9 |
| | Min-Max | 31-38 | 26-37 | 29-35 | 29-39 | 32-39 | 26-36 | 34-35 | 27-36 | 29-34 | | | 26-39 | 27-39 | | |
| S2 | Mean (SE) | 37 (2) | a 35 (3) | a 35 (2) | a 40 (4) | b 37 (2) | ab 37 (1) | a 38 (2) | ab 36 (2) | a 34 (2) | a 0.00 | 31-49 | 36 (3) | 36 (2) | 0.49 | 8 |
| | Min-Max | 32-39 | 31-40 | 32-38 | 36-49 | 34-41 | 35-39 | 36-40 | 32-39 | 31-37 | | | 31-49 | 31-41 | | |
| S4 | Mean (SE) | 37 (4) | a 35 (3) | a 36 (2) | a 39 (2) | b 36 (3) | ab 35 (2) | a 37 (2) | ab 38 (2) | a 33 (2) | a 0.00 | 29-44 | 36 (3) | 36 (3) | 0.35 | 8 |
| | Min-Max | 32-44 | 32-41 | 33-40 | 36-44 | 31-41 | 33-39 | 35-38 | 36-40 | 29-36 | | | 32-44 | 29-41 | | |
| Z4 | Mean (SE) | 39 (2) | a 40 (2) | a 39 (2) | a 42 (4) | a 41 (4) | a 39 (2) | a 40 (3) | a 40 (2) | a 40 (3) | a 0.07 | 34-47 | 40 (3) | 40 (3) | 0.28 | 7 |
| | Min-Max | 36-42 | 36-43 | 35-41 | 34-47 | 37-46 | 36-42 | 38-43 | 37-43 | 36-46 | | | 34-47 | 36-46 | | |
| Z5 | Mean (SE) | 58 (4) | a 58 (3) | a 59 (2) | a 63 (2) | b 60 (3) | ab 58 (3) | a 63 (1) | b 60 (4) | ab 56 (2) | a 0.00 | 51-67 | 59 (4) | 59 (4) | 0.76 | 6 |
| | Min-Max | 51-63 | 55-63 | 56-63 | 60-67 | 56-64 | 53-63 | 63-64 | 53-64 | 53-60 | | | 51-67 | 53-64 | | |
| r3 | Mean (SE) | 27 (2) | ab 25 (2) | ab 25 (2) | ab 28 (2) | b 26 (2) | ab 24 (2) | a 26 (2) | ab 26 (2) | ab 26 (2) | ab 0.00 | 21-31 | 26 (2) | 26 (2) | 0.24 | 9 |
| | Min-Max | 23-29 | 21-28 | 21-28 | 23-31 | 24-30 | 21-26 | 25-28 | 23-29 | 21-28 | | | 21-31 | 21-30 | | |
| R1 | Mean (SE) | 22 (2) | a 21 (2) | a 20 (2) | a 22 (3) | a 23 (2) | a 20 (2) | a 20 (1) | a 21 (2) | a 21 (2) | a 0.35 | 16-26 | 21 (2) | 22 (2) | 0.24 | 10 |
| | Min-Max | 20-25 | 17-24 | 17-23 | 18-26 | 21-25 | 16-21 | 20-21 | 18-25 | 18-25 | | | 16-26 | 18-25 | | |
| st1-st1 | Mean (SE) | 51 (2) | a 51 (3) | a 52 (2) | a 51 (2) | a 52 (3) | a 51 (2) | a 51 (1) | a 51 (1) | a 49 (1) | a 0.03 | 45-57 | 51 (2) | 51 (2) | 0.47 | 5 |
| | Min-Max | 48-53 | 47-57 | 49-55 | 47-54 | 45-56 | 47-55 | 50-52 | 48-53 | 48-51 | | | 47-57 | 45-56 | | |
| st2-st2 | Mean (SE) | 56 (3) | a 55 (3) | a 56 (3) | a 57 (2) | a 57 (3) | a 57 (1) | a 52 (3) | b 56 (2) | a 56 (2) | ab 0.03 | 50-60 | 56 (2) | 56 (3) | 0.29 | 4 |
| | Min-Max | 51-59 | 50-60 | 52-60 | 54-60 | 53-60 | 55-59 | 50-55 | 54-59 | 52-58 | | | 50-60 | 50-60 | | |
| st3-st3 | Mean (SE) | 67 (1) | ab 65 (3) | a 67 (4) | ab 66 (3) | ab 69 (3) | b 64 (3) | a 63 (1) | a 67 (3) | ab 63 (3) | a 0.00 | 57-77 | 66 (2) | 66 (4) | 0.80 | 5 |
| | Min-Max | 65-69 | 60-69 | 62-77 | 62-69 | 66-74 | 59-69 | 62-64 | 63-72 | 57-67 | | | 59-77 | 57-74 | | |
| st1-st3 | Mean (SE) | 62 (2) | a 62 (2) | a 63 (2) | ab 63 (3) | ab 62 (2) | a 65 (1) | b 62 (1) | a 62 (2) | a 61 (1) | a 0.00 | 58-68 | 63 (2) | 62 (2) | 0.00 | 3 |
| | Min-Max | 60-65 | 60-66 | 60-67 | 61-68 | 58-64 | 63-67 | 61-63 | 60-64 | 59-62 | | | 60-68 | 58-64 | | |
| st4-st4 | Mean (SE) | 71 (4) | bcd 67 (7) | abc 70 (7) | abc 74 (6) | cd 78 (2) | d 63 (2) | a 65 (3) | ab 74 (8) | cd 64 (3) | ab 0.00 | 58-92 | 68 (6) | 71 (8) | 0.10 | 10 |
| | Min-Max | 66-78 | 59-80 | 60-81 | 64-84 | 74-81 | 60-67 | 62-67 | 63-92 | 58-68 | | | 59-84 | 58-92 | | |
| st5-st5 | Mean (SE) | 51 (1) | ab 51 (4) | ab 51 (2) | ab 54 (1) | b 58 (3) | c 52 (2) | ab 58 (1) | c 53 (2) | ab 49 (2) | a 0.00 | 45-60 | 52 (3) | 54 (4) | 0.02 | 7 |
| | Min-Max | 49-53 | 45-57 | 48-54 | 53-56 | 53-60 | 49-56 | 57-59 | 50-58 | 46-52 | | | 45-57 | 46-60 | | |
| st2-st3 | Mean (SE) | 29 (2) | a 30 (2) | a 30 (2) | a 30 (2) | a 29 (2) | a 30 (2) | a 30 (3) | a 29 (2) | a 28 (2) | a 0.00 | 25-36 | 30 (2) | 29 (2) | 0.01 | 7 |
| | Min-Max | 26-32 | 28-33 | 28-36 | 27-32 | 26-32 | 26-33 | 27-32 | 26-31 | 25-30 | | | 26-36 | 25-32 | | |
| VAS length | Mean (SE) | 99 (2) | a 100 (4) | a 103 (3) | ab 103 (4) | ab 108 (5) | b 100 (4) | a 105 (3) | ab 103 (4) | ab 91 (4) | c 0.00 | 80-113 | 101 (4) | 101 (8) | 0.87 | 6 |
| | Min-Max | 97-101 | 89-105 | 97-108 | 99-112 | 100-113 | 95-107 | 102-108 | 99-109 | 80-95 | | | 89-112 | 80-113 | | |
| VAS width (ZV2) | Mean (SE) | 79 (3) | a 82 (4) | ab 83 (4) | ab 83 (3) | ab 89 (3) | c 83 (4) | ab 85 (7) | b 83 (3) | ab 81 (2) | ab 0.00 | 75-96 | 82 (4) | 85 (4) | 0.02 | 5 |
| | Min-Max | 76-83 | 76-88 | 75-89 | 79-87 | 84-96 | 77-90 | 78-91 | 78-88 | 80-85 | | | 75-90 | 78-96 | | |
| VAS width (anus) | Mean (SE) | 68 (3) | ab 67 (5) | a 67 (3) | ab 64 (3) | a 77 (3) | b 67 (4) | a 70 (7) | ab 69 (5) | ab 63 (3) | a 0.00 | 57-82 | 67 (4) | 69 (7) | 0.14 | 8 |
| | Min-Max | 65-72 | 60-78 | 62-71 | 58-69 | 71-82 | 60-73 | 62-76 | 63-79 | 57-66 | | | 58-78 | 57-82 | | |
| ZV1 | Mean (SE) | 18 (1) | a 18 (1) | a 18 (3) | a 14 (0) | a 20 (2) | a 18 (1) | a - | a 18 (1) | a 17 (2) | a 1.00 | 13-21 | 18 (2) | 18 (2) | 0.72 | 10 |
| | Min-Max | 17-19 | 16-19 | 13-21 | - | 18-21 | 16-19 | - | 17-20 | 14-20 | | | 13-21 | 14-21 | | |
| JV5 | Mean (SE) | 45 (2) | abc 42 (2) | a 43 (3) | a 49 (4) | c 44 (4) | abc 44 (2) | abc 48 (4) | bc 45 (4) | abc 44 (2) | ab 0.00 | 37-51 | 44 (3) | 45 (4) | 0.48 | 8 |
| | Min-Max | 42-48 | 39-45 | 37-49 | 40-51 | 37-49 | 42-48 | 43-51 | 39-51 | 39-46 | | | 37-51 | 37-51 | | |
| STIV | Mean (SE) | 33 (2) | a 37 (4) | a 31 (4) | a 37 (2) | a 36 (1) | a 32 (3) | a 35 (2) | a 34 (4) | a 36 (3) | a 0.05 | 28-41 | 34 (3) | 35 (3) | 0.36 | 9 |
| | Min-Max | 32-35 | 33-41 | 29-36 | 35-39 | 35-37 | 28-36 | 34-37 | 30-40 | 33-39 | | | 28-41 | 30-40 | | |

Cross experiments

Eggs were laid for all the couples in the control and inter-group crosses (Table 5). A total reproductive compatibility was thus observed between populations collected in France and Austria. The fecundity rates observed for all these crosses were not significantly different ($F_{(2,36)} = 1.76$; $P = 0.13$). The values of sex ratio were normal and similar for all the crosses performed. In backcrosses, total reproduction compatibility, normal sex ratio and similar fecundity as in the parental crosses were observed (Table 5). The specimens included in the two sub-groups belong thus to the same species.

Table 5. Results of crosses and backcrosses between two populations of mites from France (Burgundy) (Group 1) and Austria (Group 2) identified as *T. (T.) pyri* collected on *Vitis vinifera*.

| Crosses and backcrosses | Number of couples | % ovipositing females | Time of préoviposition (days) | Mean number of eggs /female / day (SE) | Mean sex-ratio (% females) |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|--|----------------------------|
| Group1 x Group1 | 11 | 100 | 5 | 1.22 (0.41) | 63 |
| Group2 x Group2 | 12 | 91.6 | 4.73 | 1.22 (0.36) | 65 |
| Group1 x Group2 | 17 | 88 | 4.54 | 1.27 (0.50) | 61 |
| Group2 x Group1 | 12 | 91.6 | 3.53 | 1.31 (0.56) | 66 |
| F1 (Group1 x Group2) x Group2 | 10 | 90 | 3.89 | 1.47 (0.66) | 70 |
| F1 (Group2 x Group1) x Group2 | 4 | 100 | 2.3 | 1.83 (0.28) | 54 |

Optimal sample size required to assess morphological and molecular intraspecific variations

The optimal number of *T. (T.) pyri* for accurately characterising the intraspecific morphological variation was estimated at 13 females. This sample size is similar to the one estimated by Tixier *et al.* (2008b) for the species *Neoseiulus californicus* (McGregor) (11 females). Thus, only a few females of *T. (T.) pyri* would be sufficient to characterize the whole variation of the species, suggesting a low intraspecific variability.

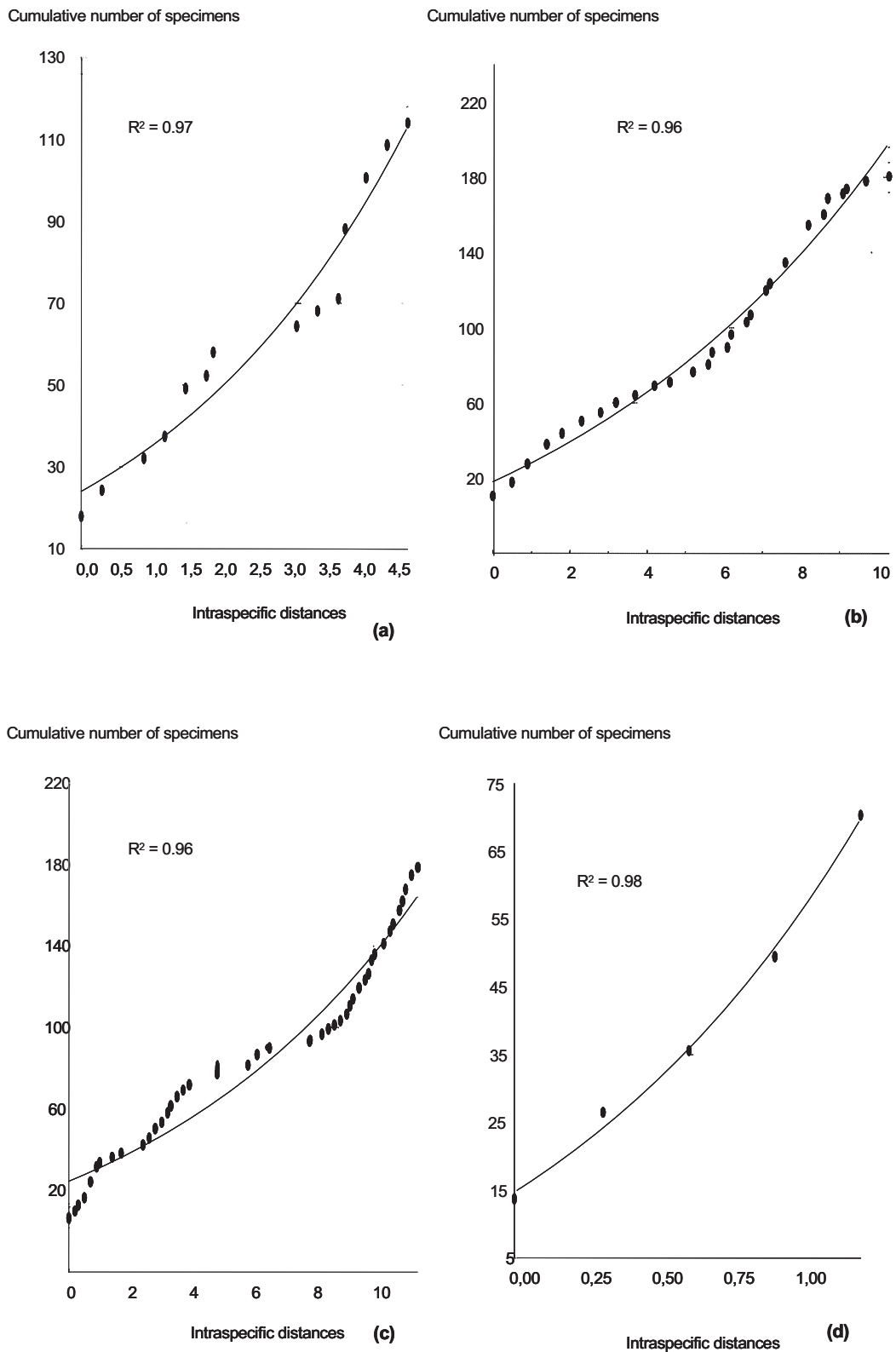


Figure 4. Asymptotic regressions curves plotted the cumulative number of specimens according to the intraspecific distances observed for the 12S rDNA (a), Cytb mtDNA (b), COI mtDNA (c) and ITS (d) fragments considered

Among the ten models tested to assess the optimal sample size to characterize molecular intraspecific variations; the best regression model was the asymptotic regression for all DNA fragments (Figure 4). The number of specimens required for this estimation was of 69 for the Cytb mtDNA, 14 for the 12S rRNA, 33 for the mtCOI and 18 for the ITS nuclear markers. These optimal sample sizes are much higher than the one estimated for morphological characterisation, except for the 12S rRNA and ITS DNA fragments, certainly because of a lower intraspecific variance for these two markers.

Conclusion

The main conclusion is the high mtDNA intraspecific variations, leading to questionnements on the nature of the sub-clades obtained. This is the second time that such a high variation is observed within a Phytoseiidae species (Kanouh *et al.* 2010), both for species of the sub-family Typhlodrominae, whereas for species of the sub-family Amblyseiinae intraspecific variations were much lower. This clearly questions differences in genetic population structuration, history and dynamics between species of these two sub-families. Furthermore, these results underline the unreliability of an universal cut-off threshold for identifying species within the whole family Phytoseiidae using mtDNA: if the results obtained for the Amblyseiinae were only used, two cryptic species would have been falsely defined within *T. (T.) pyri*. On the opposite, the congruence between ITS nuclear marker and morphological characters shows the reliability of this latter nuclear marker for diagnostic. Various authors have already emphasized such differences between nuclear and mt DNA, concluding that results obtained with various genes could lead to different taxonomic assignments (Sota & Vogler 2001; Van Oppen *et al.* 2001; Funk & Omland 2003; Avise 2004; Ting *et al.* 2008; Cenzi *et al.* 2010). For instance, general absence of recombination in mtDNA can lead to the persistence of population structure long after the barriers which created that structure are removed. Furthermore, MtDNA's more rapid lineage sorting can provide information about population-level relationships but not to species level pattern (Rubinoff & Holland 2005; Rubinoff *et al.* 2006). Can we however conclude that the mtDNA fragments are not useful for species diagnostic? The response is clearly no, as no overlapping between the intra and interspecific divergences was

observed for the three mt markers considered. However, this study emphasizes the necessity to use several complementary approaches (integrative taxonomy) to determine which genetic distances correspond to intra and interspecific variations, for avoiding misidentifications (i.e. Valdecasas *et al.* 2008; Padial *et al.* 2010). In the future, more analyses combining several genes as well as morphological approaches will be carried out on more species (especially of the sub-family Typhlodrominae), in order to better determine how to take diagnostic decisions, depending on the characters (molecular or morphological) considered. For this, the number of specimens studied is a key point. In that way, the present study shows that this number was lower for morphological than for molecular approaches, especially for the COI and Cytb mtDNA. It should be noted that these two latter genes are presently the most used in the DNA barcoding approaches and that the number of specimens to be studied is not very often discussed. Clearly, additional studies would thus be required on this latter point.

Acknowledgments

We thank all the scientists that provide the mite populations for this study: Dr Duso for the Italian population, Dr Schausberger for the Austrian population, Dr Danuta Kropczynska for the Poland population, Dr Ripka for the Hungarian population, Professor Croft for the USA population, G. Sentenac for the population France-Burgundy and J. Witters for the Belgium population. Data used in this work were (partly) produced through the technical facilities of the “Montpellier Environnement Biodiversité” Research Federation.

References

- Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates;.
- Bickford, D., Lohman, D., Sodhi, N. S., Ng P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K., Das, I. 2007. Cryptic species: a new window on diversity and conservation. *Trends in Ecology* **22**, 148-155.
- Cenzi, D., Ré F., Loreto E.L.S., Robe L.J. 2010. Gene and species trees reveal mitochondrial and nuclear discordance in the *Drosophila cardini* group (Diptera:

- Drosophilidae) *Inv. Biol.*, first published on line (Doi: 10.1111/j.1744-7410.2010.00207.x)
- Cracraft, J. 2000. *Species concepts in theoretical and applied biology: A systematic debate with consequences*. Pages 3-14 in *Species concepts and phylogenetic theory* (Q. D. Wheeler & R. Meier, eds.), Columbia University Press, New York.
- Drummond, A.J, Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer T., Wilson, A. 2007. Geneious v3.5, available from: <http://www.geneious.com/> (accessed in November 2010).
- Duso, C., Pasqualetto, C. 1993. Factors affecting the potential of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) as biocontrol agents in north-Italian vineyards. *Exp. Appl. Acarol.* **17**, 241–258.
- Farris, J.S, Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**, 315–319.
- Funk, D.J., Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **34**, 397–423.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceed. R. Soc. London B* **270**, 313-321.
- Hebert, P.D.N, Penton, E.H, Burns, J.M, Janzen, D.H, Hallwachs, W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA* **101**, 14812–14817
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, L.Y., Zemlak, T.S., Francis, C.M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PloS Biology* **2**, 10e312.
- Hebert, P.D.N., Gregory, T.R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.* **54**, 852–859.
- Hickerson, M.J., Meyer, C., Moritz, C. 2006. DNA-Barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Syst. Biol.* **55**, 729-739.
- Jeyaprakash, A, Hoy, M.A 2002. Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari:Phytoseiidae). *Biol. Contr.* **25**, 136-142.
- Kanouh, M., Tixier, M.S., Okassa, M., Kreiter, S. 2010. Phylogenetic and biogeographic analysis of the genus *Phytoseiulus* (Acari: Phytoseiidae). *Zool. Scr.* **39**, 450–461.

- Lindquist, E.E., Evans, G.W. 1965. Taxonomic concepts in the Ascidae, with a modified setal nomenclature for the idiosoma of the Gamasina (Acarina: Mesostigmata). *Mem. Entomol. Soc. Can.* **47**, 1-64.
- Maddison, W. P., Maddison, D.R. 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73 <http://mesquiteproject.org> (assessed in november 2010).
- McMurtry, J.A, Croft, B.A 1997. Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Ann. Rev. Entomol.* **42**, 291-321.
- Meier, R. 2008. *DNA sequences in taxonomy: opportunities and challenges*. In: *The New Taxonomy*. Edited by: Wheeler QD. CRC Press, Taylor and Francis Group; 95-127.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., Peter, K.L.N. 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A tale of high Intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.* **55**, 715-728.
- Mora, C., Tittensor, D.P. & Myers, R.A. 2008. The completeness of taxonomic inventories for describing the global diversity and distribution of marine fishes. *Proc. Royal Soc. B.* **275**, 149-155.
- Moraes, G.J., McMurtry, J.A., Denmark, H.A., Campos, C.B. 2004. A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. *Zootaxa* **434**, 1-494.
- Moritz, C., Cicero, C. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol* **2(10)**, e354. (Doi:10.1371/journal.pbio.0020354).
- Okassa, M., Tixier, M.S., Cheval, B., Kreiter, S. 2009. Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). *Can. J. Zool.* **87**, 689-698.
- Okassa, M., Tixier, M.S., Kreiter, S. 2010. Morphological and molecular diagnostic of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari : Phytoseiidae). *Exp. Appl. Acarol.* **52**, 291–303 (Doi: 10.1007/s10493-010-9364-x).
- Padial, J.M., Miralle, A., De la Riva, I., Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.* **7**, 16 (Doi:10.1186/1742-9994-7-16).
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Prendini, L. 2005. Comment on 'Identifying spiders through DNA barcodes'. *Can. J. Zool.* **83**, 498-504.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.

- Rowell, H.J., Chant, D.A., Hansell, R.I.C. 1978. The determination of setal homologies and setal patterns on the dorsal shield in the family Phytoseiidae (Acarina: Mesostigmata). *Can. Entomol.* **110**, 859-876.
- Rubinoff, D., Holland, B.S., 2005. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Syst. Biol.* **54**, 92–961
- Rubinoff, D., Cameron, S., Will, A K. 2006. Genomic Perspective on the Shortcomings of Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification. *J. Hered.* **97**, 581-594.
- Sites, J.W. Jr., Marshall, J.C. 2003. Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends. Ecol. Evol.* **18**, 462-470.
- Sota, T., Vogler, A.P. 2001. Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the carabid beetles *Ohomopterus*. *Syst. Biol.* **50**, 39–59.
- StatSoft France 2008. STATISTICA version 7.1. www.statsoft.fr.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.08b. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tan, D. S.H., Ang, Y., Lim, G. S., Ismail, M. R. B., Meier, R. 2010. From 'cryptic species' to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). *Zool. Scr.* **39**, 51-61.
- Tjorve, E. 2003. Shapes and functions of species–area curves: a review of possible models. *J. Biogeogr.* **30**, 827–835.
- Ting, N., Tosi, A.J., Li, Y; Zhang, Y.P., Disotell, T.R. 2008. Phylogenetic incongruence between nuclear and mitochondrial markers in the Asian colobines and the evolution of the langurs and leaf monkeys *Mol. Phyl. Evol.* **46**, 466-474
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Ferragut, F., Cheval, B. 2006a. The suspected synonymy of *Kampimodromus hmiminai* McMurtry and *K. adrianae* (Acari: Phytoseiidae): morphological and molecular investigations. *Can. J. Zool.* **84**, 1216-1222.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Barbar, Z., Ragusa, S., Cheval, B. 2006b. The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy. *Zool. Scr.* **35**, 115-122.

- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Croft, B.A., Cheval, B. 2008a. *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) from USA: morphological and molecular assessment of its identity. *Bull. Entomol. Res.* **98**, 125-134.
- Tixier, M.-S., Guichou, S., Kreiter, S. 2008b. Morphological variation of the species *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae): importance for diagnostic reliability and synonymies. *Inv. Syst.* **22**, 453–469.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Moraes, G.J. 2008c. Biogeographic distribution of the mites of the family Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata). *Biol. J. Lin. Soc.* **93**, 845-856.
- Tixier, M.S, Ferrero, M., Okassa, M., Guichou, S., Kreiter, S. 2010. On the specific identity of specimens of *Phytoseiulus longipes* Evans (Mesostigmata: Phytoseiidae) showing different feeding behaviours: morphological and molecular analyses. *Bull. Entomol. Res.* **17**,1-11.
- Valdecasas, A.G., Williams, D., Wheeler, Q.D. 2008. Integrative taxonomy' then and now: a response to Dayrat (2005). *Biol. J. Lin. Soc.* **93**, 211–216.
- Van Oppen, M.J.H., McDonald, B.J., Willis, B., Miller, D.J. 2001. The Evolutionary History of the Coral Genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) Based on a Mitochondrial and a Nuclear Marker: Reticulation, Incomplete Lineage Sorting, or Morphological Convergence? *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1315-1329.
- Wiens, J.J., Servedio, M.R. 2000. Species delimitation in systematics: Inferring diagnostic differences between species. *Proc. R. Soc. London B* **267**, 631-636.
- Will, K.W., Mishler, B.D., Wheeler, Q.D 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Syst. Biol.* **54**, 844-851.

CHAPITRE IV. PARTIE D. AUTRES ESPECES D'INTERETS AGRONOMIQUES ET RESULTATS PRELIMINAIRES

Plusieurs études préliminaires sur d'autres espèces d'intérêts agronomiques ont été réalisées afin de déterminer si « l'approche » Barcoding pouvait être généralisée à d'autres espèces de Phytoseiidae.

Plusieurs études préliminaires sur d'autres espèces d'intérêts agronomiques ont été réalisées afin de déterminer si « l'approche » Barcoding pouvait être généralisée à d'autres espèces de Phytoseiidae.

IV.D.1. Délimiter deux espèces du même genre : exemple de *Kampimodromus aberrans* (Oudemans) et *Kampimodromus corylosus* Kolodochka

IV.D.1.1. Position taxonomique et caractères morphologiques utilisés pour différencier ces deux espèces.

Kampimodromus aberrans et *K. corylosus* appartiennent à la tribu des Kampimodromini et au genre *Kampimodromus* Nesbitt.

Kampimodromus aberrans a été décrite par Oudemans en 1930 à partir de spécimens collectés sur *Tilia* sp. au Pays-Bas. *Kampimodromus corylosus* a été décrite par Kolodochka en 2003 à partir de spécimens collectés sur *Corylus avellana* (L.) en Ukraine

La clé d'identification du genre *Kampimodromus* proposée par Tixier *et al.* (2008a) indique que ces deux espèces se distinguent par le nombre de solénostomes sur le bouclier dorsal et le nombre de dents sur le mors mobile des chélicères. *Kampimodromus aberrans* possède quatre solénostomes et une dent sur le mors mobile alors que *K. corylosus* possède cinq solénostomes et aucune dent sur le mors mobile de la chélicère. Ces deux caractères sont considérés comme discriminants pour délimiter les espèces de ce genre par plusieurs auteurs (Ragusa et Tsolakis, 1994 ; Tixier *et al.*, 2008a).

IV.D.1.2. Distribution géographique

Kampimodromus aberrans est une espèce principalement rencontrée dans la région **Paléarctique** notamment en **France** (Mathys 1956, 1958 ; Gunthart 1957, 1960 ; Rambier 1958, 1974 ; Fauvel *et al.*, 1975 ; Athias-Henriot 1977, 1978 ; Gutierrez *et al.*, 1989 ; Kreiter *et al.*, 2000 ; Tixier *et al.*, 2000a,b) et en **Italie** (Nucifora et Inserra, 1967 ; Ivancich-Gambaro, 1972, 1973 ; Ragusa et Swirski, 1976 ; Viggiani *et al.*, 1983 ; Castagnoli et Liguori, 1986, 1987 ; Liguori, 1987 ; Vacante et Nucifora, 1987 ; Corino, 1989 ; Corino et Duverney, 1990 ; Duso et Sbrissa, 1990 ; Ragusa et Ciulla, 1991 ; Coiutti, 1993 ; Duso *et al.*, 1993a ; Michelatti *et al.*, 1994 ; Ragusa et Tsolakis, 1994 ; Nicotina et Cioffi, 1998, 1999, 2000). Cette espèce est également signalée de la région éthiopienne en Afrique du Sud (Ueckermann et Loots, 1985).

Kampimodromus corylosus a été signalée dans la région **Paléarctique** notamment en Ukraine et en France (Kolodochka, 2003 ; Tixier *et al.*, 2008a). Il semble qu'elle ait été introduite dans la région **Néarctique**, aux Etats unis (Tixier *et al.*, 2008a). Ces individus signalés des USA avaient été préalablement identifiés comme *K. aberrans* (Krantz, 1973 ; Moraes *et al.*, 2004) et Tixier *et al.* (2008a) ont montré qu'il s'agissait en fait de *K. aberrans*. Cet exemple montre bien les difficultés d'identification de ces deux espèces malgré tout morphologiquement proches.

IV.D.1.3. Importance de ces espèces en lutte biologique

Kampimodromus aberrans est la seule espèce du genre *Kampimodromus*, qui comprend 17 espèces décrites (Moraes *et al.*, 2004, Chant et McMurtry, 2007b, Tixier *et al.*, 2008a), à être utilisée dans des programmes de lutte biologique. Cette espèce est utilisée dans des stratégies de lutte par « conservation de la biodiversité » et par « introductions inoculatives » (McMurtry et Croft, 1997)). Elle est présente aussi bien dans les zones cultivées que dans la végétation naturelle. Sa dispersion depuis les abords non cultivés vers les parcelles notamment de vigne et de pommier a été étudiée (Fauvel et cotton, 1981 ; Tsolakis *et al.*, 1997 ; Tixier *et al.*, 1998, 2000b; Kreiter *et al.*, 2006).

Kampimodromus aberrans est capable de réduire les pullulations de *Eotetranychus carpini* dans les cultures de vignes du Sud-est de la France et dans le sud de l'Europe (Duso *et al.*, 1991 ; Barret et Kreiter, 1992 ; Duso, 1992 ; Camporese et Duso, 1996 ; Kreiter *et al.*, 2000)

IV.D.1.4. Etudes réalisées

IV.D.1.4.1. Matériel et méthodes

Sept populations de *K. aberrans* et deux populations de *K. corylosus* originaires de la région Paléarctique ont été étudiées. Les populations de *K. aberrans* sont originaires de France-Montpellier, France-Pouzolles, France-Marsillargues, Autriche, Croatie, Pologne et Italie. Les deux populations de *K. corylosus* sont originaires de France-Montpellier et France-Mercantour. Les variations intra- et interspécifiques ont été caractérisées avec les marqueurs 12S ARNr et Cytb. Nous avons analysé : quarante-huit spécimens de *K. aberrans* et quatre spécimens de *K. corylosus* avec le marqueur 12S ARNr ; vingt-huit spécimens de *K. aberrans* et trois spécimens de *K. corylosus* avec le marqueur Cytb. Les protocoles d'extraction d'ADN, d'amplification, de séquençage ainsi que les analyses réalisées sont identiques à celles reportées dans le chapitre II.B.

IV.D.1.4.2. Résultats et discussion

Avec le marqueur 12S ARNr, l'étendue de la variation génétique (moyenne \pm Ecart-type) intraspécifique est de $0,6 \pm 0,5$ % pour *K. aberrans* et de $0,07 \pm 0$ % pour *K. corylosus*. La moyenne des distances génétiques interspécifiques est de $17,9 \pm 0,7$ %.

Avec le marqueur Cytb, l'étendue de la variation génétique intraspécifique est de $1,1 \pm 1,2$ % pour *K. aberrans* et de $0,4 \pm 0,4$ % pour *K. corylosus*. La moyenne des distances génétiques interspécifiques est de $37,9 \pm 0,7$ %.

Les deux espèces étudiées ont été clairement délimitées avec les deux marqueurs mitochondriaux utilisés, avec une absence de chevauchement entre la variation intra et interspécifique. Avec le marqueur Cytb, l'étendue de la variation intraspécifique est légèrement plus élevée qu'avec le marqueur 12S ARNr. Les distances interspécifiques sont quant à elles largement plus grandes avec le marqueur Cytb qu'avec le marqueur 12S, mettant en évidence une distinction plus facile des deux espèces considérées avec le marqueur Cytb (« gap » plus important).

IV.D.2. Délimiter deux espèces du même genre : exemple de *Amblyseius swirskii* Athias- Henriot et *Amblyseius andersoni* (Chant)

IV.D.2.1. Position taxonomique et caractères morphologiques utilisés pour identifier ces deux espèces

Amblyseius swirskii et *A. andersoni* appartiennent à la tribu des *Amblyseiini* Muma et au genre *Amblyseius* Berlese

Amblyseius swirskii a été décrite à partir de spécimens collectés sur *Prunus amygdalus* (Mill.) par Athias-Henriot en 1962 en Algérie. Quant à *A. andersoni* elle a été décrite à partir de spécimens collectés sur *Prunus* sp. par Chant en 1957 au Canada.

Ces deux espèces sont morphologiquement très proches et se distinguent par des variations au niveau des longueurs de soies.

IV.D.2.2. Distribution géographique

Amblyseius swirskii est une espèce présente dans la région **Paléarctique** (Moraes *et al.*, 2004).

Amblyseius andersoni est une espèce présente principalement dans la région **Paléarctique** mais aussi dans la région **Néarctique** (Moraes *et al.*, 2004).

IV.D.2.3. Importance de ces espèces en lutte biologique

Amblyseius swirskii est une espèce commercialisée utilisée dans des stratégies de lutte biologique par augmentation (McMurtry et Croft, 1997). Elle est actuellement utilisée pour lutter contre certaines espèces d'insectes comme *Bemisia tabaci* (Gennadius), *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) et *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Messelink *et al.*, 2006, 2008). Dans les cultures de *Capsicum annuum* (L.) du Sud-est de l'Espagne, *A. swirskii* est également utilisée pour lutter contre l'acarien *Polyphagotarsonemus latus* (Banks).

Amblyseius andersoni est une espèce commercialisée utilisée dans des stratégies de lutte par conservation et augmentation (McMurtry et Croft, 1997). Elle permet de réduire les pullulations des espèces du genre *Panonychus* (Koch) sur des cultures d'arbres fruitiers et dans les vignobles, en Europe et en Amérique du Nord

(Duso, 1992). Elle permet aussi de lutter contre *Thrips tabaci* (Lindeman) sur les cultures de *Allium porrum* (L.).

IV.D.2.4. Etudes réalisées

IV.D.2.4.1. Matériel et méthodes

Trois populations de *A. andersoni* originaires de la région Paléarctique et une population de *A. swirskii* ont été étudiées. Deux populations de *A. andersoni* sont d'origine naturelle et ont été collectées en France et en Pologne ; la troisième est issue des élevages de masse de la société Syngenta Bioline. La seule population de *A. swirskii* étudiée est également issue des élevages de masse de la société Syngenta Bioline. Les variations intra et interspécifiques de ces deux espèces ont été caractérisées avec les marqueurs 12S ARNr, Cytb et ITS.

Nous avons analysé douze spécimens de *A. andersoni* et cinq spécimens de *A. swirskii* avec le marqueur 12S ARNr, huit spécimens de *A. andersoni* et cinq spécimens de *A. swirskii* avec le marqueur Cytb, six spécimens de *A. andersoni* et quatre spécimens de *A. swirskii* avec le marqueur nucléaire ITS. Les protocoles d'extraction d'ADN, d'amplification, de séquençage ainsi que les analyses réalisées sont identiques à ceux décrits dans le chapitre II.B.

IV.D.2.4.2. Résultats et discussion

Avec le marqueur 12S ARNr, l'étendue de la variation intraspécifique est de $0,3 \pm 0$ % pour *A. swirskii* et de $0,1 \pm 0,1$ % pour *A. andersoni*. La moyenne des distances génétiques interspécifiques est de $21,6 \pm 0,2$ %.

Avec le marqueur Cytb, l'étendue de la variation génétique intraspécifique est de 0 ± 0 % pour *A. swirskii* et de $1,2 \pm 0,7$ % pour *A. andersoni*. La moyenne des distances génétiques interspécifiques est de $34,8 \pm 0,6$ %.

Avec le marqueur ITS, l'étendue de la variation intraspécifique est de 0 ± 0 % pour *A. swirskii* et de $0,1 \pm 0,07$ % pour *A. andersoni*. La moyenne des distances génétiques interspécifiques est de $9,2 \pm 0,07$ %.

Aucune incongruence n'est observée entre les résultats obtenus avec les deux marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb) et le marqueur nucléaire (ITS). Les

deux entités sont clairement bien séparées avec une absence de chevauchement entre distances intra- et interspécifiques.

IV.D.3. Délimiter quatre espèces du même genre : *E. stipulatus*, *E. gallicus*, *E. finlandicus* et *Euseius ovalis* (Evans)

Cette étude porte sur la capacité du barcode moléculaire à délimiter quatre espèces du genre *Euseius* : *E. stipulatus*, *E. gallicus*, *E. finlandicus* et *E. ovalis*.

La position taxonomique et la distribution géographique de *E. stipulatus* et de *E. gallicus* sont indiquées dans la partie A de ce chapitre. Quelques caractéristiques générales de *Euseius finlandicus* Oudemans et *Euseius ovalis* Evans sont abordées dans la suite de ce paragraphe.

IV.D.3.1. Position taxonomique de *E. ovalis* et *E. finlandicus* et caractères morphologiques utilisés pour identifier les quatre espèces du genre *Euseius* étudiées

Ces deux espèces appartiennent à la tribu des Euseiini et au genre *Euseius*.

Euseius ovalis a été décrite à partir de spécimens collectés sur *Ficus elastica* (Roxb.ex Hornem) en Malaisie par Evans en 1953. *Euseius finlandicus* a été décrite à partir de spécimens collectés sur *Salix Caprea* (L.) en Finlande par Oudemans en 1915.

Comme indiqué dans la partie A de ce chapitre, *E. finlandicus* se distingue de *E. gallicus* et *E. stipulatus* par les longueurs de certaines soies du bouclier dorsal, la forme de la spermathèque et la longueur du péritrème.

Euseius ovalis se distingue des trois autres espèces considérées (*E. finlandicus*, *E. gallicus* et *E. stipulatus*) par les longueurs de soies du bouclier dorsal qui sont très petites et par la forme de la spermathèque.

IV.D.3.2. Distribution géographique

Euseius ovalis est présente dans les régions **Australienne, orientale** et **Néotropicale** (Moraes *et al.*, 2004).

Euseius finlandicus est présente dans la région **Néarctique** et **Paléarctique** (Moraes *et al.*, 2004).

IV.D.3.3. Importance de ces espèces en lutte biologique

Euseius ovalis est une espèce commercialisée qui est utilisée dans des stratégies de lutte par augmentation inoculative. Elle permet de lutter contre *Scirtothrips dorsalis* (Hood), *F. occidentalis* (Messelink *et al.*, 2005,2006) et *B. tabaci* (Borah et Rai, 1989) sur *Cucumis sativus* (L.).

Euseius finlandicus est utilisée dans des stratégies de lutte par conservation (McMurtry et Croft, 1997). Elle est naturellement présente dans des vergers de pommier et permet de lutter contre *P. ulmi* (McMurtry, 1982).

IV.D.3.4. Etudes réalisées

IV.D.3.4.1. Matériel et méthodes

L'étendue des variations intra et interspécifiques a été étudiée avec les trois marqueurs 12S ARNr, Cytb et ITS. Nous avons analysé : treize spécimens de *E. ovalis*, dix-neuf de *E. gallicus*, neuf de *E. stipulatus* et dix huit de *E. finlandicus* avec le marqueur 12S ARNr, neuf spécimens de *E. ovalis*, trois de *E. stipulatus*, deux de *E. gallicus* et un de *E. finlandicus* avec le marqueur Cytb, neuf spécimens de *E. ovalis* et deux de *E. stipulatus* avec le marqueur ITS. Les protocoles d'extraction d'ADN, d'amplification, de séquençage ainsi que les analyses réalisées sont identiques à ceux exposés dans le chapitre II.B.

IV.D.3.4.2. Résultats et discussion

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans le tableau IV.

Les deux marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb) permettent de délimiter clairement les quatre espèces du genre *Euseius*, avec une absence de chevauchement entre les distances intra- et interspécifiques. Bien que les distances génétiques interspécifiques avec le marqueur (ITS) soient plus faibles, ce marqueur permet également de bien séparer *E. stipulatus* de *E. gallicus*.

Tableau IV. Distances intra- et interspécifiques obtenues avec le modèle d'évolution K2P (Kimura 2-parameter) pour les quatre espèces du genre *Euseius* étudiées avec deux marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb) et un marqueur nucléaire (ITS).

| Espèces | 12S ARN r | Cytb | ITS |
|--|--|---|--|
| | Distances génétiques (%) moyenne ± Ecart-type | Distances génétiques(%) moyenne ± Ecart-type | Distances génétiques (%) moyenne ± Ecart-type |
| <i>E. finlandicus</i> | 2 ± 1,1 | - | - |
| <i>E. ovalis</i> | 0,1 ± 0,1 | 0 ± 0 | 0,1 ± 0,08 |
| <i>E. gallicus</i> | 0 ± 0 | 0 | - |
| <i>E. stipulatus</i> | 0 ± 0 | 0,9 ± 0,1 | - |
| <i>E. ovalis</i> / <i>E. gallicus</i> | 19,1 ± 0,1 | 23,3 ± 0 | - |
| <i>E. stipulatus</i> / <i>E. ovalis</i> | 17,8 ± 0 | 31,1 ± 0,5 | 4,3 ± 0 |
| <i>E. stipulatus</i> / <i>E. gallicus</i> | 21,4 ± 0 | 30,4 ± 0,2 | - |
| <i>E. stipulatus</i> / <i>E. finlandicus</i> | 29,1 ± 1,2 | 35,5 ± 0,3 | - |
| <i>E. finlandicus</i> / <i>E. ovalis</i> | 27,8 ± 1,3 | 41 ± 0 | - |
| <i>E. finlandicus</i> / <i>E. gallicus</i> | 27,8 ± 1,2 | 35,3 ± 0 | - |

IV.D.4. Etude de la variation intraspécifique de *Iphiseius degenerans* (Berlese)

IV.D.4.1. Position taxonomique de *I. degenerans*

Iphiseius degenerans a été décrite à partir de spécimens collectés sur des plantes herbacées et des mousses en Italie par Berlese en 1889. Cette espèce appartient à la tribu des *Euseiini* et au genre *Iphiseius* (Berlese) Ce genre est composé de deux espèces *I. degenerans* et *Iphiseius martigellus* El-Badry Cependant, dans la dernière révision mondiale de la famille des Phytoseiidae (Chant et McMurtry, 2007), *I. martigellus* est suspectée d'être un junior synonyme de *I. degenerans*.

Iphiseius degenerans est une espèce présente essentiellement dans la région **Ethiopienne** et dans une moindre mesure de dans la région **Paléarctique** (Moraes *et al.*, 2004).

Elle a été signalée une seule fois dans la région **Néarctique**, au Brésil (Moraes *et al.*, 1993).

IV.D.4.2. Importance de cette espèce en lutte biologique

C'est l'un des acariens prédateurs le plus présent sur les cultures de *Ricinus communis* (L.) dans la région méditerranéenne (Moraes *et al.*, 1986).

Iphiseius degenerans est utilisée dans des stratégies de lutte biologique « par conservation de la biodiversité » ou par introduction inondative (McMurtry et Croft, 1997). Elle est commercialisée et lâchée en serres pour protéger les cultures de *Capsicum annuum* (L.) contre *F. occidentalis* en Allemagne (Ramakers et Voet, 1996). Elle permet également de lutter contre *Scirtothrips citri* (Moulton) dans les vergers de *Citrus* aux USA (Grafton-Cardwel *et al.*, 1997).

IV.D.4.2. 1. Etude réalisée

IV.D.4.2.1.1. Matériel et méthodes

Trois populations de *I. degenerans* ont été étudiées. Une population est originaire d'Italie, l'autre du Kenya et la troisième population est commercialisée par Syngenta Bioline. Nous avons analysé 23 spécimens avec le marqueur 12S ARNr, treize avec le marqueur Cytb et sept avec le marqueur ITS.

Les protocoles d'extraction d'ADN, d'amplification, de séquençage ainsi que les analyses réalisées sont identiques à ceux exposés dans le chapitre II.2B.

IV.D.4.2.1.2. Résultats et discussion

Avec les trois marqueurs utilisés l'étendue de la variation intraspécifique est de **1,8 ± 1,51%** (12S ARNr), **2,9 ± 2,1%** (Cytb) et **0 ± 0%** (ITS).

L'étendue de la variation intraspécifique la plus faible a été observée pour le marqueur ITS et la plus élevée pour le marqueur Cytb. L'ensemble des distances intraspécifiques obtenues avec les marqueurs mitochondriaux sont légèrement plus élevées que celles obtenues pour d'autres espèces de la sous-famille des Amblyseiinae. Les variations interspécifiques à l'intérieur du genre *Iphiseius* n'ont pas été étudiées car nous n'avons pas pu obtenir l'autre et unique espèce de ce dernier genre : *I. martigellus*. En effet, elle a été signalée qu'une seule fois du Soudan lors de sa description. Pour caractériser la variation interspécifique de *I. degenerans* avec une autre espèce, nous avons choisi les espèces du genre *Euseius* car les genres *Euseius* et *Iphiseius* appartiennent à la même tribu et sont morphologiquement proches.

L'étude des distances interspécifiques entre *I. degenerans* et les quatre espèces du genre *Euseius* étudiées précédemment est abordée dans le paragraphe suivant.

IV.D.5. Variations interspécifiques exemple de *I. degenerans* et d'autres espèces proches du genre *Euseius*

La variation interspécifique a été étudiée avec les marqueurs 12S ARNr, Cytb et ITS sur l'ensemble des spécimens de *I. degenerans* et des quatre espèces du genre *Euseius* présentées dans le paragraphe E3 et E4 de ce chapitre.

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans le tableau V .

Tableau V. Distances interspécifiques entre *I. degenerans* et quatre espèces du genre *Euseius* avec deux marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb) et un marqueur nucléaire (ITS).

| Espèces | 12s ARN r | Cytb | ITS |
|--|--|--|--|
| | Distances génétiques (%) moyenne ± Ecart-type | Distances génétiques (%) moyenne ± Ecart-type | Distances génétiques (%) moyenne ± Ecart-type |
| <i>I. degenerans</i> / <i>E. finlandicus</i> | 27 ± 2,3 | 44 ± 1,4 | - |
| <i>I. degenerans</i> / <i>E. ovalis</i> | 28,4 ± 1 | 37,1 ± 1,3 | 4,3 ± 0 |
| <i>I. degenerans</i> / <i>E. stipulatus</i> | 20,8 ± 0,7 | 32,8 ± 0,6 | 5,5 ± 0 |
| <i>I. degenerans</i> / <i>E. gallicus</i> | 26 ± 0,6 | 38,7 ± 1,5 | - |

Les distances interspécifiques entre *I. degenerans* et les espèces de *Euseius* considérées sont largement supérieures aux distances intraspécifiques précédemment observées. Aucun chevauchement entre les distances intra- et interspécifiques n'est noté, montrant l'intérêt des trois marqueurs étudiés pour différencier ces espèces entre elles. Nous pouvons cependant constater que les distances interspécifiques entre *I. degenerans* et les espèces du genre *Euseius* sont similaires et parfois plus faibles qu'entre les 4 espèces de *Euseius*. Ceci semble confirmer la proximité phylogénétique de ces deux genres et nous interroge sur le bien fondé de ces deux genres. Cependant, comme ce travail de thèse n'a pas pour objectif de caractériser les relations phylogénétiques entre les genres, comme nous n'avons pas d'autres genres de la tribu des *Euseiini*, il nous est impossible de conclure. Néanmoins, ces questionnements phylogénétiques sont intéressants et méritent d'être inclus dans une analyse phylogénétique plus globale des tribus et des sous-familles de Phytoseiidae.

IV.D.6. Discussion générale

Les résultats présentés dans cette partie montrent que les marqueurs moléculaires utilisés permettent de différencier l'ensemble des espèces étudiées sans aucune ambiguïté. Le faible nombre d'individus séquencé pour quelques espèces et certains marqueurs, soulève quelques interrogations sur l'influence du faible nombre d'échantillons sur l'étendue de la variation intraspécifique observée. Pour étudier de façon plus approfondie les relations entre le nombre d'individus étudiés (par espèce) et la moyenne et l'écart-type des distances intraspécifiques, nous avons résumé dans le tableau VI l'ensemble de ces variables pour l'ensemble des espèces étudiées dans ce travail de thèse.

Les corrélations entre la variation (moyenne et écart-type) des distances intraspécifiques et le nombre d'individus séquencés par marqueur ont été étudiées. Les figures 13 et 14 représentent la corrélation entre le nombre d'individus séquencés et la moyenne (13) et l'écart type (14) pour les marqueurs 12S ARNr (a), Cytb (b) et ITS (c). Nous n'avons pas introduit les données obtenues avec le marqueur COI du fait du faible nombre d'individus séquencés par espèce.

Tableau VI. Nombre d'individus étudiés et distances intraspécifiques (moyenne \pm Ecart-type) observées au sein de chacune des espèces étudiées avec les marqueurs 12S ARNr, Cytb, COI et ITS.

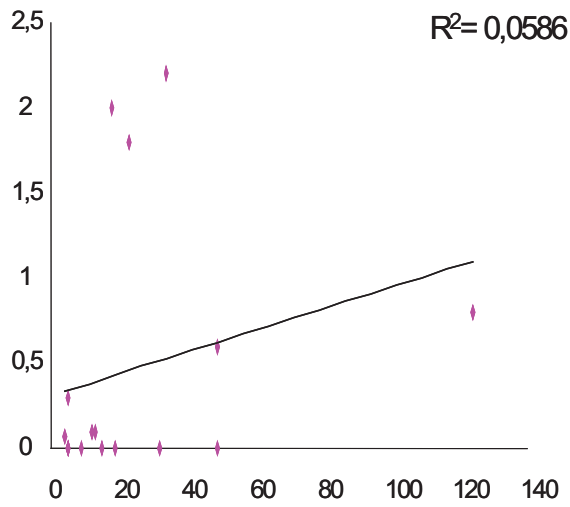
| Sous-famille | Genre | Espèce | 12S ARN r | | Cytb | | COI | | ITS | |
|----------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|--|-----------------------------|--|-----------------------------|--|
| | | | Nombre de spécimens analysé | Distances génétiques moyennes (%) \pm Ecart-Type | Nombre de spécimens analysé | Distances génétiques moyennes (%) \pm Ecart-Type | Nombre de spécimens analysé | Distances génétiques moyennes (%) \pm Ecart-Type | Nombre de spécimens analysé | Distances génétiques moyennes (%) \pm Ecart-Type |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>californicus</i> | 124 | 0,8 \pm 1,6 | 67 | 1,7 \pm 3,6 | - | - | 58 | 0 \pm 0 |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>picanus</i> | 15 | 0 \pm 0 | 10 | 0 \pm 0 | - | - | 2 | 0 \pm 0 |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | <i>persimilis</i> | 49 | 0 \pm 0 | 24 | 0,1 \pm 0,1 | - | - | 9 | 0 \pm 0 |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | <i>macropilis</i> | 5 | 0 \pm 0 | 5 | 0,1 \pm 0,1 | - | - | 3 | 0 \pm 0 |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | <i>fragariae</i> | 5 | 0 \pm 0 | 5 | 0 \pm 0 | - | - | 4 | 0 \pm 0 |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>stipulatus</i> | 9 | 0 \pm 0 | 3 | 0,9 \pm 0,1 | 4 | 0,9 \pm 0,7 | 5 | 0 \pm 0 |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>gallicus</i> | 19 | 0 \pm 0 | 2 | 0 | 6 | 0,06 \pm 0,09 | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>finlandicus</i> | 18 | 2 \pm 1,1 | 1 | - | - | - | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>ovalis</i> | 13 | 0,1 \pm 0,1 | 9 | 0 \pm 0 | - | - | 9 | 0,1 \pm 0,08 |
| Amblyseiinae | <i>Iphiseius</i> | <i>degenerans</i> | 23 | 1,8 \pm 1,51 | 13 | 2,9 \pm 2,1 | - | - | 7 | 0 \pm 0 |
| Amblyseiinae | <i>Amblyseius</i> | <i>andersoni</i> | 12 | 0,1 \pm 0,1 | 8 | 1,2 \pm 0,7 | - | - | 6 | 0,1 \pm 0,07 |
| Amblyseiinae | <i>Amblyseius</i> | <i>swirskii</i> | 5 | 0,3 \pm 0 | 5 | 0 \pm 0 | - | - | 4 | 1 \pm 0 |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | <i>aberrans</i> | 49 | 0,6 \pm 0,5 | 28 | 1,1 \pm 1,2 | - | - | - | - |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | <i>corylosus</i> | 4 | 0,07 \pm 0 | 4 | 0,4 \pm 0,4 | - | - | - | - |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>pyri</i> | 34 | 2,2 \pm 1,7 | 40 | 5,1 \pm 3,2 | 29 | 6,1 \pm 4,2 | 30 | 0,8 \pm 0,4 |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>exhilaratus</i> | 32 | 0 \pm 0,08 | 22 | 0 \pm 0 | - | - | - | - |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> | <i>phialatus</i> | 5 | 0 \pm 0 | 5 | 0 \pm 0 | - | - | - | - |

Pour les trois marqueurs, les coefficients de corrélation entre le nombre d'individus séquencés et les distances intraspécifiques moyennes sont faibles. Le coefficient le plus important a été observé pour le marqueur Cytb. Il ne semble donc pas exister de relation claire entre le nombre d'individus étudiés et la moyenne des distances intraspécifiques observée. Avec les deux marqueurs mitochondriaux, on observe tout de même que les distances moyennes les plus élevées ont été observées lorsque le nombre d'individus séquencés était inférieur à 50 (Figure 13 a,b,c).

Pour le marqueur nucléaire (ITS), aucune corrélation entre le nombre d'individus séquencés et l'écart-type des distances intraspécifiques n'a été observée. Il semble donc que le nombre d'individus étudiés n'affecte pas la présence de distances élevées. Pour le marqueur mitochondrial Cytb, un coefficient de corrélation de 0,69 laisse penser que plus nous prendrons en compte d'individus plus la probabilité d'observer une variation importante autour de la moyenne (due à des individus différents) sera importante. Le coefficient obtenu avec le marqueur 12S RNAr est intermédiaire (Figure 14 a,b,c).

Ces résultats confirment que les marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb) sont plus variables que le marqueur nucléaire (ITS). La caractérisation de l'étendue de la variation intraspécifique nécessite par conséquent un nombre d'individus plus élevé. Ce résultat rejoint les conclusions du chapitre IV.C dans lequel nous avons montré que le nombre d'individus nécessaires pour caractériser la variation intraspécifique de l'espèce *N. californicus*, était plus faible avec le marqueur ITS qu'avec les marqueurs mitochondriaux. Il serait intéressant d'appliquer des modèles de type « courbe d'accumulation » pour caractériser le nombre optimal d'individus à étudier par espèce pour chacun des genres et des sous-familles considérés.

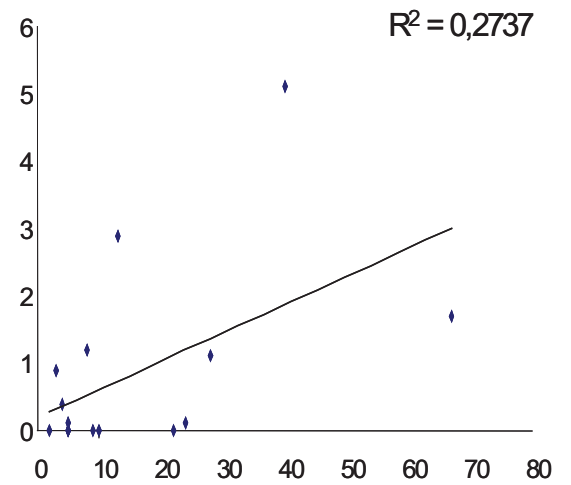
Distances intraspécifiques



a

Nombre d'individus séquencés

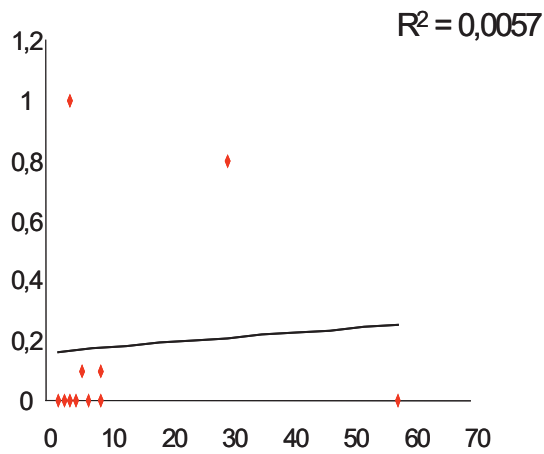
Distances intraspécifiques



b

Nombre d'individus séquencés

Distances intraspécifiques

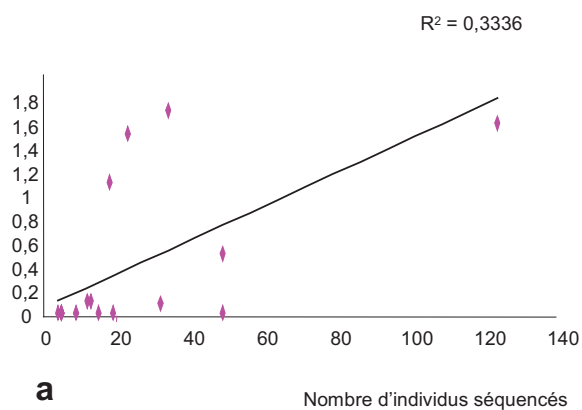


c

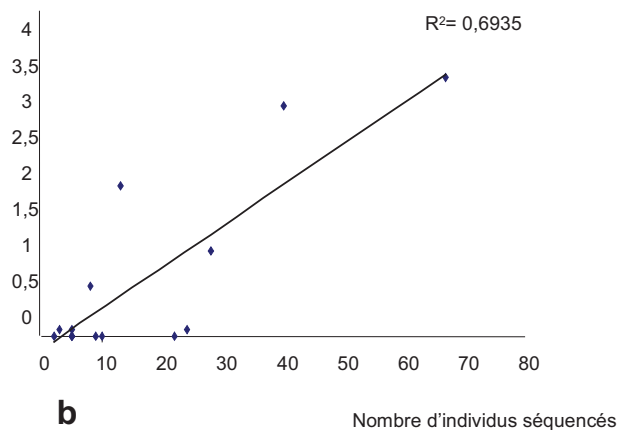
Nombre d'individus séquencés

Figure 13. Corrélation entre la moyenne intraspécifique et le nombre d'individus séquencés pour les marqueurs (a) 12S ARNr, (b) Cytb et (c) ITS.

Distances intraspécifiques



Distances intraspécifiques



Distances intraspécifiques

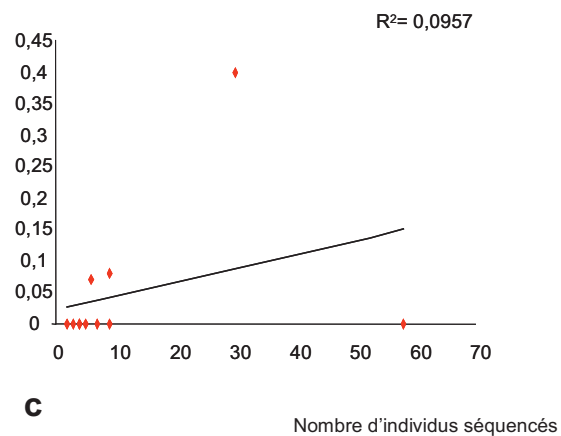


Figure 14. Corrélation entre l'écart-type et le nombre d'individus séquencés pour les marqueurs (a) 12S ARNr, (b) Cytb et (c) ITS

CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

V.1. Rappel des objectifs de ce travail de thèse

L'objectif de ce travail était de déterminer dans quelle mesure l'utilisation de marqueurs moléculaires (barcoding) pouvait (1) fiabiliser le diagnostic au sein de la famille des Phytoseiidae en se focalisant sur quelques espèces d'intérêt agronomique et (2) constituer une alternative à l'utilisation de la taxonomie traditionnelle uniquement basée sur des caractères morphologiques dont les limites ont été évoquées dans le chapitre II.B § 1-1-2. Pour répondre à ces deux objectifs généraux, nous nous sommes intéressés à deux aspects principaux :

1) **Le diagnostic à tous les stades de développement.** Comme indiqué dans le chapitre III § 1, le diagnostic spécifique est basé sur les caractères morphologiques des femelles, il est impossible aux stades précoces (œufs, larves et protonymphes) et peu fiable aux stades deutonymphes et adulte mâle.

2) **Etude de l'étendue des variations intra- et interspécifiques morphologiques et moléculaires.** Cette étude, préliminaire à une utilisation en « routine » du barcoding, a pour objectif de répondre plus précisément aux différentes problématiques auxquelles sont confrontés les taxonomistes, pour l'identification des espèces. Ce travail a été réalisé sur cinq espèces modèles d'intérêts agronomiques (*N. californicus*, *P. macropilis*, *P. persimilis*, *E. stipulatus* et *T. pyri*) et a permis les avancées taxonomiques suivantes.

- La découverte d'une nouvelle espèce au sein du genre *Euseius* Wainstein.
- La distinction d'espèces morphologiquement proches : exemple de *P. persimilis* et *P. macropilis*.
- La détermination de l'existence d'espèces cryptiques et l'étude de la pertinence de différents marqueurs moléculaires pour mettre en évidence ces entités : exemple de *N. californicus* et *T (T) pyri*.

Dans un dernier temps, nous avons également étudié la généralisation du diagnostic moléculaire à d'autres espèces de Phytoseiidae, en prenant toujours en considération des espèces ayant un intérêt en lutte biologique.

V.2. Les principales conclusions et perspectives

V.2.1. Le diagnostic à tous les stades de développement

Les principales conclusions. Le diagnostic spécifique de tous les stades de développement a pu être réalisé avec les deux marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb mtDNA), marqueurs actuellement les plus utilisés pour le diagnostic moléculaire des Phytoseiidae (Jeyaprakash et Hoy, 2002 ; Tixier *et al.*, 2006a, b, 2008a, 2010). Ces deux marqueurs ont permis de séparer l'ensemble des stades de développement de l'espèce *T. (T.) exhilaratus* des femelles de l'espèce *T. (T.) phialatus*. Ces deux espèces sont uniquement distinguables par la forme de la spermathèque, organe uniquement présent chez les femelles. Malgré leur petite taille, nous avons donc réussi à extraire une quantité suffisante d'ADN, pour tous les stades de développement (immatures et adulte mâle). Ces résultats constituent une avancée majeure pour le diagnostic spécifique au sein des espèces de cette famille, qui pourra être réalisé désormais à tous les stades de développement et plus uniquement à partir de spécimens femelles. Ces avancées ont des intérêts évidents en terme taxonomique mais aussi pour des études sur l'écologie des Phytoseiidae (prédation, compétition inter- et intraspécifique ...).

Les perspectives.

Malgré quelques précautions basiques, des contaminations ont été constatées lors de l'extraction de l'ADN, notamment pour les stades œufs, larves et protonymphes. L'une des perspectives serait donc de réaliser des études complémentaires visant à réduire ces contaminations pendant la phase d'extraction au cours de laquelle de très faibles quantités d'ADN sont manipulées. De plus, il serait également intéressant d'étudier les possibilités de diagnostic aux stades immatures et adulte mâle pour d'autres espèces de Phytoseiidae, plus petites que *T. (T.) exhilaratus*, notamment des espèces de la sous famille des Phytoseiinae ou appartenant au genre *Kampimodromus* (sous-famille des Amblyseiinae).

V.2.2. Etude de l'étendue des variations intra- et interspécifiques morphologiques et moléculaires

Afin d'éviter de surestimer (espèces cryptiques) ou au contraire de sous-estimer (synonymies) le nombre d'espèces par des approches moléculaires, nous avons procédé à l'étude des variations génétiques intra- et interspécifiques.

V.2.2.1. La découverte d'une nouvelle espèce

Les principales conclusions. Cette étude a permis d'identifier une nouvelle espèce pour la science : *Euseius gallicus* Kreiter-Tixier (2009). Les seules différences entre cette espèce et *E. stipulatus* étaient la légère différence de la forme du calyx de la spermathèque et la sclérotinisation du dorsum. Bien que la forme de la spermathèque soit considérée comme un caractère fiable pour délimiter les espèces (Athias-Henriot, 1968, 1969 ; Denmark, 1992 ; Tixier *et al.*, 2006a), il est difficile de déterminer à partir de quelle variation de forme (calyx dans ce cas), on peut considérer que l'on a affaire à deux espèces différentes. Quant à la sclérotinisation du dorsum, bien que sa valeur diagnostic ait été soulignée par certains auteurs notamment au sein du genre *Euseius* (G. de Moraes, communication personnelle), son caractère discriminant n'a jamais été testé expérimentalement. Afin de déterminer si les individus de l'espèce *E. gallicus* n'appartenaient pas à l'espèce *E. stipulatus*, l'étendue des distances intra- et interspécifiques a été étudiée avec les marqueurs 12S ARNr et COI mtDNA. Une claire distinction entre ces deux entités a été observée avec aucun chevauchement (présence de « gap ») entre les distances génétiques intra- et interspécifiques pour les deux marqueurs testés. Nous avons donc conclu que *E. gallicus* et *E. stipulatus* étaient deux espèces différentes. Puis, une étude bibliographique nous a permis de conclure que *E. gallicus* était bien une espèce nouvelle pour la Science (voir article 3 du chapitre IV).

Les perspectives.

1) La valeur diagnostic de la sclérotinisation du dorsum semble, comme proposé par certains auteurs, être un caractère important pour différencier les espèces du genre *Euseius*. Cependant, pour confirmer cette conclusion, il serait intéressant de comparer des espèces de ce genre qui ne se différencient que par ce caractère. Pour cela, il faudrait néanmoins au préalable réaliser une étude bibliographique afin

de déterminer si effectivement de telles espèces existent. Si tel est le cas, il faudrait ensuite obtenir des spécimens vivants ou en alcool ainsi que les types de ces espèces. Une telle démarche pourrait être appliquée à d'autres genres de cette famille et pas seulement au genre *Euseius*.

2) L'une des perspectives de ce travail serait de lever certaines ambiguïtés concernant la ressemblance entre la nouvelle espèce décrite *E. gallicus* et une autre espèce morphologiquement proche *Euseius longiverticilis* (Liang et Ke, 1983). Ces deux espèces présentent en effet des longueurs de soies similaires, mais la forme de la spermathèque semble différente. Ce dernier caractère en effet n'est pas très visible dans la description originale du fait de la mauvaise qualité des dessins. Il semble donc important d'obtenir le type et/ ou des spécimens vivants de cette espèce, seulement signalée une fois en Chine lors de sa description. Nous avons déjà tenté d'obtenir le type durant ce travail de thèse mais sans succès. Cependant, il est évident que la recherche de ce type doit être poursuivie.

3) Etant donnée la fréquence importante de *E. gallicus*, l'étude de ses caractéristiques biologiques pourrait être envisagée afin notamment de connaître ses capacités prédatrices et déterminer son efficacité potentielle dans les programmes de lutte biologique.

V.2.2.2. La délimitation des espèces morphologiquement proches : exemple de *P. persimilis* et *P. macropilis*

Les principales conclusions. Dans ce travail de thèse, nous avons montré l'utilité des marqueurs moléculaires pour distinguer deux espèces morphologiquement très proches : *P. persimilis* et *P. macropilis*. Bien que les valeurs des distances génétiques entre ces deux entités soient faibles avec le marqueur nucléaire (ITS), aucun chevauchement n'a été observé entre les distances intra- et interspécifiques. Des résultats similaires ont également été obtenus avec les deux marqueurs mitochondriaux (12S ARNr et Cytb). Ce travail a permis de montrer que certains caractères morphologiques considérés comme discriminants n'étaient pas assez pertinents et que la seule distinction morphologique stable et visible entre ces deux espèces serait la nature de la macrosoie StIV (lisse ou barbulée).

Ainsi, le diagnostic entre ces deux entités semble moins complexe et plus sûr avec les marqueurs moléculaires (qui mettent en évidence deux clades bien distincts), qu'avec des observations morphologiques.

Les perspectives.

1) Il serait intéressant d'étudier davantage de populations de *P. persimilis* afin de mieux caractériser l'étendue de la variation intraspécifique de cette espèce. Nous avons pris uniquement en considération dans cette étude des populations d'origine ouest-paléarctique ; il serait donc intéressant d'étudier des populations plus mondialement distribuées, notamment originaires d'Amérique du Sud, aire d'origine supposée du genre *Phytoseiulus* (Takahashi et Chant, 1993a ; Kanouh *et al.*, 2010b).

2) D'après la littérature (McMurtry, 1983 ; Takahashi et chant, 1993b), la valeur diagnostique de la position de la paire de soie JV2 (sur ou en dehors du bouclier ventrianal) est ambiguë. Pour tous Les spécimens de *P. macropilis* que nous avons étudiés, la soie JV2 était insérée sur le bouclier ventrianal. Pour répondre aux questionnements soulevés dans la littérature, il aurait été donc intéressant d'avoir dans notre échantillon des individus de *P. macropilis* présentant la soie JV2 en dehors du bouclier ventrianal. Dans des études ultérieures, nous pensons par conséquent prendre en considération un nombre plus important de spécimens de *P. macropilis* afin d'augmenter la probabilité de pouvoir étudier de tels spécimens. Pour déterminer parmi ce grand nombre de spécimens, lesquels présentent la soie JV2 sur ou à l'extérieur du bouclier ventrianal, nous pensons utiliser des méthodes récemment développées permettant de conserver (et d'observer) la carcasse des spécimens dont l'ADN a été extrait (Jeyaprakash et Hoy, 2010 ; Tixier *et al.*, sous presse).

V.2.3. Mise en évidence d'espèces cryptiques au sein de la famille des Phytoseiidae et pertinence des différents marqueurs moléculaires pour différencier ces entités

L'étude de neuf populations de *T. (T.) pyri* (133 individus) et de quinze populations de *N. californicus* (249 individus) a montré des distances génétiques intraspécifiques très supérieures à celles précédemment observées au sein de la famille des Phytoseiidae. De plus, pour chaque espèce, deux groupes d'individus ont été observés, nous interpellant sur la présence d'espèces cryptiques. Les distances génétiques intergroupes ressemblaient en effet plus à celles observées entre deux espèces différentes appartenant à la sous-famille des Amblyseinae (voir chapitre IV

parties B,C et E). Cependant, l'étendue de la variation intraspécifique observée au sein de l'espèce *T. (T.) pyri* était similaire à celle observée au sein d'une espèce appartenant comme *T. (T.) pyri* à la sous-famille des Typhlodrominae (Kanouh *et al.*, 2010b). De plus, dans les deux cas, les analyses moléculaires avec le marqueur nucléaire ITS ainsi que les analyses morphologiques ne montraient pas l'existence de deux groupes d'individus et les distances génétiques intraspécifiques étaient faibles (« normales » au vu de la littérature).

Afin d'être fixé sur le statut des deux groupes observés dans l'espèce *T. (T.) pyri*, des croisements ont été réalisés. Cette expérimentation n'a pu être réalisée pour l'espèce *N. californicus*, car il a été impossible d'obtenir des spécimens vivants appartenant à l'un des deux groupes d'individus différenciés avec les marqueurs mitochondriaux. Les résultats des croisements biologiques entre les deux populations de *T. (T.) pyri* ont montré une compatibilité complète de reproduction.

Ainsi, dans ces deux études les analyses morphologiques et l'analyse moléculaire nucléaire (ITS) mettaient en évidence que l'ensemble des spécimens appartenait à la même entité spécifique alors que les analyses réalisées avec les marqueurs mitochondriaux montraient plutôt la présence de deux groupes, pouvant être interprétés comme des espèces différentes. Dans le cas de *T. (T.) pyri*, l'application du concept biologique de l'espèce a permis de lever le doute concernant le statut de ces deux groupes, montrant ainsi l'importance de combiner différentes « approches » (taxonomie intégrative) pour fiabiliser le diagnostic spécifique. Dans la littérature, les termes « discovery of cryptic species » sont très souvent rencontrés pour des analyses réalisées avec des marqueurs mitochondriaux. Les résultats que nous avons obtenus nous font émettre quelques questionnements sur la validité de ces espèces cryptiques définies uniquement sur la base d'une structuration mitochondriale. La validation par des analyses morphologiques, biologiques ou avec des marqueurs nucléaires semble donc importante.

Dans ce chapitre nous avons relaté l'ensemble des résultats obtenus pendant ces trois années de thèse et les perspectives futures qui découlent des différentes études réalisées. Des études complémentaires sur les caractéristiques biologiques des différentes entités obtenues (populations et espèces comme *E. gallicus*) se sont avérées importantes. Cette conclusion souligne l'importance du diagnostic dans les programmes de lutte biologique.

Dans le chapitre suivant, nous tenterons sur la base d'une synthèse des résultats obtenus dans toutes ces études, d'apporter des éléments de réponses aux questions soulevées dans l'introduction générale concernant les différentes problématiques liées à l'utilisation du barcode moléculaire pour la famille des Phytoseiidae.

CHAPITRE VI. CONCLUSION GENERALE

CHAPITRE VI. CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous allons présenter dans cette conclusion générale, comment les résultats obtenus dans ce travail de thèse permettent de répondre à plusieurs questions générales concernant le diagnostic moléculaire des espèces de Phytoseiidae.

VI.1. Quel est le marqueur moléculaire le plus pertinent pour différencier de façon fiable les espèces de Phytoseiidae étudiées ?

Ce travail de thèse a montré que les marqueurs mitochondriaux et nucléaires pouvaient différencier des espèces appartenant au même genre et souvent morphologiquement très proches. Par contre, comme indiqué dans le chapitre II.A § 2-3, le taux de mutation de l'ADN mitochondrial est plus élevé que celui de l'ADN nucléaire. De ce fait, une structuration des populations plus marquée est observée avec les marqueurs mitochondriaux. Parfois, une structuration importante nous a même conduit à nous interroger sur la nature des clades : espèces différentes ou populations différentes au sein d'une même espèce ? Cependant, cette réflexion ne remet pas en cause la capacité des marqueurs mitochondriaux à séparer les espèces comme nous l'avons montré par plusieurs exemples dans ce travail de thèse, mais souligne simplement l'intérêt d'utiliser en complément des marqueurs nucléaires et/ou des approches morphologiques afin de pouvoir conclure clairement sur le statut d'espèce des clades observés.

Les résultats de nos travaux semblent donc concorder avec les nombreuses réserves émises dans la littérature concernant l'utilisation d'un gène unique pour délimiter l'ensemble des espèces du vivant (Lipscomb *et al.*, 2003 ; Mallet et Willmott, 2003 ; Tautz *et al.*, 2003 ; Seberg *et al.*, 2003 ; Moritz et Cicero, 2004 ; Rubinoff, 2005 ; Rubinoff *et al.*, 2006a,b). Cependant, à la lueur des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons toutefois nous interroger sur la possibilité d'utiliser un seul gène, notamment mitochondrial, dans le cas où les variations intra- et interspécifiques seraient parfaitement caractérisées.

VI.2. Quelles sont les limites des variations intra- et interspécifiques moléculaires des espèces étudiées?

Ce travail de thèse a montré des différences, dans l'étendue de la variation intraspécifique avec les marqueurs mitochondriaux, entre les espèces appartenant à la sous-famille des Amblyseiinae et celles appartenant à la sous-famille des Typhlodrominae.

Pour les espèces appartenant à la sous-famille des Amblyseiinae, comme indiqué dans le chapitre IV (parties B, C et E), la variation intraspécifique observée avec les marqueurs mitochondriaux (12S ARNr, Cytb et COI) était inférieure à 2%. Seules deux populations de *N. californicus* présentaient des divergences supérieures à 2% avec les autres populations de cette même espèce. En revanche, pour la seule espèce étudiée qui appartenait à la sous-famille des Typhlodrominae, l'étendue de la variation intraspécifique dépassait largement les 2% (jusqu'à 11%). Ces distances élevées étaient similaires à celles séparant deux espèces différentes de la sous-famille des Amblyseiinae. Une variation intraspécifique aussi grande a été également observée pour une autre espèce de la sous-famille des Typhlodrominae appartenant au genre *Neoseiulella* Muma, (Kanouh *et al.*, 2010a). De tels résultats soulèvent des questionnements sur l'étendue des variations intraspécifiques des espèces de cette dernière sous-famille. Aucun chevauchement cependant n'a été observé entre les distances intra- et interspécifiques pour les espèces de cette sous-famille, comme cela a été aussi le cas pour la sous-famille des Amblyseiinae. Ces marqueurs peuvent donc clairement différencier les espèces des deux sous-familles considérées.

L'étendue de la variation intraspécifique nucléaire (ITS) était quant à elle identique (~0%) pour l'ensemble des espèces étudiées qu'elles appartiennent à la sous-famille des Amblyseiinae ou à celle des Typhlodrominae.

L'étendue des variations intraspécifiques est différente avec les marqueurs mitochondriaux (12S ARNr, Cytb et COI) et identique avec le marqueur nucléaire (ITS) pour les espèces appartenant aux deux sous-familles étudiées. Bien qu'aucun chevauchement entre les distances intra- et interspécifiques n'ait été observé, des

questionnements sur la mise en place d'un seuil fiable permettant de différencier les entités spécifiques à l'aide de ces marqueurs peuvent être soulevés.

VI.3. Est-il possible d'établir un seuil unique de décision pour délimiter les espèces au sein de la famille des Phytoseiidae ?

Nous pouvons répondre par l'affirmative à cette question pour le marqueur nucléaire (ITS). La limite maximale des distances intraspécifiques est de 1% pour la sous-famille des Amblyseiinae et de 1,2% pour la sous-famille des Typhlodrominae. Il existerait cependant une interrogation sur le statut de *P. persimilis* et *P. macropilis* qui seraient considérées, en utilisant ce seuil, comme des synonymes alors que des croisements (Takahashi et Chant, 1993d) ont montré que ces deux espèces étaient valides.

Pour les marqueurs mitochondriaux en revanche, il semble qu'un seuil différent devrait être appliqué pour chacune des deux sous-familles pour les trois marqueurs étudiés. La limite maximale des distances intraspécifiques à l'intérieur de la sous-famille des Amblyseiinae est de 4,7% avec le marqueur 12S ARNr, 6 % avec le marqueur Cytb et 2,6 % avec le marqueur COI. Quant à la limite maximale des distances intraspécifiques à l'intérieur de la sous-famille des Typhlodrominae, elle est de 4,7% avec le marqueur 12S ARNr, 9 % avec le marqueur Cytb et 11,3 % avec le marqueur COI. Si un seuil unique était appliqué, de nombreuses espèces de la sous-famille des Amblyseiinae ne seraient plus considérées comme telles ; et au contraire des populations d'une même espèce de la sous-famille des Typhlodrominae seraient considérées comme des espèces cryptiques. Cependant pour conclure de façon certaine, il faudrait étudier un nombre plus élevé d'espèces appartenant à chacune des sous-familles considérées. Il semblerait également important d'étudier des espèces de la troisième sous-famille de Phytoseiidae : Phytoseiinae. Aucune espèce n'a été étudiée au cours de ce travail de thèse car cette sous-famille comprend peu d'espèces d'intérêts agronomiques.

VI.4. Est-ce que les approches moléculaires ont réellement permis d'améliorer le diagnostic morphologique ?

Nous pouvons répondre par l'affirmative à cette question pour au moins les trois situations suivantes :

La première situation correspond au diagnostic des stades immatures et des mâles. Ce diagnostic a pu être réalisé grâce à des approches moléculaires alors qu'il est impossible ou très peu fiable sur la base de caractères morphologiques.

La deuxième situation correspond au cas où l'approche moléculaire permet de caractériser la valeur diagnostique de certains caractères morphologiques. Dans ce travail de thèse, l'utilisation de marqueurs moléculaires a permis de montrer la valeur discriminante de la forme du calyx de la spermathèque pour différencier *E. stipulatus* et *E. gallicus*. Ainsi, grâce à ce travail, l'identification morphologique de ces deux espèces est plus aisée et surtout plus fiable.

La troisième situation correspond au cas où les caractères morphologiques ne permettent pas de séparer facilement deux espèces morphologiquement proches. Dans notre travail, cela a été le cas de *P. persimilis* et *P. macropilis*, uniquement distinguables par la nature de soie StIV (lisse ou barbulée). Dans ce cas, l'utilisation des marqueurs moléculaires est plus fiable et plus rapide, et pourrait se substituer aux observations morphologiques. Cette situation se différencie bien de la situation 2, dans laquelle les approches moléculaires aident à caractériser la valeur discriminante des caractères morphologiques pour faciliter le diagnostic morphologique, sans s'y substituer.

En revanche, dans certaines situations, l'utilisation des marqueurs moléculaires mitochondriaux nous a fait poser certaines questions sur l'existence d'espèces cryptiques, ceci d'autant plus que les observations morphologiques montraient clairement que les individus considérés appartenaient tous à la même espèce. Dans ces derniers cas, les observations morphologiques semblaient donc plus fiables que les analyses moléculaires (mitochondriales). Nous avons même déterminé que le nombre d'individus nécessaires pour caractériser la variation intraspécifique était plus faible pour des études morphologiques que des études moléculaires (mitochondriales). Les approches moléculaires se sont avérées dans ces cas peut être moins appropriées que les approches morphologiques (de surcroît moins coûteuses). Cependant, ces situations correspondaient à des espèces facilement identifiables, relativement faciles à différencier des autres espèces du même genre. Or, dans le cas de genres comprenant beaucoup d'espèces, dans lesquels de nombreuses synonymies sont suspectées et/ou le nombre de caractéristiques discriminantes est faible, les conclusions peuvent être différentes.

Ce travail montre dans tous les cas la complémentarité et l'incessant va-et-vient entre taxonomie traditionnelle et taxonomie moléculaire. Afin de se doter de l'ensemble des outils nécessaires à l'identification spécifique des Phytoseiidae, il semble important de continuer à travailler sur les approches barcoding en construisant notamment une base de données adhoc.

VI.5. Le développement des bases de données pour le diagnostic des Phytoseiidae : état des lieux et développements à venir.

La construction d'une base de donnée associant des séquences d'ADN et les noms des espèces correspondantes a été l'un des défis du projet barcode moléculaire (Hebert *et al.*, 2003 ; Ratnasingham et Hebert, 2007). Cependant, pour que ces bases de données puissent améliorer le diagnostic spécifique, il faut qu'elles remplissent plusieurs conditions : (i) le contrôle de la qualité des séquences (absence de séquences pseudogènes) et (ii) la conservation d'un spécimen de référence (voucher-spécimen), préalablement identifié par un spécialiste du groupe taxonomique, (iii) des données complètes pour un taxa donné.

Les deux premières conditions ont été remplies sur l'ensemble des séquences obtenues pendant ce travail de thèse. Pour le troisième point, lors de notre travail, nous avons obtenu **902** séquences pour **vingt et une espèces** de Phytoseiidae (**quatre gènes**). Cependant, au total, dans le laboratoire, nous possédons des données moléculaires pour à peu près **40 espèces**, essentiellement pour les marqueurs 12S ARNr et ITS, mais avec peu de séquences par espèce. La base de données Genbank comprend quant à elle actuellement 313 séquences d'ADN de 33 espèces de Phytoseiidae, parfois les mêmes que celles que nous possédons déjà. Nous avons sept espèces différentes de celles présentes dans GenBank, ce qui porte à 47 espèces de Phytoseiidae présentant des données moléculaires intéressantes pour l'identification. Cependant, l'un des problèmes de l'utilisation des séquences issues de Genbank est qu'il est difficile de déterminer si l'identification des espèces séquencées est fiable, ceci car il est difficile (même en contactant les auteurs) de se procurer les vouchers spécimens. Le tableau VII présente un récapitulatif de l'ensemble des séquences obtenues pendant ce travail de thèse et celles déposées dans Genbank par espèce et marqueur étudié.

Nous observons que le nombre de séquences du gène COI déposées sur Genbank est très faible. Nous pouvons supposer que comme pour nous, les auteurs ont pu rencontrer des difficultés pour amplifier ce fragment au sein des espèces de cette famille. Nous remarquons également que nous sommes les seuls à avoir utilisé le marqueur *cytb* pour les Phytoseiidae et enfin que la grande majorité des séquences dans Genbank concernent les marqueurs 12S ARNr et ITS.

Afin d'optimiser l'utilisation d'une telle base de données, il semble important d'améliorer la caractérisation de la variation intra- et interspécifique de chaque espèce enregistrée dans la base, en obtenant d'une part davantage de populations distribuées dans l'ensemble de l'aire de distribution géographique et d'autre part des espèces d'un même genre. Pour l'instant, notre base de données est loin de contenir toutes les espèces de Phytoseiidae décrites (plus de 2800 espèces sont citées dans le catalogue de Moraes *et al.*, 2004). De ce fait, elle ne peut être utilisée du fait des erreurs d'assignation que cela pourrait engendrer. Cependant, l'objectif est de compléter au fur et à mesure cette base de données.

Pour ceci, des collaborations étroites avec l'ensemble des taxonomistes mondiaux est indispensable. En effet, outre la région Ouest-Paléarctique, le nombre d'espèces de Phytoseiidae le plus élevé a été signalé des régions Néotropicales et Orientales (Moraes *et al.*, 2004 ; Tixier *et al.*, 2008c)

Enfin, le développement de cette base de données pourra également répondre de façon plus fiable et plus rapide aux demandes des professionnels qui utilisent et/ou commercialisent ces espèces prédatrices. Dans le dernier paragraphe du chapitre I, nous avons mis l'accent sur le fait que chaque espèce possède ses propres attributs biologiques et écologiques. Une mauvaise identification aurait donc des conséquences sur la réussite des programmes de lutte biologique qui les utilisent. Dans ce cadre, nous pensons, grâce à l'amélioration du diagnostic spécifique des Phytoseiidae, pouvoir participer à un meilleur contrôle des ravageurs des cultures, de façon biologique en limitant d'une part les pertes de rendement et d'autre part l'utilisation des pesticides.

Tableau VII. Récapitulatif des séquences par espèce et par marqueur (croix) obtenu pendant ce travail de thèse (en bleu), présentes sur notre base (en blanc) et sur Genbank (en vert)

| Sous-famille | Genre | espèce | Séquences dans la base de données du laboratoire | | | | Séquences déposées sur Genbank (autres que les notes) | | | |
|----------------|---|---------------------|--|------|-----|-----|---|------|-----|-----|
| | | | 12S | CYTB | COI | ITS | 12S | CYTB | COI | ITS |
| Amblyseiinae | <i>Amblyseius</i> | <i>andersoni</i> | x | x | | x | x | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Amblyseius</i> | <i>swirskii</i> | x | x | | x | x | | x | x |
| Amblyseiinae | <i>Amblyseius</i> | <i>tsugawai</i> | | | | | | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>concordis</i> | | | | | | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>finlandicus</i> | x | x | x | x | | | x | x |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>gallicus</i> | x | x | x | - | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>nicholsi</i> | | | | | x | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>ovalis</i> | x | x | | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Euseius</i> | <i>stipulatus</i> | x | x | x | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Iphiseius</i> | <i>degenerans</i> | x | x | | x | x | | x | x |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | <i>aberrans</i> | x | x | x | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | <i>corylosus</i> | x | x | x | - | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | <i>ericinus</i> | x | | x | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | <i>hmiminai</i> | x | | x | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Kampimodromus</i> | <i>langei</i> | x | | x | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>agrestis</i> | x | | | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>alpinus</i> | | | | | | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>barkeri</i> | x | | | x | | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>californicus</i> | x | x | | x | | | x | x |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>cucumeris</i> | x | | | x | x | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>fallacis</i> | | | | | x | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>longilaterus</i> | x | | | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>picanus</i> | x | x | | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>reductus</i> | | | | | | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Neoseiulus</i> | <i>wormesleyi</i> | | | x | x | | | x | |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | <i>fragariae</i> | x | x | | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | <i>longipes</i> | x | x | | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | <i>macropilis</i> | x | x | | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Phytoseiulus</i> | <i>persimilis</i> | x | x | x | x | x | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Typhlodromalus</i> | <i>aripo</i> | x | | | x | | | | |
| Amblyseiinae | <i>Typhlodromalus</i> | <i>deleoni</i> | | | | | x | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Typhlodromalus</i> | <i>limonicus</i> | | | | | | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Typhlodromips</i> | <i>montdorensis</i> | x | | | x | | | | x |
| Amblyseiinae | <i>Typhloseiella</i> | <i>isotricha</i> | x | | | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Cydnoseius</i> | <i>negevi</i> | x | | | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Galendromus</i> | <i>occidentalis</i> | | | | | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Neoseiulella</i> | <i>aceri</i> | x | x | x | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Neoseiulella</i> | <i>litoralis</i> | x | x | x | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Neoseiulella</i> | <i>tiliarum</i> | x | x | x | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Neoseiulella</i> | <i>tuberculata</i> | x | x | x | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Paraseiulus</i> | <i>soleiger</i> | x | | | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> (<i>Anthoseius</i>) | sp. | x | | | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> (<i>Typhlodromus</i>) | <i>athiasae</i> | x | x | | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> (<i>Typhlodromus</i>) | <i>exhilaratus</i> | x | x | | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> (<i>Typhlodromus</i>) | <i>phialatus</i> | x | x | | x | | | | |
| Typhlodrominae | <i>Typhlodromus</i> (<i>Typhlodromus</i>) | <i>pyri</i> | x | x | x | x | | | x | x |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abad-Moyano, R., Pina T, Dembilio O, Ferragut, F, Urbaneja, A. 2009. Survey of natural enemies of spider mites (Acari: Tetranychidae) in citrus orchards in eastern Spain. *Experimental and Applied Acarology* 47,49–61.
- Abad-Moyano, R., Pina T., Perez-Panades, J., Carbonell, E.A., Urbaneja, A. 2010. *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus persimilis* in suppression of *Tetranychus urticae* in young clementine plants. *Experimental and Applied Acarology*, 50, 317-328.
- Abdo, Z., Golding, G.B. 2007. A step toward barcoding life: a model-based, decisiontheoretic method to assign genes to preexisting species groups. *Systematic Biology*, 56, 44–56.
- Abou-Setta, M.M., Childers, C.C. 1987. Biology of *Euseius mesembrinus* (Acari: Phytoseiidae): life tables on ice plant pollen at different temperatures with notes on behavior and food range. *Experimental and Applied Acarology*, 3, 123-130.
- Abou-Setta, M.M., Childers, C.C. 1989. Biology of *Euseius mesembrinus* (Acari: Phytoseiidae): life tables and feeding behavior on tetranychid mites on citrus. *Environmental Entomology*, 18, 665-669.
- Ahrens, D., Monaghan, M.T., Vogler, A.P. 2007. DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 44, 436–449.
- Alexander, L.C., Delion, M., Hawthorne, D.J., Lamp, W.O., Funk, D.H. 2009. Mitochondrial lineages and DNA barcoding of closely related species in the mayfly genus *Ephemerella* (Ephemeroptera:Ephemerellidae). *Journal the North American Benthological Society*, 28(3), 584–595.
- Ali, F.S. 1998. Life tables of *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Gamasida: Phytoseiidae) at different temperatures. *Experimental and Applied Acarology*. 22: 335-342.
- Alström, P., Rasmussen, P. C., Olsson, U., Sundberg, P. 2008. Species delimitation based on multiple criteria: the Spotted Bush Warbler *Bradypterus thoracicus* complex Aves: Megaluridae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154, 291–307.

- Amano, H., Chant, D.A. 1978. Mating behaviour and reproductive mechanisms of two species of predacious mites, *Phytoseiulus Persimilis* Athias-Henriot and *Amblyseius andersoni* (Chant) (Acarina: Phytoseiidae). *Acarologia*, 20, 1996-213.
- Anderson, S, Bankier, A., Barell, B., DeBruijn, M., Coulson, A., Drouin, J., Speron, I., Nierlich, D., Roe B., Sanger, F., Schereier, P., Smith A., Staden R., Young I. 1981. Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-465.
- Anderson, J.M., Ammerman, N.C., Norris, D.E. 2004. Molecular differentiation of Metastriate tick immatures. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4, 334-342.
- Ashihara, W., Hamamura, T., Shinkaji, N. 1978. Feeding, reproduction, and development of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acarina: Phytoseiidae) on various food substances. *Bulletin of the Fruit Trees Research Station E2*: 91-98.
- Athias-Henriot, C. 1957. Phytoseiidae et Aceosejidae Acarina, Gamasina d'Algerie. I. Genres *Blattisocius* Keegan, *Iphiseius* Berlese, *Amblyseius* Berlese, *Phytoseius* Ribaga, *Phytoseiulus* Evans. *Bulletin de la Societe d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord, Alger, Algeria*, 48,319–352.
- Athias-Henriot C.1962. *Amblyseius swirskii*, un nouveau phytoseiide voisin d'*A. andersoni* (Acariens anactinotriches). *Annales de l'Ecole Nationale d'Agriculture d'Alger, Algeria*, 3, 1–7.
- Athias-Henriot, C.1968. L'appareil d'insémination Laelapoïde (acariens anactinotriches: Laelapoidea). Premières observations, possibilités d'emploi à des fins taxonomiques. *Bulletin Scientifique De Bourgogne*, 25, 230–274.
- Athias-Henriot, C. 1969. Notes sur la morphologie externe des Gamasides (acariens Anactinotriches). *Acarologia*, 11, 609–629.
- Athias-Henriot, C. 1975. Nouvelles notes sur les Amblyseiini. II. Le relevé organotaxique de la face dorsale adulte Gamasides protoadéniques, Phytoseiidae. *Acarologia*, 17, 20–29.
- Athias-Henriot, C.1977. Nouvelles notes sur les Amblyseiini. III. Sur le genre *Cydnodromus*: Redéfinition, composition (Parasitiformes, Phytoseiidae). *Entomophaga* 22, 61–73.

- Athias-Henriot, C. 1978. Définition de Dictyonotus nov. gen., avec description de deux espèces nouvelles de France Meridionale (Gamasides, Phytoseiidae). *Entomophaga* 23, 189–194.
- Auger, P., Tixier, M.S, Kreiter, S. 1999. Factors affecting ambulatory dispersal in the predaceous mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae), *Experimental and Applied Acarology* 23, 235–250
- Austerlitz, F., David O., Schaeffer, B., Bleakley, K., Olteanu, M., Leblois, R., Veuille, M., Laredo, C., 2009. DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics*;10:S10.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.
- Avise, J.C., Walker, D. 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 96, 992–995.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Badii, S., Swirski, E., 1976. Notes on predacious mites of Italy, with a description of two new species and of an unknown male Acarina: Phytoseiidae. *Redia*, 59, 179–196.
- Badii, M.H., McMurtry, J.A., 1984. Life-history of and life table parameters for *Phytoseiulus longipes* with comparative studies on *Phytoseiulus persimilis* and *Typhlodromus occidentalis* Acari, Phytoseiidae. *Acarologia*, 25, 111–123.
- Ball, S.L., Hebert, P.D.N., Burian, S.K., Webb, J.M., 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal North American of Benthological Society*, 24, 508–524.
- Barbar, Z., Tixier, M.S., Cheval, B., Kreiter, S. 2006. Effects of agroforestry on phytoseiid mite communities Acari: Phytoseiidae in vineyards in the South of France. *Experimental and applied acarology*, 40.175-188

- Barret, D., Kreiter, S. 1992. Rôle des relations morphométriques dans la coopération entre certaines plantes et les acariens prédateurs Phytoseiidae. Bulletin de la Société d'Ecophysiologie 17, 129–143.
- Barrett R.D.H., Hebert P.D.N., 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. Canadian Journal of Zoology, 83, 481–491.
- Battaglia D., Borriello M. and Spicciarelli R., 1990. Biological control of *Tetranychus urticae* Koch by *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot on protected strawberry in the Metapontum area. Informatore-fitopatologico, 40, 44-46.
- Bensasson, D., Petrov, D.A., Zhang, D.X., Hartl, D.L., Hewitt, G.M. 2001. Genomic gigantism:DNA loss is slow in mountain grasshoppers. Molecular Biology and Evolution, 18, 246–253.
- Benson, D.A, Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J, Ostell, J. Wheeler, D.L. 2008. GenBank. Nucleic Acids Research.;36,D25–D30.
- Berlese, A. 1889. Acari, Myriopoda et Scorpiones hucusque in Italia reperta. Tipografia del Seminario, Padova, Italy, 6(54), 7–9.
- Bickford, D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K., Meier R., Winker K., Ingram K., Das I.. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in Ecology and Evolution 22: 148-155.
- Blackmore, S. 2002. Biodiversity update: progress in taxonomy. Science, 298, 365.
- Blackwood, J.S., Schausberger, P., Croft, B.A. 2001. Prey-stage preference in generalist and specialist phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) when offered *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) eggs and larvae. Environmental Entomology. 30, 1103-1111.
- Blaxter, M.L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences, 359, 669-679.
- Bon, M.C., Hoelmer K., Coutinot D., Ramualde N. 2008. PCR-based, rapid diagnosis of parasitism of *Lygus* spp Hemiptera: Miridae by *Peristenus relictus* Hymenoptera: Braconidae. Biocontrol Science and technology, 18, 505-516.
- Borah, D.C., Rai, P.S. 1989. Potentiality of *Amblyseius ovalis* (Acari: Phytoseiidae) as a biological control agent on *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). In: B.P.

Channa Basavanna and C.A. Viraktamath, Editors, Progress in Acarology 2, EJ Brill, Leiden, The Netherlands 1989, pp. 375–379.

Bouras, S.L., Papadoulis G.T.H. 2005. Influence of selected fruit tree pollen on life history of *Euseius stipulatus* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology*, 36,1-14.

Brown, W.M., George, M.Jr., Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National. Academy of Science of USA*, 76, 1967-71.

Bucklin, A., Wiebe, P.H., Smolenack, S.B., Copley, N.J., Beaudet, J.G., Bonner, K.G., Farber-Lorda, J., Pierson, J.J. 2007. DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). *Journal of Plankton Research*, 29, 483–493

Byrne, M., Anderson, M.J. 1994. Hybridization of sympatric *Patriella* species Echinodermata: Asteroidea in New South Wales. *Evolution*, 48, 564–576.

Cain, A.J. 1954. *Animal species and evolution*. Hutchinson, London.

Camporese, P., Duso, C. 1996. Different colonization patterns of phytophagous mites on three grape varieties: a case study. *Experimental and Applied Acarology* 20, 1–22.

Cardoso, A., Serrano, A., Vogler, A.P. 2009. Morphological and molecular variation in tiger beetles of the *Cicindela hybrida* complex: is an 'integrative taxonomy' possible? *Molecular Ecology*, 18, 648-64.

Carstens, B.C., Knowles, L.L. 2007. Estimating species phylogeny from gene-tree probabilities despite incomplete lineage sorting: an example from *Melanoplus* grasshoppers. *Systematic Biology*, 56, 400–411.

Casati, S., Bernasconi, M.V., Gern, L., Piffaretti, J.C. 2008. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus sensu stricto* (Acari: Ixodidae). *Infection, Genetics and Evolution* 8,152-158.

Castagnoli, M., Liguori, M. 1986. Ulteriori indagini sull'acarofauna della vite in Toscana. *Redia*, 69, 257–265.

Castagnoli, M., Liguori, M. 1987. Mites of grape-vine in Tuscany. In: Cavalloro, R. (Ed.), *Integrated Pest Control in Viticulture*. Proceedings of a Meeting of the EC

- Experts' Group, Portoferraio, 26–28 September, 1985. A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield, pp. 199–206.
- Castagnoli, M., Falchini, L. 1993. Suitability of *Polyphagotarsonemus latus* Banks Acari, Tarsonemidae as prey for *Amblyseius californicus* McGregor Acarina Phytoseiidae. *Redia*, 77, 273-279.
- Castagnoli, M., Simoni, S. 1994. The effect of different constant humidities on eggs and larvae of *Amblyseius californicus* (McGregor) (Acarina Phytoseiidae). *Redia*, 77, 349–359.
- Castagnoli, M., Ligurori, M., Nannelli, R. 1997. La popolazioni degli acari nei vigneti inerbiti del chianti: confronto tra cultivar. *Redia*, 80, 15-31.
- Castagnoli, M., Liguori, M., Simoni, S., Guidi, S. 1998. Tomato as host plant: effect on some biological parameters of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot and *Tetranychus urticae* Koch strains. *Redia* 81, 93-99.
- Castagnoli, M., Simoni, S., Biliotti, N. 1999. Mass-rearing of *Amblyseius californicus* (Acari: Phytoseidae) on two alternative food sources. In: Bruin, J., Geest, L.P.S., Sabelis, M.W. eds. *Ecology and Evolution of the Acari*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp 425-431.
- Castagnoli, M., Simoni, S. 2003. *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari Phytoseiidae): survey of biological and behavioural traits of a versatile predator. *Redia*, 86, 153–164.
- Cenzi, De Ré F., Loreto, E.L.S., Robe, L.J. 2010. Gene and species trees reveal mitochondrial and nuclear discordance in the *Drosophila cardini* group Diptera: Drosophilidae. *Invertebrate Biology*.no. doi: 10.1111/j.1744-7410.2010.00207.
- Chant, D.A. 1957. Descriptions of some phytoseiid mites (Acarina, Phytoseiidae). Part I. Nine new species from British Columbia with keys to the species of British Columbia. Part II. Redescriptions of eight species described by Berlese. *The Canadian Entomologist*, Canada, 89(7), 289–308.
- Chant, D.A. 1959. Phytoseiid mites Acarina: Phytoseiidae. Part I. Bionomics of seven species in southeastern England. Part II. A taxonomic review of the family Phytoseiidae, with descriptions of thirty-eight new species. *The Canadian Entomologist*, Canada, Supplement 12.

- Chant, D.A., Hansell, R.I.C., Yoshida-Shaul, E. 1974. The genus *Typhlodromus* Scheuten (Acarina: Phytoseiidae) in Canada and Alaska. *Canadian Journal of Zoology*, 52.
- Chant, D.A., 1985a. Systematics and taxonomic. In *Spider Mites : Their Biology, Natural Enemies and Control*. World Crop Pest. Vol. 1B, Helle W, Sabelis MW eds., Elsevier, 17-29.
- Chant, D.A., 1985b. External Anatomy. In *Spider Mites : Their Biology, Natural Enemies and Control*. World Crop Pest. Vol. 1B, Helle W, Sabelis MW eds., Elsevier, 5-9.
- Chant, D.A., Yoshida-Shaul, E. 1987. A world review of the pyri species group in the genus *Typhlodromus* Scheuten (Acari: Phytoseiidae). *Canadian Journal of Zoology*, Canada, 65(7),1770–1804.
- Chant, D.A., Yoshida-Shaul E. 1989. A world review of the tiliarum species group in the genus *Typhlodromus* Scheuten (Acari: Phytoseiidae). *Canadian Journal of Zoology*, 674, 1006–1046.
- Chant, D.A., McMurtry, J.A. 1994. A review of the sub-families Phytoseiinae and Typhlodrominae Acari: Phytoseiidae. *International Journal of Acarology*, 204, 223-310.
- Chant, D.A., McMurtry, J.A. 2003a. A review of the subfamilies Amblyseiinae Acari: Phytoseiidae: Part II. Neoseiulini new tribe. *International Journal of Acarology*, 29, 3-46.
- Chant, D.A., McMurtry J.A. 2003b. A review of the subfamilies Amblyseiinae Acari: Phytoseiidae: Part II. The tribe Kampimodromini. *International Journal of Acarology*, 29, 179-224.
- Chant, D.A., McMurtry J.A. 2004a. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma Acari: Phytoseiidae Part III. The tribe Amblyseiini Wainstein, subtribe Amblyseiina, N. subtribe. *International Journal of Acarology*, 30, 171-228.
- Chant, D.A., McMurtry, J.A. 2004b. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma Acari: Phytoseiidae Part IV. The tribe Amblyseiini Wainstein, subtribe Arrenoseiina Chant and McMurtry. *International Journal of Acarology*, 30, 291-312.

- Chant, D.A., McMurtry, J.A. 2005a. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma Acari: Phytoseiidae Part V. Tribe Amblyseiini, subtribe Proprioiseiopsina Chant and McMurtry. *International Journal of Acarology*, 31, 3-22.
- Chant, D.A., McMurtry, J.A. 2005b. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma Acari: Phytoseiidae Part VI. The tribe Euseiini N. tribe, subtribes Typhlodromalina, N. subtribe, Euseiina, N. subtribe and Ricoseiina, N. subtribe. *International Journal of Acarology*, 31, 187-224.
- Chant, D.A., McMurtry, J.A. 2005c. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma Acari: Phytoseiidae Part VII. Typhlodromipsini n. tribe. *International Journal of Acarology*, 31, 315-340.
- Chant, D.A., McMurtry J.A. 2006a. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma Acari: Phytoseiidae Part VIII. The tribes Macroseiini Chant, Denmark and Baker, Phytoseiulini n. tribe, Africoseiulini n. tribe and Indoseiulini Ehara and Amano. *International Journal of Acarology*, 32:13-25.
- Chant, D.A., McMurtry, J.A. 2006b. A review of the subfamily Amblyseiinae Muma Acari: Phytoseiidae Part IX. An overview. *International Journal of Acarology*, 32, 125-152.
- Chant, D.A., McMurtry J.A. 2007. Illustrated keys and diagnoses for the genera and subgenera of the Phytoseiidae of the world Acari: Mesostigmata. Indira Publishing House, pp 220.
- Charles, J.G., Collyer, E., White, V., 1985. Integrated control of *Tetranychus urticae* with *Phytoseiulus persimilis* and *Stethorus bifidus* in commercial raspberry gardens. *New Zealand Agriculture, Forestry and Horticulture*.
- Chatzivasileiadis, E.A., Sabelis, M.W. 1997. Toxicity of methyl ketones from tomato trichomes to *Tetranychus urticae* Koch *Experimental and Applied Acarology*, 21(6-7), 473-484.
- Chermiti, B. 1992 Biological control II: biological control of an artificial infestation of *Tetranychus urticae* Koch. using *Phytoseiulus persimilis* Athias- Henriot in a protected aubergine crop. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 57, 959-964.

- Chaudhri, W.M., Akbar, S., Rasool, A. 1979. Studies on the predatory leaf inhabiting mites of Pakistan. University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, pp 243.
- Chen, P.S., Baltzer, F. 1975. Morphology and biochemistry of diploid and androgenetic haploid merogonic hybrids. Pp. 424–445 in *The Sea Urchin Embryo—Biochemistry and Morphogenesis*, G. Czihak, ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Chen, W.J., Tsai, K.H., Cheng, S.L., Huang, C.G., Wu, W.J., 2010. Using in situ hybridization to detect endosymbiont Wolbachia in dissected tissues of mosquito host. *Journal of medical entomology*, 42(2), 120-124.
- Chittenden, A. R., Saito, Y. 2001. Why are there feeding and non-feeding larvae in phytoseiid mites? *J. Ethol.* 19, 55–62.
- Chomyn, A., Cleeter, M.W.J., Ragan, C I., Riley, M., Doolittle, R.F., Attardi, G. 1986. URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* 234, 614.
- Coiutti, C. 1993. Phytoseiid mites on spontaneous and cultivated trees in the Friuli-Venezia Giulia region [in Italian]. *Frustula Entomologica*, Italy, 16(29), 65–77.
- Collyer, E. 1964. Phytophagous mites and their predators in New Zealand orchards. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, New Zealand, 7, 551–568.
- Corino, L. 1989. Les acariens phytophages sur vigne en Italie: Evolution des populations et équilibres naturels avec les acariens prédateurs (Acarina: Phytoseiidae). *Annales Association Nationale de Protection des Plantes, Colloque sur les Acariens del Cultures*, 24–26 October, 1989, Montpellier, France, 1/1(2), 395–404.
- Corino, L., Duverney C. 1990. Distribution géographique des différentes espèces de Phytoseiidae et Thydeidae dans le vignoble valdotain. *Bullettin SROP - Section Regionale Ouest Palearctique*, Switzerland, 13 (7, i), 116–119.
- Costa, F.O., deWaard, J.R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R.T., Hajibabaei, M., Hebert, P.D.N. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 64, 272–295.

- Cracraft, J. 2002. The seven great questions of systematic biology: An essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*;89,127-144
- Croft, B.A. 1970. Comparative studies on four strains of *Typhlodromus occidentalis* Nesbitt (Acarina: Phytoseiidae). I. Hybridization and reproductive isolation studies. *Annals of the Entomological Society of America*, 43 (6),1558-1563.
- Croft, B.A. 1986. Immigration and colonization of portable apple trees by arthropod pests and their natural enemies. *Crop Protection*, 5, 376-384.
- Croft, B.A., Messing, R.H., Dunley, J.E., Strong, W.B. 1993. Effects of humidity on eggs and immatures of *Neoseiulus fallacis*, *Amblyseius andersoni*, *Metaseiulus occidentalis* and *Typhlodromus pyri* (Phytoseiidae): implications for biological control on apple, caneberry, strawberry and hop. *Experimental and Applied Acarology*, 17, 451-459.
- Croft, B.A., Monetti, L.N., Prat, P.D. 1998. Comparative life histories and predation types: are *Neoseiulus californicus* and *N. fallacis* Acari: Phytoseiidae similar type II selective predators of spider mites? *Environmental Entomology*, 27, 531-538.
- Croft, B.A., Blackwood, J.S., McMurtry, J.A. 2004 Classifying life-style types of phytoseiid mites: diagnostic traits. *Experimental and Applied Acarology*, 33,247–260.
- Cruickshank, R.H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology*, 7, 3-14.
- Dabert, M. 2006. DNA markers in the phylogenetics of the Acari. *Biological Letters*, 432, 97-107.
- Damiano, A. 1961. Elenco delle specie di insetti dannosi ricordati per la Libia fino al 1960. Amministrazioni della Tripolitania, Nazirato dell'Agricoltura, Sezione di Entomologia, Tripoli, Tipografia del Governo, 81 pp.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407-415.
- DeLeon, D.D. 1962. The cervices of some phytoseiid type specimens (Acarina: Phytoseiidae). *Acarologia* 4: 174-176.

- De Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In *Endless Forms: Species and Speciation*, (Howard, D. J. and Berlocher, S. H., eds) pp 57-75, Oxford University Press
- Denmark, H.A., Muma, M.H. 1970. Some phytoseiid mites of Paraguay Phytoseiidae: Acarina. *The Florida Entomologist*, 53, 219-227.
- Denmark, H.A., Muma, M.H., 1972. Some Phytoseiidae of Colombia Acarina: Phytoseiidae. *The Florida Entomologist*, 55, 19-29.
- Denmark, H.A. 1992. A revision of the genus *Typhlodromus* Scheuten (Acari: Phytoseiidae). *Occasional Papers of the Florida State Collection of Arthropods, USA*, 7, 1-43.
- Denmark, H.A., Evans, G.A., Aguilar H., Vargas C., Ochoa R. 1999. Phytoseiidae of Central America. Indira Publishing House, pp 125.
- Dergousoff, S.J., Chilton, N.B. 2007. Differentiation of three species of ixodid tick, *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* and *D. albipictus*, by PCR-based approaches using markers in ribosomal DNA. *Molecular and Cellular Probes* 21, 343-348.
- Dicke, M. 1998. Direct and indirect effects of plants on beneficial organisms. In: J. R. Ruberson, Editor, *Handbook of Pest Management*, Dekker, New York, pp. 105-153.
- Dong, H.F., Guo, Y.J., Niu, L.P. 1986. Biological control of the two spottedspider mites with *Phytoseiulus persimilis* on four ornamental plants ingreenhouses. *Chinese Journal of Biological Control*, 2, 59-62.
- Dosse, G. 1958. Die Spermathecae, ein zusatzliches Bestimmungsmerkmal bei Raubmilben (Acari, Phytoseiidae). *Pflanzenschutz Ber.* 20(1/2): 1-11.
- Downing, R.S., Moilliet, T.K. 1971. Occurrence of phytoseiid mites (Acarina: Phytoseiidae) in apple orchards in south central British Columbia. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* 68, 33-36.
- Drukker, B., Janssen, A., Ravensberg, W., Sabelis, M.W. 1997 Improved control capacity of the mite predator *Phytoseiulus persimilis* Acari:Phytoseiidae on tomato. *Experimental et Applied Acarology*, 21, 507-518.

- Drummond, A.J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir R., Stones-Havas S., Thierer T., Wilson A. 2007. Geneious v3.5, available from: <http://www.geneious.com/> accessed in March 2009.
- Duso, C., Sbrissa, F. 1990. Gli Acari fitoseidi (Acari Phytoseiidae) del melo nell'Italia settentrionale: distribuzione, biologia, ecologia ed importanza economica. Bolletino de Zoologia Agraria e Bachicoltura, Serie II, Italy, 22(1), 53–89.
- Duso, C., Camporese, P. 1991 Developmental times and oviposition rates of predatory mites *Typhlodromus pyri* and *Amblyseius andersoni* (Acari: Phytoseiidae) reared on different foods. Experimental and Applied Acarology, 13, 117–128.
- Duso, C., 1992. Role of the predatory mites *Amblyseius aberrans* (Oud.), *Typhlodromus pyri* Scheuten and *Amblyseius andersoni* (Chant) (Acari, Phytoseiidae) in vineyards. III. Influence of variety characteristics on the success of *A. aberrans* and *T. pyri* releases. Journal of Applied. Entomology, 114: 455–462.
- Duso, C., Torresan, L., Vettorazzo, E. 1993a. La vegetazione spontanea come riserva di ausiliari: considerazioni sulla diffusione degli Acari fitoseidi (Acari Phytoseiidae) in un vigneto e sulle piante spontanee contigue. Bolletino de Zoologia Agraria e Bachicoltura, Serie II, Italy, 25(2), 183–203.
- Duso, C., Pasqualetto, C. 1993b. Factors affecting the potential of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) as biocontrol agents in north-Italian vineyards. Experimental and Applied Acarology, 17,241–258
- Ehara, S.,Amano, H. 1993. *Neoseiulus californicus* (McGregor). In: Ehara, S. (ed.) Plant Mites of Japan in Colors. Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai, Tokyo, pp.10-11
- Escudero, L.A., Ferragut, F. 2005. Life-history of predatory mites *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus persimilis* Acari: Phytoseiidae on four spider mite species as prey, with special reference to *Tetranychus evansi* Acari: Tetranychidae. Biological Control, 32, 378-384.
- Essig, H., Rinder R., Gothe M., Zahler D. 1999. Genetic differentiation of mites of the genus *Chorioptes* (Acari: Psoroptidae). Experimental and Applied Acarology, 23, 309–318.
- Evans, G.O. 1953 On some mites of the genus *Typhlodromus* Scheuten, 1857, from S. E. Asia. Annual Magazine of Natural History, London, 6, 449–467.

- Evans, J.D., Lopez D.L. 2002. Complete mitochondrial DNA sequence of the important honey bee pest, *Varroa destructor* Acari: Varroidae. *Experimental and Applied Acarology*, 27, 69-78.
- Evans, K.M., Wortley, A.H., Mann, D.G. 2007. An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist* 158, 349–364.
- Farris, J.S. 1981. Distance data in phylogenetic analysis. In *Advances in cladistics*. Vol. 1. Edited by V.A. Funk and D.R. Brooks. New York Botanical Garden, New York. pp. 3–23.
- Farris J.S. 1985. Distance data revisited. *Cladistics*, 1, 67–85.
- Farris J.S. 1986. Distances and statistics. *Cladistics*, 2, 144–157.
- Farris J.S. 1990. Phenetics in camouflage. *Cladistics*, 6, 91–100.
- Farris, J.S. , Albert, V.A., Källersjö, M., Lipscomb, D., Kluge, A.G. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics*, 12, 99–124.
- Fauvel, G., Rambier, A., Cotton, D. 1975. Activité prédatrice et multiplication d'*Orius* (*Heterorius*) *vicinus* (Het.: Anthocoridae) dans les galles d'*Eriophyes fraxinivorus* (Acarina: Eriophyidae). *Entomophaga*, 23(3), 261–270.
- Fauvel G., Cotton D. 1981. Evolution des populations de typhlodromes, *Amblyseius aberrans* essentiellement, dans une haie d'ormes et un verger de pommiers et observations de leur transport par le vent. In *Proc. 6e journée phytiairie. Phytopharmacie. Circummediterraneennes*. J. Lhoste (ed.), pp. 471–479. Technic Offset pub. St Georges d'Orques.
- Ferguson, J.W.H. 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75, 509–516.
- Ferragut, F., Garcia-Mari F., Costa-Comelles J., Laborda R., 1987. Influence of food and temperature on development and oviposition of *Euseius stipulatus* and *Typhlodromus phialatus* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology* 3, 317-329.
- Ferragut, F., Costa-Comelles, J., García-Marí, F., Laborda, R., Roca, D., Marzal, C. 1988. Dinámica poblacional del fitoseido *Euseius stipulatus* (Athis-Henriot) y su

- presa *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae), en los cítricos españoles. Bol San Veg Plagas 14:45–54
- Ferragut, F., Laborda, R., Costa-Comelles, J. 1992. Feeding behaviour of *Euseius stipulatus* and *Typhlodromus phialatus* on the citrus red mite *Panonychus citri* Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae. Entomophaga, 37 4, 537-543.
- Ferragut, F., Escudero, A. 1997. Taxonomy and distribution of predatory mites belonging to the genus *Euseius* Wainstein 1962, in Spain Acari, Phytoseiidae. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas, 23, 227-235.
- Ferrero, 2009. Le système tritrophique tomate-tétranyques tisserans-*phytoseiulus longipes* : étude de la variabilité des comportements alimentaires du prédateur et conséquences pour la lutte biologique. MontpellierSupAgro,Thèse 228p.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3, 294–299.
- Fowler-Walker, M.J., Wernberg, T., Connell, S.D. 2006. Differences in kelp morphology between wave sheltered and exposed localities: morphologically plastic or fixed traits? Marine Biology, 148, 755-767.
- Funk, D.J., Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 34, 397–423.
- Furtado, I.P., Moraes, G.J., Kreiter, S., Tixier, M.S., Knapp, M., 2007. Potential of a Brazilian population of the predatory mite *Phytoseiulus longipes* as a biological control agent of *Tetranychus evansi* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). Biological Control, 42, 139-147.
- García-Marí, F., Ferragut, F., Costa-Comelles, J., Laborda, R. 1983. El ácaro rojo *Panonychus citri* (McGregor): incidencia en la problemática fitosanitaria de nuestros agrios. Boletín de sanidad vegetal, Plagas 9,191–218.
- García-Marí, F., Ferragut, F., Marzal, C., Costa-Comelles, J., Laborda, R. 1986. Ácaros que viven en las hojas de los cítricos españoles. Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales, 1, 219–250
- Gewin, V. 2002. All living things on line. Nature, 418, 362-363.

- Gellissen, G., Bradfield, J.Y., White, B.N, Wyatt, G.R. 1983 Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of a locust. *Nature* 301, 631–634.
- Genini, M., Klay, A., Baumgärtner, J., Delucchi, V. and Baillod, M. 1991. Etudes comparatives de l'influence de la température et de la nourriture sur le développement de *Amblyseius andersoni*, *Neoseiulus fallacis*, *Galendromus longipilus* et *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). *Entomophaga* 36, 139–154.
- Gonzalez, R.H. 1961. Contribucion al conocimiento de los acaros del manzano en Chile central. *Boletim Tecnico. Estacion Experimental Agronomica. Universidad de Chile, Facultad de Agronomia, Chile*, 11, 1–58.
- Gotoh, T., Nozawa, M., Yamaguchi, K. 2004. Prey consumption and functional response of three acarophagous species to eggs of the two-spotted spider mite in the laboratory. *Applied. Entomology and Zoology*, 39, 97–105.
- Gotoh, T., Akizawa, T., Watanabe, M., Tsuchiya, A., Shimazaki, S. 2005. Cold hardiness of *Neoseiulus californicus* and *N. womersleyi* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of the Acarological Society of Japan*, 14, 93–103
- Gotoh, T., Tsuchiya, A., Kitashima, Y. 2006. Influence of prey on developmental performance, reproduction and prey consumption of *Neoseiulus californicus* Acari: Phytoseiidae. *Experimental and Applied Acarology*, 40, 189–204.
- Gotoh, T., Araki R., Boubou, A., Migeon, A., Ferragut, F., Navajas, M. 2009 Evidence of co-specificity between *Tetranychus evansi* and *Tetranychus takafujii* (Acari: Prostigmata, Tetranychidae): comments on taxonomic and agricultural aspects. *International Journal of Acarology*, 35 (6), 485-501.
- Gough, N. 1991. Long-term stability in the interaction between *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis* producing successful integrated control on roses in southeast Queensland. *Experimental and applied Acarology*, 12, 833–101.
- Gould, H.J., Hussey, N.W., Parr, N.J. 1969. Large scale control of *Tetranychus urticae* Koch on cucumbers by the predator *Phytoseiulus persimilis* A.H. In: Evans, G.O. (ed.) *Proceedings of the 2nd International Congress of Acarology*, Sutton Bonington, England, 19-25 July, 1967. *Akademiai Kiado, Budapest*, pp. 383-388.

- Grafton-Cardwell, E.E., Ouyang, Y.L., Striggow, R.A. 1997. Predaceous mites Acari: Phytoseiidae for control of spider mites Acari: Tetranychidae in nursery citrus. *Environmental Entomology*, 26,121–130.
- Grant, W.S., Bowen, B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89, 415–427.
- Greco, N. M., Sanchez, N. E. , Liljesthrom, G. G. 2005. *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) as a potential control agent of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): effect of pest/predator ratio on pest abundance of strawberry. *Experimental and Applied Acarology*, 37, 57–66
- Greenstone, M.H., Rowley, D.L., Heimbach, U., Lundgren, J.G., Pfannenstiel, R.S., Rehner S.A. 2005. Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders. *Molecular Ecology*, 14, 3247–3266.
- Guichou, S., Tixier, M.S., Kreiter, S. 2006. Assessment of morphological and molecular variation among strains of the species *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae). *Proceedings of the International Congress of Acarology, Amsterdam, August 2006, In press.*
- Gunthart, E. 1957. Neues uber Auftreten und Bekampfung der Spinnmilben an Reben. *Schweizerische Zeitschrift fur Obst- und Weinbau, Switzerland*, 66, 231–236.
- Gunthart, E. 1960. Uber das Auftreten von Spinnmilben (Tetranychidae) und Raubmilben (Phytoseiinae, Acari) in der Schweiz. *Proceedings of the IV International Congress of CropProtection, Hamburg, 1957, Germany*, pp. 927–928.
- Gutierrez, J., Kreiter, S., Bolland, H.R., Cotton, D. 1989. Cinq especes de Tenuipalpidae (Acari, Tetranychoida) vivant en France sur conifères et trois de leurs prédateurs caryotype d'Oligomerismus oregonensis. *Acarologia*, 30(1), 51–58.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N. 2006a. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103, 968–971.

- Hajibabaei, M., Smith, M.A., Janzen, D.H., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B., Hebert, P.D.N., 2006b. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6, 959–964.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Clare, E.L., Hebert, P.D.N. 2007a. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology* 5 24 doi:10.1186/1741-7007-5-24.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D.A. 2007b. DNA barcoding: how it complements taxonomy; molecular phylogenetics and population genetics, 23, 167–172.
- Hamlen, A. R., Lindquist, R. K. 1981. Comparison of two *Phytoseiulus* species as predators of twospotted spider mites on greenhouse ornamentals. *Environmental Entomology*. 10, 524-527.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., De Waard, J.R. 2003a. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B biological Sciences*, 270Suppl., S96–S99.
- Hebert, P.D.N, Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 14812–14817.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, L.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2, 10, e312.
- Hebert, P.D.N., Gregory, T.R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 852–859.
- Helle, W., Sabelis M.W 1985a. Spider Mites. Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. IB. Elsevier, Amsterdam, 458 pp.

- Helle, W., Pijnacker L.P. 1985b. Parthenogenesis, chromosomes and sex. In Spider mites - Their Biology, Natural Enemies and Control. Vol 1A. Edited par Helle W. & Sabelis M.W., Elsevier, Amsterdam, Pays Bas : 129-139.
- Hennig, W. 1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana, Illinois, USA. 263 pp.
- Hemmerter, S., Šlapeta, J., Beebe, W.L. 2009. Resolving genetic diversity in Australasian *Culex* mosquitoes: Incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50 (2), 317-325.
- Hickerson, M.J., Meyer, C., Moritz, C. 2006. DNA-Barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology* 55, 729-739
- Hillis, D.M. 1996. Inferring complex phylogenies. *Nature*, 383, 130–131.
- Hinomoto, N., Takafuji, A. 2001. Genetic diversity and phylogeny of the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai*, in Japan. *Experimental and Applied Acarology*, 25, 355–370.
- Hogg, I.D., Hebert, P.D.N. 2004. Biological identification of springtails Hexapoda: Collembola from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 825, 749–754.
- Holder, M., Lewis P.O. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature reviews*, 4, 275-284.
- Hoy, M.A, Groot, J.J.R, Van De Baan, H.E 1985. Influence of aerial dispersal on persistence and spread of pesticide-resistant *Metaseiulus occidentalis* in California almond orchards. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 37:17–32
- Hudson, R.R., Turelli, M. 2003. Stochasticity overrules the "three-times rule: genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. *Evolution*, 57, 182-190.
- Hurtado, M.A., Ansaloni, T., Cros-Arteil, S., Jacas, J.A., Navajas, M. 2007. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites Prostigmata : Tetranychidae occurencing in citrus orchards in Eastern Spain : use for species discrimination. *Annals of Applied Biology*, 153, 167-174.

- Hoying, S.A., Croft, B.A. 1977. Comparisons between populations of *Typhlodromus longipilus* Nesbitt and *T. occidentalis* Nesbitt: taxonomy, distribution and hybridization. *Annals of Entomological Society of America*, 70(1), 150-159.
- Ito, K., Fukuda, T. 2009. Molecular phylogeny of *Stigmaeopsis* spider mites (Acari: Tetranychidae) based on the Cytochrome Oxidase subunit I (COI) region of mitochondrial DNA 2009. *Applied Entomology and Zoology*, 44 (3), 343-355.
- Ivancich-Gambaro, P. 1972. I trattamenti fungicidi e gli acari della vite. *L'Informatore Agrario*, Verona, 8, 3 pp.
- Ivancich-Gambaro, P.1973. Il ruolo del *Typhlodromus aberrans* Oudm. (Acarina: Phytoseiidae) nel controllo biologico degli acari fitofagi dei vigneti del Veronese. *Bolletino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, Ser. II, 11, 151–165.
- Ivanova, N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7, 544–548.
- Jarošík, V. 1990. *Phytoseiulus persimilis* and its prey *Tetranychus urticae* on glasshouse cucumbers and peppers: key factors related to biocontrol efficiency. *Acta Entomologica. Bohemoslov.* 87, 414–30
- Jeyaprakash, A., Hoy M.A. 2002. Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design amolecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids Acari:Phytoseiidae. *Biological Control*, 25, 136-142.
- Jeyaprakash, A., Hoy M.A. 2010. A DNA extraction procedure that allows mite specimens to be slide mounted: phytoseiid species evaluated as a model. *Experimental and applied acarology* Doi 10.1007/s10493-010-9357-9.
- Johanowicz, D.L., Hoy, M.A. 1996. *Wolbachia* in a predator–prey system: 16S ribosomal DNA analysis of two phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). *Annals of Entomological Society of America*, 89, 435–441.
- Johns, G.C., Avise, J.C. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 1481–1490.
- Jordal, B.H., Hewitt, G. M. 2004. The origin and radiation of macaronesian beetles breeding in *Euphorbia*: The relative importance of multiple data partitions and population sampling. *Systematic Biology*, 53, 711–734.

- Jung, C., Croft B.A 2001. Aerial dispersal of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae): estimating falling speed and dispersal distance of adult females. *Oikos* 94,182–190.
- Kanouh, M., Tixier, M.S., Guichou, S., Cheval, B., Kreiter, S. 2010a. Two synonymy cases within the genus *Neoseiulella* Acari: Phytoseiidae: is the molecular evidence so evident ? *Biological Journal of Linnean Society*, 101, 323–344.
- Kanouh, M., Tixier MS., Okassa, M., Kreiter, S. 2010b. Phylogenetic and biogeographic analysis of the genus *Phytoseiulus* Acari: Phytoseiidae. *Zoologica Scripta*, 39, 450–461.
- Karg, W. 1982. Diagnostic and systematics of predatory mites of the family Phytoseiidae Berlese in orchards. *Zoologische Jahrbucher Systematik*, 109, 188-210.
- Karg, W. 1983 Systematische untersuchung der Gattungen und Untergattungen der Raubmilbenfamilie Phytoseiidae Berlese, 1916, mit der beschreibung von 8 neuen Arten. *Mitteilungen Zoologisches Museum in Berlin Germany*, 59, 293-328.
- Katayama, H., Masui, S., Tsuchiya, M., Tatara, A., Doi, M., Kaneko, S., Saito, T. 2006. Density suppression of the citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) due to the occurrence of *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) on Satsuma mandarin. *Applied Entomology Zoology*, 41, 679–684.
- Kazak, C. 2006. Developmental and reproductive performance of *Phytoseiulus persimilis* (Phytoseiidae) from Hatay on a diet of *Tetranychus cinnabarinus* eggs (Tetranychidae) at four constant temperatures. 12th International Congress of Acarology. Amsterdam, The Netherlands, 21-26 August, Book of Abstracts, pp 89-90
- Kazak, C. 2008. The development, predation, and reproduction of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) from Hatay fed on *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval (Acari: Tetranychidae) larvae and protonymphs at different temperature, *Turkish Journal of Zoology* 32, 407–413
- Kennedy, G.G 2003. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the geis *Lycopersicon*. *Annual Review of Entomology* 48: 51-72.

- Kennett, C.E., Caltagirone, L.E. 1968. Biosystematics of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acarina: Phytoseiidae). *Acarologia* 10(4), 563–577.
- Klompen, H. 2000. A preliminary assessment of the utility of elongation factor-1 in elucidating relationships among basal Mesostigmata. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 805-820.
- Klompen, H., Lekveishvili, M., Black, W.C. IV. 2007. Phylogeny of Parasitiform mites (Acari) based on rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 936-951.
- Kolodochka, L.A. 1979. Four new species of phytoseiid mites of the fauna of USSR Parasitiformes, Phytoseiidae. *Vestnik Zoologii*, 5, 32-40.
- Kolodochka, L.A. 2003. A new species of the genus *Kampimodromus* (Parasitiformes, Phytoseiidae) from Ukraine from Ukraine and Moldova. *Acarina* 11(1), 51–55.
- Kolodochka L.A., 2005. A new species of the genus *Kampimodromus* Parasitiformes, Phytoseiidae from Crimea. *Acarina*, 131, 23-27.
- Konakandla, B., Park, Y. , Margolie, D. 2006. Whole genome amplication of Chelex-extracted DNA from a single mite: a method for studying genetics of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. *Experimental. Applied. Acarology*. 40, 241–247
- Kostiainen, T., Hoy, M.A. 1994. Genetic improvement of *Amblyseius finlandicus* (Acari: Phytoseiidae): laboratory selection for resistance to azinphosmethyl and dimethoate. *Experimental and Applied Acarology*. 18: 469-484.
- Kostiainen, T., Hoy, M.A. 1996. The Phytoseiidae as Biological Control Agents of Pest Mites. A Bibliography 1960-1994 . University of Florida, IFAS Publication, Florida Agricultural Experiment Station, Monograph 17. pp 355.
- Krantz, G.W. 1973. Dissemination of *Kampimodromus aberrans* by the filbert aphid. *Journal of Economic Entomology* 66(2), 575-576.
- Krantz, G.W. 1978. A manual of Acarology, second edition. Oregon State University Book Stores, INC. Oregon State University, Corvallis, Oregon . 509 pp.
- Kreiter, S., Brian F. 1987. Les Phytoseiidae de la vigne en France. Proceeding from International Conference on Pests in Agriculture 1– 3 Decembre 1987 - Palais des Congres- Paris, France, 6(3), 241–249.

- Kreiter, S. 1991. Les caractéristiques biologiques des acariens prédateurs d'acariens et leur utilisation en lutte biologique. Programme Agriculture Viticulture. 108(11), 247–261.
- Kreiter, S., Tixier M.S., Auger P., Muckensturm N., Sentenac G., Doublet B., Weber M. 2000. Phytoseiid mites of vineyards in France (Acari: Phytoseiidae). *Acarologia* 41(1–2), 77–96.
- Kreiter, S., Tixier M.S., Croft, B.A., Auger, P., Barret, D. 2002. Plants and leaf characteristics influencing the predaceous mite, *Kampimodromus aberrans* (Oudemans), in habitats surrounding vineyards (Acari: Phytoseiidae). *Environmental Entomology*, 31(4), 648-660.
- Kreiter, S., Tixier, M.S., Ferragut, F., Allam, L., Lebdi, G.K. 2004. Preliminary observations on the diversity of phytoseiid mites in the Maghreb and comparisons to the fauna of Gran Canaria. *Phytophaga*, 14, 477-484.
- Kreiter, S., M.S., Tixier, Barbar. Z. 2005. Les phytoséiides se mettent en quatre. Les différentes catégories fonctionnelles de ces prédateurs et leur utilité en agriculture en France. *Phytoma La Défense des Végétaux*, 586, 42-46.
- Kreiter, S., Tixier, M.S. 2006. A new genus and species of phytoseiid mites Acari : Mesostigmata from southern Tunisia , with discussion of its phylogenetic position. *Zootaxa*, 1237, 1-18.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M. 2007. Mega 3.1: Molecular evolutionary genetics analysis.
- Laing, J.E. 1968. Life history and life table of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot. *Acarologia*, 10: 578-88.
- Lefebure, T., Douady, C.J., Gouy, M., Gibert, J. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40, 435–447.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Wysor, B., De Clerck O. 2009. DNA taxonomy in morphologically plastic taxa: algorithmic species delimitation in the *Boodlea* complex (Chlorophyta: Siphonocladales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 122–133.

- Liguori, M. 1987. Andamento delle popolazione di Acari fitofagi e predatori in due vigneti delChianti. Redia, Italy, 70, 141–149.
- Liguori, M., Castagnoli M. 1989. Associations d'acariens sur la vigne en Toscane: repartition et fluctuation des populations sur les feuilles, les écorces et les herbes au pied des ceps. In: Cavalloro, R. (Ed.), Influence of Environmental Factors on the Control of Grape Pests, Diseases and Weeds. Proceedings of a Meeting of the EC Experts'Group, Thessaloniki, Greece, 6–8 October, 1987. A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield, pp. 181–189.
- Liguori, M., Guidi, S. 1995. Influence of different constat humidities and temperatures on eggs and larvae of a strain of *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa (Acari: Phytoseiidae). Redia, 78, 321-329.
- Linares, M.C., Soto-Calderon, I.D., Lees, D.C., Anthony, N.M. 2009. High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: a test of theDNA barcoding approach. Molecular Phylogenetics and Evolution, 50, 485-495.
- Lindquist, E., Evans, G.W. 1965. Taxonomic concepts in the Ascidae, with a modified setal nomenclature for the idiosoma of the Gamasina Acarina: Mesostigmata. Memorium of the Entomological Society of Canada, 47, pp 64.
- Lindquist, E.E., Krantz, G.W., Walter, D.E. 2009. Classification. In: G.W. Krantz and D.E. Walter, Editors, A Manual of Acarology, Texas Tech University Press, Lubbock, pp. 97–103.
- MacRae, I.V., Croft, B.A. 1993. Influence of temperature on interspecific predation and cannibalism between *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) and *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae). Environmental Entomology. 22, 770–775.
- Maddison, W.P., Maddison D.R. 2009. Mesquite: a Modular System for Evolutionary Analysis. Version 2.72 <http://mesquiteproject.org>. Accessed in July 2010.
- Madsen, B.J., Morgan, C.V.G. 1975. Mites and insects collected from vineyards in the Okanagan and Similkameen Valleys, British Columbia. Journal of the Entomological Society of British Columbia, 72, 9–14.
- Mahr, D.L., McMurtry, J.A., 1979. Cross-breeding studies involving populations of *Typhlodromus citri* Garman and *McGregor, T. arboreus* Chant, and a sibling

- species of each (Mesostigmata: Phytoseiidae). *International Journal of Acarology*, 5, 155–161.
- Mallet, J., Willmott, K. 2003. Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 57–59.
- Malais, M.H., Ravensberg W.J. 2003. *Knowing and Recognizing: the Biology of Glasshouse Pests and Their Natural Enemies*. Koppert B.V. and Reed Business Information. 288 pp.
- Maluf, W.R., Campos, G.A., Das Gracas Cardoso, M. 2001. Relationships between trichome types and spider mite (*Tetranychus evansi*) repellence in tomatoes with respect to foliar zingiberene contents *Euphytica*, 121(1), 73-80.
- Marangi, M. 2009. Phylogenetic relationship between *Dermanyssus gallinae* populations in European countries based on mitochondrial COI gene sequences *Experimental and Applied Acarology*, 48 (1-2), 143-155.
- Mathys, G. 1956. Protection de la faune utile et applications de produits chimiques dans la lutte contre 'araignee rouge de la vigne. *Revue Romande d'Agriculture, de Viticulture et d'Arboriculture*, 5, 3–5.
- Mathys, G. 1958. The control of phytophagous mites in Swiss vineyards by *Typhlodromus* species. *Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology*, Montreal, Aug. 17–25, 1956, Canada, 4, 607–610.
- Matthysse, J.G., Denmark, H.A. 1981. Some phytoseiids of Nigeria *Acarina: Mesostigmata*. *The Florida Entomologist*, 64, 340-357.
- Mayden, R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. Pages 381–424 in *Species: The units of biodiversity* (M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson, eds.). Chapman and Hall, London.
- Mayden, R.L. 1999. Consilience and a hierarchy of species concepts: Advances toward closure on the species puzzle. *Journal of Nematology*, 31, 95– 116.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press.

- McCartney, M.A., Keller, G., Lessios, H.A. 2000. Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology*, 9, 1391–1400.
- McClanahan, R.J. 1968. Influence of temperature of the reproductive potential of two mite predators of the twospotted spider mite. *The Canadian Entomologist*, 100, 549-556.
- McGregor, E.A. 1954. Two new mites in the genus *Typhlodromus* (Acarina: Phytoseiidae). *Southern California Academy of Science Bulletin* 53, 89–92
- McMurtry, J.A., Huffaker C.B., Van de Vrie M. 1970. Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: a review. I. Tetranychid enemies: their biological characters and the impact of spray practices. *Hilgardia*, 40, 331-390.
- McMurtry, J.A., Mahr, D.L., Johnson, H.G. 1976. Geographic races in the predaceous mite, *Amblyseius potentillae* (Acari: Phytoseiidae). *International Journal of Acarology*, 2, 23–28.
- McMurtry, J.A., Oatman, E.R., Phillips, P.A., Wood, C.W. 1978. Establishment of *Phytoseiulus persimilis* [Acari-Phytoseiidae] in Southern-California. *Entomophaga*, 23, 175–179.
- McMurtry, J.A. 1982. The use of phytoseiids for biological control: progress and future prospects. In: Hoy, M.A. (Ed.), *Recent advances in knowledge of the Phytoseiidae*. Division of Agricultural Sciences, University of California, USA, Publ. 3284, pp. 23–48.
- McMurtry, J.A. 1983. Phytoseiid mites from Guatemala, with descriptions of two new species and redefinitions of the genera *Euseius*, *Typhloseiopsis*, and the *Typhlodromus occidentalis* species group Acari: Mesostigmata. *International Journal of Entomology*, 25, 249-272.
- McMurtry, J.A., Rodriguez. J.G. 1987. Nutricional ecology of phytoseiid mites. From *Nutritional Ecology of Insects, mites and spiders*. Edited by F. Slansky and T.G.Rodriguez. Chapter 19:609-644. *Moldova. Acarina* 11(1), 51–55.
- McMurtry, J.A., Badii, M.H. 1989. Reproductive compatibility in widely separated populations of three species of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae). *Pan-Pacific Entomologist*, 65(4), 397–402.

- McMurtry, J.A. 1991. Augmentative releases to control mites in agriculture. In *Modern Acarology*, Vol. 1, ed. F Dusbabek, V Bukva, pp. 151–57. Prague: Academia; The Hague: SPB Academic Publ. pp 651.
- McMurtry, J.A. 1992. Dynamics and potential impact of generalist' phytoseiids in agroecosystems and possibilities for establishment of exotic species. *Experimental and Applied Acarology*, 14: 371-382.
- McMurtry, J.A., Croft B.A. 1997. Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annual Review of Entomology*, 42, 291-321.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., Peter, K.L.N. 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A tale of high Intraspecific variability and low identification success. *Systematic biology*, 55, 715-728.
- Meier, R. 2008. DNA sequences in taxonomy: opportunities and challenges. In *The New Taxonomy*. Edited by: Wheeler QD. CRC Press, Taylor and Francis Group, 95-127. .
- Meshkov, Y.I. 1991. *Euseius amissibilis* sp.n. Parasitiformes, Phytoseiidae, a new species of mite from Tadjikistan. *Zoologicheskii Zhurnal*, 70, 138-140.
- Messelink G.J., van Steenpaal S.E.F, van Wensveen W., 2005. *Typhlodromips swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae): a new predator for thrips control in greenhouse cucumber, *IOBC/WPRS Bulletin* 28 (1), 183–186
- Messelink, G.J., van Steenpaal, S.E.F, Ramakers, P.M.J. 2006. Evaluation of phytoseiid predators for control of western flower thrips on greenhouse cucumber. *Biological Control*, 51, 753–768
- Messelink, G.J, van Maanen, R., van Steenpaal, S.E.F, Janssen, A. 2008 Biological control of thrips and whiteflies by a shared predator: two pests are better than one. *Biological Control* 44:372–379
- Messing, R.H., Croft B.A. 1991. Biosystematics of *Amblyseius andersoni* and *A. potentillae* (Acarina: Phytoseiidae): implications for biological control. *Experimental and Applied Acarology*, 10, 267-278.
- Meszaros, A., Tixier, M.S., Cheval, B., Barbar, Z., Kreiter, S. 2007. Cannibalism and intraguild predation in *Typhlodromus exilaratus* Ragusa and *T. phialatus* Athias-

- Henriot (Acari: Phytoseiidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 41(1-2), 37-43.
- Meyer, C.P., Paulay G. 2005. DNA Barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), 424.
- Michelatti, G., Pinoggi, G., Schreiber, G., Mozzone, G.C.1994. Esperienze di lotta razionale contro l'eriofide del nocciolo (*Phytocoptella avellanae* Nal.) condotte nell'arco di un quinquennio in Piemonte. *Acta Horticulture, International Society for Horticultural Science, Belgium*, 351, 575–581.
- Miller, K.B., Alarie, Y., Wolfe, G.W., Whiting, M.F. 2005. Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* Motschulsky Coleoptera: Dytiscidae. *Systematic Entomology*, 30,499–509.
- Mitani, H., Takahashi, M., Masuyama, M., Fukunaga, M. 2007. *Ixodes philipi* (Acari : ixodidae): Phylogenetic status inferred from mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene sequence comparison. *Journal of Parasitology*, 93 (3), 719-722.
- Moraes, G.J, McMurtry, J.A. 1981. Biology of *Amblyseius citrofolius* (Acarina: Phytoseiidae). *Hilgardia*, 49,1-129.
- Moraes, G.J., McMurtry, J.A., Denmark, H.A. 1986. A catalog of mite family Phytoseiidae: references to taxonomy, synonymy, distribution and habitat. *Embrapa-Ddt-Pub.*,353 pp.
- Moraes, G.J. de, Alencar, J.A.de, Lima, J.L.S., Yaninek, J.S., Delalibera, Jr. I. 1993. Alternative plant habitats for common phytoseiid predators of the cassava green mite (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae) in northeast Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 17, 77–90.
- Moraes, G.J., McMurtry, J.A., Denmark, H.A., Campos, C.B. 2004. A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. *Zootaxa*, 434, 1-494.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. *Evolution*, 49, 718 726.
- Morelli, M., Spicer, G.S. 2007. Cospeciation between the nasal mite *Ptilonyssus sairae* (Acari: Rhinonyssidae) and its bird hosts. *Systematic and Applied Acarology*, 12, 179-188.

- Moritz, C., Cicero, C. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls PLoS Biology, 210, e354.
- Muma, M.H., Denmark, H.A., De Leon, D. 1970. Phytoseiidae of Florida. Arthropods of Florida and neighboring land areas, 6. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, USA, pp 150.
- Murrell, A., Campbell, N. J. H., Barker, S. C. 1999. Mitochondrial 12S rDNA indicates that the Rhipicephalinae (Acari: Ixodida: Ixodidae) is paraphyletic. Molecular Phylogenetics and Evolution 12, 83–86.
- Murrell, A., Campbell, N. J. H., Barker, S. C. 2000. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus Rhipicephalus is paraphyletic. Molecular Phylogenetics and Evolution 16 ,1–7.
- Narita, S., Nomura, M., Kageyama, D. 2007. Naturally occurring single and double infection with Wolbachia strains in the butterfly *Eurema hecabe*: transmission efficiencies and population density dynamics of each Wolbachia strain. FEMS Microbiology Ecology, 61, 235–245.
- Navajas, M., Gutierrez, J, Bonato, O., Bolland H. R., Mapangou-Divassa, S. 1994. Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. Experimental and Applied Acarology 18, 351–360
- Navajas, M., Gutierrez, J., Lagnel, J., Boursot, P. 1996. Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites : a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. Bulletin of Entomological Research, 86, 407-417.
- Navajas, M., Lagnel J., Fauvel G., Moraes G.J. de 1999. Sequence variation of Ribosomal Internal Transcribed Spacer ITS in commercially important Phytoseiidae mites. Experimental and applied acarology, 23, 851–859.
- Navajas, M., Fenton, B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology. Experimental and Applied Acarology, 24, 751-774.
- Navajas, M., Gutierrez, J., Gotoh, T. 2001 Synonymy between two spider mite species: *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangea* (Acari: Tetranychidae), shown by

- ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments. *Bulletin of Entomological Research*, 91, 117-123.
- Navajas, M., Anderson, D., Guzman, L.I, Huang, Z., Clement, J., Zhou, T., Leconte, Y. 2010. New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie*, 41, 181–193.
- Navia, D., Moraes G.J., Lofego, A.C., Flechtmann, C.H.W. 2005. Acarofauna associada a frutos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) de algumas localidades das Américas. *Neotropical Entomology*, 34, 349-354.
- Nee, S. 1994. Extinction rates can be estimated from molecular phylogenies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London .Biological Sciences*, 344, 77–82.
- Neigel, J., Domingo, A., Stake, J. 2007. DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. *Coral Reefs*, 26, 487–499.
- Nicotina, M., Ragusa, Di Chiara, S., Viggiani, G. 1990. Acari fitoseidi in alcuni vigneti della Campania e del Lazio. *L'Informatore Agrario*, 19, 75–76.
- Nicotina, M., Tsolakis, H. 1994. Ulteriori indagini sugli acari fitoseidi della vite in Campania. *Atti XVII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*, Udine, 13–18 June, 1994, Italy, pp. 663–666.
- Nicotina, M. 1996a. Acari fitoseidi associati alla vite nei vigneti del Lazio. *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri*, Italy, 52, 117–130.
- Nicotina, M. 1996b. Phytoseiid mites (Phytoseiidae) associated with vines in vineyards of the Campania Region. In: Mitchell, R., Horn, D.J., Needham, G.R. & Welbourn, W.C. (Eds.), *Acarology IX. Proceedings, USA*, 1, pp. 237–240.
- Nicotina, M., Cioffi, E. 1998. Distribution of phytoseiid mites (Acarina: Phytoseiidae) in hazelnut- growing areas in Campania. *Redia*, 81, 115–124.
- Nicotina, M. 1999. Acari fitoseidi (Acarina, Phytoseiidae) della vite nel Centro-Sud Italia: dieci anni di studi faunistici. *Informatore Fitopatologico*, Italy, 11, 30–35.
- Nicotina M., Cioffi E., 2000. Acari fitoseidi della vite in tre vigneti del Centro-Sud Italia. Rapporti tra dinamiche di popolazione, temperatura e calendari dei trattamenti fitosanitari. *AttiGiornate Fitopatologiche*, Italy, 1, 479–486.

- Nielsen, R., Matz, M. 2008. Statistical approaches for DNA barcoding. *Systematic Biology*, 55(1), 162-169
- Niogret, J., Nicot, A. 2007. Combination of morphological characters and ITS-sequence to characterize a new species *Macrocheles* Acari: Macrochelidae. *Zootaxa*, 1873, 39-49.
- Niogret, J., Nicot, A. 2008. Combined approach using morphology and ITS-sequence for description of three new species of *Macrocheles* Acari: Macrochelidae. *Zootaxa*, 1386, 19-29.
- Noranha, A.C.S, Moraes de, G.J. 2004. Reproductive compatibility between mite populations previously identified as *Euseius concordis* (Acari:Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology* 32 (4) 271-279;
- Norris, D. E., Klompen J. S. H., Black W. C. 1999. Comparison of the mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA genes in resolving phylogenetic relationships among hard ticks (Acari: Ixodidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 92, 117–129
- Nucifora, A., Inserra, R. 1967. Il *Panonychus ulmi* (Koch) nei vigneti dell'Etna. *Entomologica*, Italy, 3, 177–236.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck J.P., Nieves-Aldrey J.L. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, 53, 47–67.
- Okassa, M, Tixier, M.S., Kreiter, S. 2010. Morphological and molecular diagnostic of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* Acari : Phytoseiidae. *Experimental and Applied Acarology*, 52, 291-303.
- Okassa, M., Tixier, M.S, Cheval B., Kreiter S. 2009. Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* Acari: Phytoseiidae. *Canadian Journal of Zoology*, 87, 689-698.
- O'Meara, B.C. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology*, 59, 59–73.
- Otto, J.C., Wilson, K.J. 2001. Assessment of the usefulness of ribosomal 18s and mitochondrial COI sequences in prostigmata phylogeny. *Proceedings of the 10th International Congress of Acarology*. CSIRO Publishing, Melbourne, 2001.

- Oudemans, A.C. 1915. *Acarologische Aanteekeningen*. LVI. *Entomologische Berichten*, The Netherlands, 4, 180–188.
- Overmeer, W.P.J. 1981. Notes on breeding phytoseiid mites from orchards (Acarina: Phytoseiidae) in the laboratory, *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 46 (1981), pp. 503–509.
- Padial, J.M., Miralle, A., De la Riva, I., Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7, 16.
- Pagès, M., Chaval, Y., Herbreteau, V., Waengsothorn, S., Cosson, J.F, Hugot J.P, Morand, S., Michaux, J. 2010. Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. *BMC Evolutionary Biology* 10,184.
- Papaioannou-Souliotis, P., Markoyiannaki-Printziou, D., Rumbos, I., Adamopoulos, I. 1999. Phytoseiid mites associated with vine in various provinces of Greece: a contribution to faunistics and biogeography, with reference to eco-ethological aspects of *Phytoseius finitimus* (Ribaga) (Acari: Phytoseiidae). *Acarologia*, 40, 113-125.
- Palevsky, E., Walzer, A., Gal, S., Schausberger, P. 2008. Evaluation of dry-adapted strains of the predatory mite *Neoseiulus californicus* for spider mite control on cucumber, strawberry and pepper. *Experimental and Applied Acarology*, 45, 15–27.
- Palumbi, S.R. 1984. Tactics of acclimation: morphological changes of sponges in an unpredictable environment. *Science*, 225, 1478-1480.
- Palumbi, S.R., Metz E.C. 1991. Strong reproductive isolation between closely related tropical sea urchins genus *Echinometra*. *Molecular Biology and Evolution*, 8, 227–239.
- Palumbi, S.R. 1998. Species formation and the evolution of gamete recognition loci. Pp. 271–278 in *Endless Forms: Species and Speciation*, D. J. Howard and S. H. Berlocher, eds. Oxford University Press, New York.
- Paquin, P., Hedin, M., 2004. The power and perils of ‘molecular taxonomy’: a case study of eyeless and endangered Cicurina Araneae: Dictynidae from Texas caves. *Molecular Ecology*, 13, 3239–3255.

- Pegg, G.G., Sinclair, B., Briskey, L., Aspden, W.J. 2006. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Scientia. Marina.* 70, 7–12.
- Penny, D. 1982. Towards a basis for classification: the incompleteness of distance measures, incompatibility analysis and phenetic classification. *Journal of Theoretical Biology*, 96, 129–142.
- Pfenninger, M., Nowak, C., Kley, C., Steinke, D., Streit, B. 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic Chironomus (Diptera) species. *Molecular. Ecology*, 16, 1957–1968.
- Pickett, K.M., Randle, C.P. 2005. Strange Bayes indeed: uniform topological priors imply non-uniform clade priors. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, 203–211.
- Prasad, V. 1967. Biology of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* in Hawaii (Acarina: Phytoseiidae). *Annals of the Entomological Society of America.* 60, 905–908.
- Pringle, K. L., Heunis, J. M. 2006. Biological control of phytophagous mites in apple orchards in the Elgin area of South Africa using the predatory mite, *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Mesostigmata: Phytoseiidae): a benefit-cost analysis. *African Entomology*, 14, 113–121
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell S., Kamoun S., Sumlin, W.D, Vogler, A.P. 2006. Sequencebased species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed Insects. *Systematic biology*, 55, 595–609.
- Popov, N.A., Khudyakova, O.A. 2008. Development of *Phytoseiulus persimilis* Acarina: Phytoseiidae fed on *Tetranychus urticae* Acarina: Tetranychidae on various food plants. *Acta Entomologica Fennica*, 53,43–46.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817–818.
- Pozzebon, A., Loeb G., Duso C. 2009. Grape powdery mildew as a food source for generalist predatory mites occurring in vineyards: effects on life-history traits. *Annals of Applied Biology*, 155, 81–89.

- Prendini, L. 2005. Comment on 'Identifying spiders through DNA barcodes'. *Canadian Journal of Zoology*, 83: 498-504.
- Putman, W.L., Herne, D.H.C. 1966. The role of predators and other biotic agents in regulating the population density of phytophagous mites in Ontario peach orchards. *The Canadian Entomologist*, 98, 808–820.
- Rach, J, DeSalle, R., Sarkar, I.N., Schierwater, B., Hadrys, H. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings. Biological Sciences* 275, 237-247.
- Ragusa, S. 1977. Notes on phytoseiid mites in Sicily with a description of a new species of *Typhlodromus* Acarina: Mesostigmata. *Acarologia*, 18, 379–392.
- Ragusa, S. 1981. Influence of different kinds of food substances on the developmental time in young stages of the predacious mite *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa (Acari: Phytoseiidae). *Redia*, 64, 237–243.
- Ragusa, S., 1986. A five year study on population fluctuations of phytoseiid mites in a citrus orchard in Sicily. *Acarologia*, 273, 193–201.
- Ragusa, S., Ciulla A.M., 1991. Phytoseiid mites associated with vines in Sicilian vineyards. In: Schuster, R., Murphy, P.W. (Eds.), *The Acari: Reproduction, development and life history strategies*. Chapman & Hall, London, pp. 417–423.
- Ragusa, S., Tsolakis H., 1994. Revision of the genus *Kampimodromus* Nesbitt, 1951 (Parasitiformes, Phytoseiidae) with a description of a new species. *Acarologia*, 35, 305–322.
- Ragusa S., Tsolakis H., 1998, 1994-1998. Phytoseiid mites (Parasitiformes, Phytoseiidae) of Lesbos Island (Greece) with a description of a new species. *Entomologia Hellenica*, 12, 55–64.
- Ragusa, S., Vargas R. 2002. On some phytoseiid mites (Parasitiformes, Phytoseiidae) from Chile. *Phytophaga*, 12, 129–139.
- Ragusa, S., 2003. Description of a new genus and of two new species of phytoseiid mites Parasitiformes, Phytoseiidae collected in Chile. *Acarologia*, 63, 337-344.
- Ramadan, H.A, Banhawly, E.M -El, Hassan, A.A, Afia, S.I. 2004. Genetic variation in the predacious phytoseiid mite, *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae): Analysis of

specific mitochondrial and nuclear sequences. Arab Journal of Biotechnology, 7(2), 189-196.

- Ramakers, P.M.J., Voet, S.J.P. 1996. Introduction of *Amblyseius degenerans* for thrips control in sweet peppers with potted plants of castor beans as banker plants. IOBC/WPRS Bulletin, 19(1), 127–130.
- Rambier A., 1958. Les tetranyques nuisibles à la vigne en France Continentale. Revue de Zoologie Agricole et Appliquée, 57, 1–20.
- Rambier, A. 1974. Relations entre les acariens nuisibles et leurs ennemis naturels. In: Les organismes auxiliaires en verger de pommiers. OILB/SROP, Switzerland, pp. 107–109.
- Ramey, R.R., Kelley, S.T., Boyce, W.M., Farrell, B.D. 2000. Phylogeny and host specificity of psoroptic mange mites (Acarina: Psoroptidae) as indicated by ITS sequence data. Journal of Medical Entomology, 37, 791–796.
- Ramón, C., Alberto, D., Manuel, G.G., José Antonio, H., Fernando, R., Manuel, R.R. 2009. Forensic Strategies Used for DNA Extraction of Ancient and Degraded Museum Sturgeon Specimens. In Fish & Fisheries Series. Vol. 29. Biology Conservation and Sustainable Development of Sturgeons (Eds. Springer Netherlands), 95-96.
- Randrianiaina, R.D., Glaw, F., Thomas, M., Glos, J., Raminosoa, N., Vences, M. 2007. Descriptions of the tadpoles of two species of Gephyromantis, with a discussion of the phylogenetic origin of direct development in mantellid frogs. Zootaxa 1401, 53–61.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes 7, 355–364.
- Raworth, D.A., Fauvel, G., Auger, P. 1994. Location, reproduction and movement of *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) during the autumn, winter and spring in orchards in the south of France. Experimental and Applied Acarology, 18, 593-602.
- Rhodes, E. M., Liburd, O. E., Kelts, C., Rondon, S. I., Francis, R. R. 2006. Comparison of single and combination treatments of *Phytoseiulus persimilis*, *Neoseiulus*

- californicus*, and Acramite (bifenazate) for control of twospotted spider mites in strawberries. *Experimental and Applied Acarology*, 39, 213–225.
- Roda, A, Nyrop, J.P., English-Loeb G. 2003. Leaf pubescence mediates abundance of non-prey food and the density of the predatory mite *Typhlodromus pyri*. *Experimental and Applied Acarology*, 29, 193–211.
- Rodrigues, J.C.V., Kitajima, E.W., Childers, C.C., Chagas, C.M. 2003. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari:Tenuipalpidae) in citrus in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 30, 161-179.
- Roehrdanz, R.L., Degrugillier, M.E. 1998. Long sections of mitochondrial DNA amplified from fourteen orders of insects using conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of Entomological Society of America*, 916, 771-778.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Rowell, H.J., Chant D.A., Hansell R.I.C. 1978. The determination of setal homologies and setal patterns on the dorsal shield in the family Phytoseiidae. *The Canadian Entomologist*, 110, 859-876.
- Rubinoff, D., Holland, B.S. 2005. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology* 54, 92–961.
- Rubinoff, D. 2006a. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*, 20, 1026–1033.
- Rubinoff, D., Cameron, S., Will, A.K., 2006b. Genomic Perspective on the Shortcomings of Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification *Journal of Heredity*, 97, 581-594.
- Rundle, H.D., Nosil, P. 2005. Ecological speciation. *Ecology letters*, 8, 336–352.
- Russell, G.C. 1996. Phenotypic plasticity in an intertidal snail: the role of a common crab predator. *Evolution*, 50, 448-454.
- Saba, F. 1971. *Tetranychus yusti*, a spider mite of potential importance. *Journal of Economic Entomology*. 64, 141-144.

- Sabelis, M.W., Dicke M. 1985. Long range dispersal and searching behaviour. Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control (eds W., Helle & M. W.Sabelis), pp. 141-160. Elsevier. Amsterdam.
- Sabelis, M.W., Bakker, F.M. 1992. How predatory mites cope with the web of their tetranychid prey: a functional view on dorsal chaetotaxy in the Phytoseiidae. *Experimental and Applied Acarology*, 16, 203-25.
- Salomone, N., Emerson, B.C., Hewitt, G.M., Bernini, F. 2002. Phylogenetic relationships among the Canary Island Steganacaridae (Acari, Oribatida) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 11, 79–89.
- Samadi, S., Barberousse A. 2005. L'arbre, le réseau et les espèces. Une définition du concept d'espèce ancrée dans la Théorie de l'Evolution. *Biosystema*, 24,: 53-62.
- Samadi, S., Barberousse A. 2006. The tree, the network, and the species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 89, 509–521
- Saha, K., Somchoudhury, A.K., Sarkar, P.K., Gupta, S.K. 2001. Effect of temperature on the rate of development, sex ratio and mortality of *Amblyseius coccosocius* Ghai and Menon (Acari: Phytoseiidae), an important biological agent against tea spider mite in India *Acarology: Proceedings of the 10 th International Congress*. CSIRO Publishing, Melbourne. 657p.
- Sanford, K.H. 1967. The influence of spray programs on the fauna of apple orchards in Nova Scotia. XVII. Effects on some predaceous mites. *The Canadian Entomologist*, 99, 197–201.
- Sarkar, I.N., Joseph, W.T., Paul, J.P., David, H.F., Bernd, S., Rob, D. 2002. An automated phylogenetic key for classifying homeoboxes. *Molecular Phylogeny and Evolution*, 24, 388–399.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K., Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 360, 1805–1811.
- Schäffer, S., Krisper, G., Pfingstl, T., Sturmbauer, C. 2008. Description of *Scutovertex pileatus* sp. nov. (Acari, Oribatida, Scutoverticidae) and molecular phylogenetic investigation of congeneric species in Austria, *Zoologischer Anzeiger* 247, 249–258

- Schäffer, S, Koblmüller, S, Pfingstl, T, Sturmbauer, C, Krisper, G. 2010. Contrasting mitochondrial DNA diversity estimates in Austrian *Scutovertex minutus* and *S. sculptus* (Acari, Oribatida, Brachypylina, Scutoverticidae). *Pedobiologia*, 53, 203-211
- Schausberger, P. 1998. Population growth and persistence when prey is diminishing in single-species and two-species systems of the predatory mites *Euseius finlandicus*, *Typhlodromus pyri* and *Kampimodromus aberrans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 88, 275–286.
- Schausberger, P., Croft, B.A. 2000. Cannibalism and intraguild predation among phytoseiid mites: Are aggressiveness and prey preference related to diet specialisation? *Experimental & Applied Acarology*, 24, 709-725.
- Scheffer, S.J., Lewis, M.L., Joshi, R.C. 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in The Philippines. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 204–210.
- Scheuten, A. 1857. Einiges über Milben. *Archiv für Naturgeschichte*, 23, 104–112.
- Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R. H. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55, 421-438.
- Schuster, R.O., Smith, L.M. 1960. The spermathecae as taxonomic features in phytoseiid mites of Western North America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 62, 181-187
- Schuster, R.O., Pritchard, A.E. 1963. Phytoseiid mites of California. *Hilgardia*, 34, 191–285.
- Schutte C., Dicke M., 2008. Verified and potential pathogens of predatory mites (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology*, 46, 307-328
- Scotland, R., Hughes, C., Bailey, D., Wortley, A. 2003. The Big Machine and the much-maligned taxonomist. *Systematics and Biodiversity*, 1, 139-143.
- Schulten, G.G.M. 1985. Pseudo-Arrhenotoky. In *Spider mites, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Vol 1B. Eds. Helle W. & Sabelis M.W., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands:67-71.

- Seidel, R.A., Lang, B.K., Berg, D.J. 2010. Salinity tolerance as a potential driver of ecological speciation in amphipods (*Gammarus* spp.) from the northern Chihuahuan Desert. *Journal of the North American Benthological Society*, 29, 1161–1169.
- Siebert, D.J. 1992. Tree statistics; trees and “confidence”; consensus trees; alternatives to parsimony; character weighting; character conflict and its resolution. In *Cladistics: a practical course in systematics*. Systematics Association Publication 10. Edited by P.L. Forey, C.J. Humpries, I.L. Kitching, R.W. Scotland, D.J.
- Silva, F.R. da; Vasconcelos, G. J.N.; Gondim J.R., Manoel G.C., Oliviera, J. V. 2005. Exigências térmicas e tabela de vida de fertilidade de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). *Neotropical Entomology*, 34 (2), 291-296
- 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 Entomological Society of America*, 87, 651-701.
- Simmons, M.P., Pickett, K.M., Miya, M. 2004. How meaningful are Bayesian support values? *Molecular Biology and Evolution*, 21, 188–199.
- Simmons, A.T., Gurr, G.M. 2005. Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. *Agricultural and Forest Entomology*, 7, 265-276.
- Skerratt, L.F., Campbell, N.J., Murrell, A., Walton, S., Kemp, D., Barker, S.C. 2002 The mitochondrial 12S gene is a suitable marker of populations of *Sarcoptes scabiei* from wombats, dogs and humans in Australia. *Parasitology Research*, 88, 376–379
- Sites, J.W.J., Marshall, J.C. 2003. Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends*, 18, 462-470
- Smith, M.A., Fisher, B.L., Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360, 1825–1834.
- Söller, R., Wohltmann, A., Witte, H., Blohm, D. 2001. Phylogenetic relationships within terrestrial mites (Acari: Prostigmata, Parasitengona) inferred from comparative

DNA sequence analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 18, 47–53

Solomon, M.G., Easterbrook, M.A., Fitzgerald, J.D. 1993. Mite-management programs based on organophosphate-resistant *Typhlodromus pyri* in UK apple orchards. *Crop Protection*, 12, 249–254.

Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., Crandall, K.A. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 105, 13486–13491.

Sota, T, Vogler, A.P. 2001 Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the carabid beetles *Ohomopterus*. *Systematic Biology*, 50, 39–59.

Sperling, F. 2003. DNA barcoding. Deus ex machina. *Newsl. Biol. Surv. Can. Terrestrial Arthropods, Opinion page* [online]. Vol. 22, issue 2. Available from http://www.biology.ualberta.ca/bsc/news22_2/opinionpage.htm [cited 28 December 2004].

StatSoft France, 2005. STATISTICA logiciel d'analyse de données, version 7.1. www.statsoft.fr.

StatSoft France, 2008. STATISTICA version 7.1. www.statsoft.fr.

Steel, M.A., Hendy, M.D., Penny, D. 1988. Loss of information in genetic distances. *Nature*, 336, 118.

Steinberg, S., Cohen, M. 1992. Biological control of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* in apple orchards by inundative releases of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*, a feasibility study. *Phytoparasitica*, 20, 37–44.

Stevens, M.I, Hogg, I.D. 2006. Contrasting levels of mitochondrial DNA variability between mites (Penthalodidae) and springtails (Hypogastruridae) from the Trans-Antarctic Mountains suggest long-term effects of glaciation and life history on substitution rates, and speciation processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 38 (10), 171-3180.

Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *Bio-sciences*, 53, 796-797.

- Swirski, E., Amitai, S. 1968. Notes on phytoseiid mites (Acarina: Phytoseiidae) of Israel, with a description of one new species. *The Israel Journal of Entomology*, 3, 95–108.
- Swirski, E., Ragusa, S. 1977. Some predacious mites of Greece, with a description of one new species Mesostigmata: Phytoseiidae. *Phytoparasitica*, 52, 75–84.
- Swirski, E., Amitai S. 1997. Notes on phytoseiid mites (Mesostigmata: Phytoseiidae) of Mt. Carmel (Israel), with descriptions of two new species. *The Israel Journal of Entomology*, 31, 1–20.
- Swofford, D.L. 1981. On the utility of the distance Wagner procedure. In *Advances in cladistics*. Vol. 1. Edited by V.A. Funk and D.R. Brooks. New York Botanical Garden, New York. pp. 25
- Swofford, D.L., Olsen G.J., Waddell P.J., Hillis D.M. 1996. Phylogenetic inference. In *Molecular systematics*. 2nd ed. Edited by D.M. Hillis, C. Moritz, and B.K. Mable. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. pp. 407–514.
- Swofford D.L., 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony *and other methods, Version 4.08b. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Takafuji, A, Chant, D.A. 1976. Comparative studies of two species of predacious phytoseiid mites Acarina: Phytoseiidae, with special reference to their responses to the density of their prey. *Experimental and applied acarology*, 17, 255–310.
- Takahashi, F., Chant, D.A. 1992. Adaptive strategies in the genus *Phytoseiulus* Evans Acari: Phytoseiidae: I. Developmental times. *International Journal of Acarology*, 18, 171–76.
- Takahashi, F., Chant, D.A. 1993a. Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). I Geographic distribution. *International Journal of Acarology*, 19, 15-22.
- Takahashi, F., Chant, D.A. 1993b. Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). II. Taxonomic Review. *International Journal of Acarology*, 19, 23-36.
- Takahashi, F., Chant, D.A. 1993c. Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). III. Cladistic Analysis. *International Journal of Acarology*, 19, 233-241.

- Takahashi, F., Chant, D.A. 1993d. Phylogenetic relationships in the genus *Phytoseiulus* Evans (Acari: Phytoseiidae). IV. Reproductive isolation. *International Journal of Acarology*, 19, 305-311.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2008. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Tan, D.S.H., Ang, Y., Lim, G.S., Ismail, M.R.B., Meier, R. 2010. From 'cryptic species' to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). *Zoologica Scripta*, 39, 51–61.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 70–74.
- Tavares, E.S., Baker, A.J. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolution Biology*, 8, 81.
- Thomas, W.P., Chapman, L.M. 1978. Integrated control of apple pests in New Zealand. 15. Introduction of two predacious phytoseiid mites. *Proceedings of the Thirty-first New Zealand Weed and Pest Control Conference*, New Zealand, pp. 236–243.
- Thomas, M., Raharivololoniaina, L., Glaw, F., Vences, M., Vieites, D.R. 2005. Montane tadpoles in Madagascar: molecular identification and description of the larval stages of *Mantidactylus elegans*, *Mantidactylus medacassus*, and *Boophis laurenti* from the Andringitra Massif. *Copeia*, 174–183.
- Ting, N., Tosi, A.J., Li Y.; Zhang, Y.P., Disotell, T.R. 2008. Phylogenetic incongruence between nuclear and mitochondrial markers in the Asian colobines and the evolution of the langurs and leaf monkeys. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46, 466-474
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Auger, P., Weber, M. 1998. Colonization of Languedoc vineyards by phytoseiid mites (Acari : Phytoseiidae) : influence of wind and crop environment. *Experimental and Applied Acarology*, 22, 523-542.

- Tixier, M.S., Kreiter, S., Auger, P. 2000a. Colonization of vineyards by phytoseiid mites: their dispersal patterns in the plot and their fate. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 191–211.
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Cheval, B., Auger, P. 2003b. Morphometric variation between populations of *Kampimodromus aberrans*. Implications for the taxonomy of the genus. *Invertebrate Systematics*, 17, 349-358.
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Barbar, Z., Ragusa, S., Cheval, B. 2006a. The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot Acari: Phytoseiidae: consequences for taxonomy. *Zoologica Scripta*, 35, 115-122.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Ferragut, F., Cheval, B. 2006b The suspected synonymy of *Kampimodromus hmiminai* McMurtry and *K. adrianae* Acari: Phytoseiidae: morphological and molecular investigations. *Canadian Journal of Zoology*, 84, 1216-1222.
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Croft, B. A., Cheval, B. 2008a. *Kampimodromus aberrans* Acari: Phytoseiidae from USA: morphological and molecular assessment of its density. *Bulletin of Entomological Research*, 98, 125–134.
- Tixier, M.S., Guichou, S., Kreiter, S. 2008b. Morphological variation in the biological control agent *Neoseiulus californicus* McGregor Acari: Phytoseiidae: consequences for diagnostic reliability and synonymies. *Invertebrate systematics*, 22, 453-469.
- Tixier, M.S., Kreiter, S., Moraes, G.J. 2008c. Biogeographic distribution of the mites of the family Phytoseiidae Acari: Mesostigmata. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93, 845-856.
- Tixier, M.S., Ferrero, M., Okassa, M., Guichou, S., Kreiter, S. 2010. On the specific identity of specimens of *Phytoseiulus longipes* Evans Mesostigmata: Phytoseiidae showing different feeding behaviours: morphological and molecular analyses. *Bulletin of Entomological Research*, 17, 1-11.
- Toda, S., Osakabe, M.H., Komazaki, S. 2000. Interspecific diversity of mitochondrial COI sequences in Japanese *Panonychus* species. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 821-829.

- Tosi, A.J., Morales, J.C., Melnick, D.J. 2002. Y-Chromosome and mitochondrial markers in *Macaca fascicularis* indicate introgression with Indochinese *M. mulatta* and a biogeographic barrier in the Isthmus of Kra. *International Journal of Primatology*, 23 (1), 161–178.
- Tosi, A.J., Morales, J.C., Melnick, D.J. 2003. Paternal, maternal and biparental molecular markers provide unique windows onto the evolutionary history of macaque monkeys. *Evolution*, 57 (6), 1419–1435.
- Tosi, A.J., Melnick, D.J., Disotell, T.R. 2004. Sex chromosome phylogenetics indicate a single transition to terrestriality in the guenons (tribe: Cercopithecini). *Journal of Human Evolution*, 46, 223–237.
- Tselila, B.D., Melamed, S., Gerson, S., Morin, S. 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analysing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 41, 169-181.
- Tuovinen, T., Rokx, J.A.H. 1991. Phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) on apple trees and in surrounding vegetation in southern Finland. Densities and species composition. *Experimental and Applied Acarology*, 12 (1-2), 35-46.
- Tuovinen, T. 1994. Influence of surrounding trees and bushes on the phytoseiid mite fauna on apple orchard trees in Finland. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 50 (1), 39-47.
- Ueckermann, E.A., Loots, G.C. 1985. The African species of the subgenus *Kampimodromus* Nesbitt (Acarina: Phytoseiidae). *Phytophylactica*, 17, 195–200.
- Urbaneja, A., Pascual-Ruiz, S., Pina, T., Abad-Moyano, R., Montón, H., Castañera, P., Jacas, J.A. 2008. Efficacy of some acaricides against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and their side-effects on selected natural enemies occurring in citrus orchards. *Pesticide Management Science*, 64, 834–842.
- Vacante, V., Nucifora, A. 1987. Gli Acari degli agrumi in Italia. II. I Gamasidi Phytoseiidae Berlese e Ascidae Voigts & Oudemans: chiave per il riconoscimento dei e delle specie e note di biologia. *Bolletino de Zoologia Agraria e Bachicoltura*, Ser. II, Italy, 19, 145–184.
- Vacquier, V.D., Swanson, W.J., Hellberg, M.E. 1995. What have we learned about sea urchin sperm binding? *Development Growth Differentiation*, 37, 1–10.

- Valdecasas, A.G., Williams, D., Wheeler, Q.D. 2008. Integrative taxonomy' then and now: a response to Dayrat 2005. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93, 211–216.
- van der Meijden, A., Vences, M., Hoegg, S., Meyer, A. 2005. A previously unrecognized radiation of ranid frogs in Southern Africa revealed by nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 37(3),674-85.
- Van de Vrie, M., Price, J.F. 1994. Manual for biological control of twospotted spider mites on strawberry in Florida. UF/IFAS-GCREC. DOV-1994-1.
- Van Opijnen, T., Breeuwer, J. A J. 1999. High temperatures eliminate Wolbachia, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Experimental and Applied Acarology* 23:871–881.
- Vences, M, Thomas, M, Bonett, R.M., Vieites, D.R. 2005a. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 360, 1859–1868.
- Vences,M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D.R. 2005b. Comparative performance of 16S rRNA in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2, 1-12.
- Vermeij, G.J. 1982. Phenotypic evolution in a poorly dispersing snail after arrival of a predator. *Nature*, 299, 349-350.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Nevado, B., de Meyer M. 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics*, 11(206) , 4567-4573.
- Vogler, A.P., Monaghan, M.T. 2007. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal Zoological Systematic Evolution Research*, 45, 1-10.
- Wainstein, B.A. 1962. Révision du genre *Typhlodromus* Scheuten, 1857 et systématique de la famille des Phytoseiidae Berlese 1916 Acarina: Parasitifformes. *Acarologia*, 4, 5-30.
- Waite, G.K 1988. Control of *Tetranychus urticae* Koch by *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot in low-chill stonefruit. *Queensland Journal of Agriculture and Animal Sciences* 45, 185–188.

- Wakeley, J. 2006. Coalescent theory: An introduction. Roberts & Co., Greenwood Village, Colorado.
- Walton, S.F., Dougall, A., Pizzutto, S., Holt, D.C., Taplin, D., Arlian, L.G., Morgan, M., Currie, B.J., Kemp D.J., 2004. Genetic epidemiology of *Sarcoptes scabiei* (Acari: Sarcoptidae) in northern Australia. *International Journal of Parasitology*, 34(7), 839-849.
- Walzer, A., Schausberger, P. 1999 a. Cannibalism and interspecific predation in the phytoseiid mites *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*: predation rates and effects on reproduction and juvenile development. *BioControl*, 43, 457-468.
- Walzer, A., Schausberger, P. 1999 b. Predation preferences and discrimination between con- and heterospecific prey by the phytoseiid mites *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. *BioControl* 43, 469-478.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Biological Sciences*, 360, 1847–1857.
- Warrit, N., Smith, D.R., Lekprayoon, C. 2006. Genetic subpopulations of *Varroa* mites and their *Apis cerana* hosts in Thailand, *Apidologie* 37, 19–30.
- Watanabe, M.A., Moraes G.J., Gastaldo I Jr., Nicolella G. 1994. Controle biológico do ácaro rajado com ácaros predadores fitoseiídeos (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) em culturas de pepino e morango. *Science and Agriculture*, 51, 75–81.
- Waugh, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays* 29:188–197. Whalon M.E.,
- Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T., Hoffmann, A.A. 2007. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology*, 5 5, e114.
- Wei, Q., Walde, S.J. 1997. The functional response of *Typhlodromus pyri* to its prey, *Panonychus ulmi*: the effect of pollen. *Experimental and Applied Acarology*, 21, 677–684. Wheeler Q.D., Meier R., 2000. Species concepts and phylogenetic theory. A debate. Columbia University Press, New York

- Wesson, D.M., Mclain, D.K, Oliver, J.H., Piesman, J., Collins, F.H. 1993 Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 10221-10225
- Wheeler, Q.D., Raven, P.H., Wilson, E.O. 2004. Taxonomy: impediment or expedient? Science, 303, 285.
- Wheeler, Q. D. 2008. Introductory: toward the new taxonomy. In *The New Taxonomy*. Edited by: Wheeler QD. CRC Press, Taylor and Francis Group, 1-17. .
- Wiemers, M., Fiedler K. 2007. Does the DNA barcoding gap exist?—a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, 4, 8.
- Wiens, J.J., Servedio, M.R. 2000. Species delimitation in systematics: Inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society of London B biological Sciences*, 267, 631-636.
- Will, K.W., Rubinoff, D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20, 47–55.
- Will, K.W., Mishler, B.D., Wheeler, Q.D. 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Systematic. Biology*. 54, 844-851.
- Wilson, R.A. 1999. *Species: new interdisciplinary essays*. MIT Press, Cambridge , Massachusetts .
- Wilson, E.O. 2003. The encyclopedia of Life. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 77–80.
- Woide, D., Zink A., Thalhammer S., 2010. Technical note: PCR analysis of minimum target amount of ancient DNA. *American Journal of Physical Anthropology*, 142, 321-327.
- Yaninek, J.S., Moraes, G.J., Markham, R.H. 1989. Handbook on the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* on Africa: A guide to their biology and procedures for implementing classical biological control. IITA Publication Series, Benin, 140 pp.
- Yaninek, J.S., Hanna, R. 2003. Cassava green mite in Africa: a unique example of successful classical biological control of a mite pest on a continental scale, pp. 61–

75. In P. Neuenschwander, C. Borgemeister, and L. Langewald (eds.), Biological control in IPM systems in Africa. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Fenton, B., Tuovinen, T. 2000. Species and strains identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences. Experiment. Applied Acarology, 24, 863-880.
- Zacharda, M., Hluchy, M. 1996. Biological control of two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* on strawberries by the predatory phytoseiid mite *Typhlodromus pyri* (Acari, Tetranychidae, Phytoseiidae). Experimental and Applied Acarology, 21 2, 83-94.
- Zhang, D. X., Hewitt, G.M., 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. Insect Molecular Biology, 6, 143–150.
- Zhang Z. Q., 2003. Mites of greenhouses, Identification, Biology and Control. CABI, London, pp 244.

ANNEXES

ANNEXE 1. Cycles PCR pour les différentes amorces utilisées

12S ARNr

| | | | |
|-----------------------|-------|------|-------------|
| Dénaturation initiale | 95 °C | 1 mn | } 35 Cycles |
| Dénaturation (1) | 94 °C | 30 s | |
| Hybridation (2) | 40 °C | 30 s | |
| Elongation (3) | 72 °C | 1 mn | |
| Extension finale | 72 °C | 5 mn | |

Cytb

| | | | |
|-----------------------|-------|------|-------------|
| Dénaturation initiale | 94 °C | 3 mn | } 35 Cycles |
| Dénaturation (1) | 92 °C | 20s | |
| Hybridation (2) | 53 °C | 1 mn | |
| Elongation (3) | 72 °C | 1 mn | |
| Extension finale | 72 °C | 5 mn | |

COI

| | | | |
|-----------------------|-------|--------|-------------|
| Dénaturation initiale | 95 °C | 3 mn | } 35 Cycles |
| Dénaturation (1) | 94 °C | 1 mn | |
| Hybridation (2) | 48 °C | 1 mn30 | |
| Elongation (3) | 72 °C | 1 mn | |
| Extension finale | 72 °C | 5 mn | |

ITS

| | | | |
|-----------------------|-------|------|-------------|
| Dénaturation initiale | 92 °C | 2 mn | } 30 Cycles |
| Dénaturation (1) | 92 °C | 15s | |
| Hybridation (2) | 50°C | 45s | |
| Elongation (3) | 72 °C | 1 mn | |
| Extension finale | 72 °C | 7 mn | |

ANNEXE 2. Protocoles d'extractions

Protocole CTAB

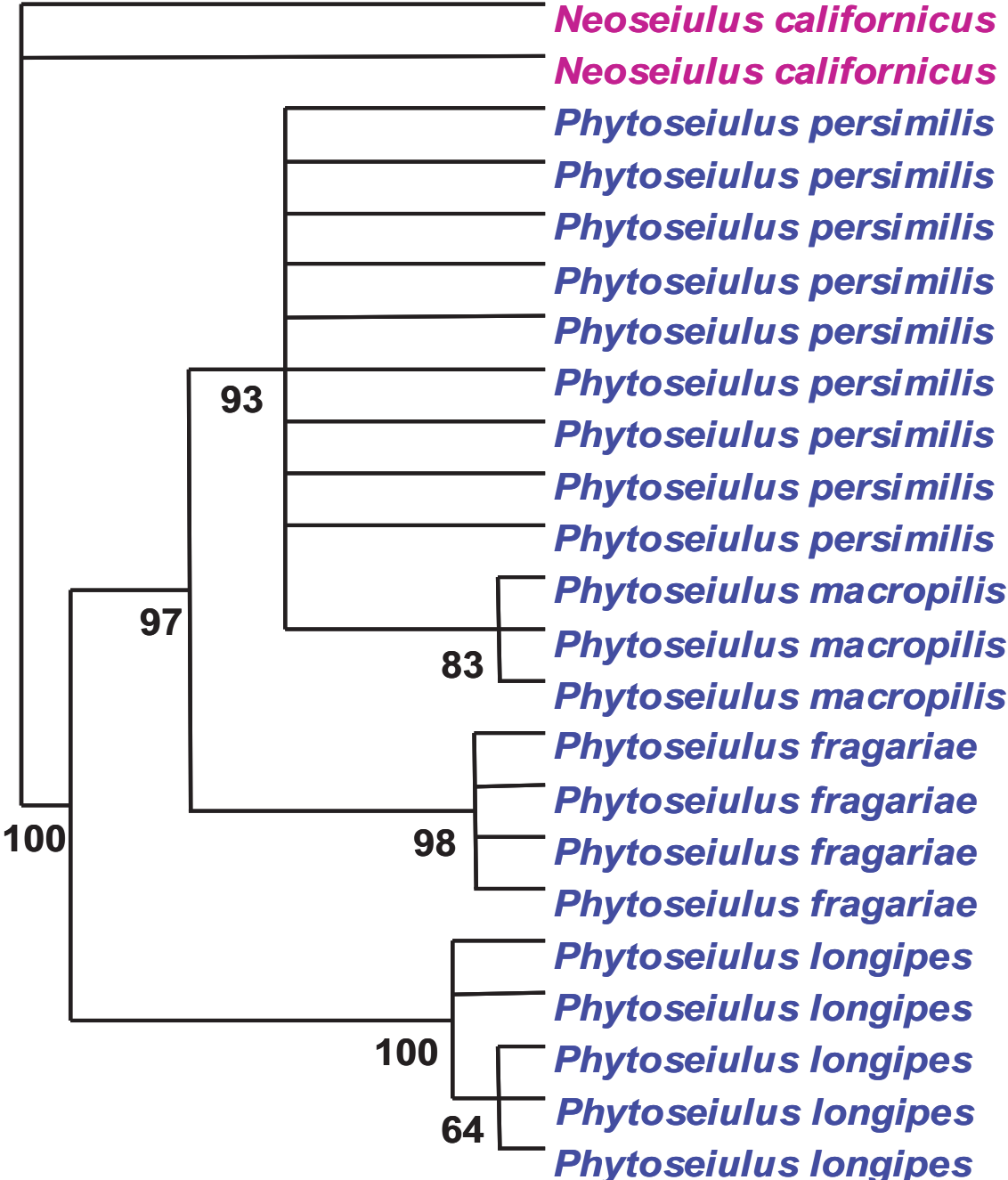
1. Rajouter dans chaque tube 75 µl de tampon CTAB et laisser les tubes au bain marie 65°C pendant 1 heure
2. Rajouter dans chaque tube 75 µl de phenol/chloroform
3. Agiter les tubes pendant 1 min
4. Centrifugation pendant 5 min à 6°C
5. Enlever délicatement le surnageant et le récupérer. Puis rajouter les trois quart du volume en isopropanol
6. Vortex pendant 20 secondes puis laisser pendant 15 min à – 20°C
7. Centrifugation pendant 15 min à 6°C
8. Reprendre le « culot » (qui n'existe pas) dans 100 µl d'alcool à 96°C et enlever à la pipette l'isopropanol et laisser ensuite un tout petit fond pour éviter de perdre de l'ADN.
9. Centrifuger pendant 10 min à 6°C. Enlever l'alcool et sécher le culot (de la même manière, l'alcool est enlevé avec la pipette et je laisse un petit fond qui sèche au speedvac)
10. Rajouter 20µl d'eau ultrapure

Protocole Kit d'extraction Qiagen avec le protocole « Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells »

1. Centrifuger l'acarien isolé par Eppendorf 3 min à 13000 rpm pour culotter l'acarien. Eliminer délicatement le maximum d'éthanol.
2. Ajouter 90 µl de PBS, 10 µl de Protéinase K et 100 µl de Tampon AL (QIAGEN).
3. Immédiatement homogénéiser le mélange en vortexant le tube maintenu à la verticale.
4. Centrifuger 5 min à 13000 rpm pour s'assurer que l'acarien soit immergé dans le mélange puis homogénéiser à nouveau le mélange en tapotant le tube. Incuber 1 h 30 à 70°C (de 1 à 3 h).
5. Ajouter 100 µl d'éthanol 100% à l'échantillon et homogénéiser correctement en vortexant le mélange. (centrifuger 1 min à 8000 rpm)
6. Un précipité blanc peut se former à l'ajout de l'éthanol. Ce précipité n'interfère en aucun cas avec la suite du protocole.
7. Déposer le mélange obtenu (y compris le précipité) sur une colonne Dneasy placée sur un tube de collecte de 2 ml.
8. Centrifuger 1 min à 8000 rpm. Jeter le surnageant en sortie de colonne et le tube de collecte.

9. Placer la colonne dans un nouveau tube de collecte et ajouter 250 μ l de Tampon AW1.
10. Centrifuger 1 min à 8000 rpm. Jeter le surnageant en sortie de colonne et le tube de collecte. Placer la colonne dans un nouveau tube de collecte et ajouter 250 μ l de Tampon AW2.
11. Centrifuger 3 min à 13000 rpm pour sécher la membrane. Jeter le surnageant en sortie de colonne et le tube de collecte.
12. Attention, il est très important d'éliminer tous résidus d'éthanol avant l'élution. Pour cela retirer délicatement la colonne du tube de collecte sans qu'elle entre en contact avec le surnageant.
13. Placer la colonne dans un nouveau tube de collecte, éliminer à l'aide d'un cône P10 les traces de tampon piégées sur l'anneau en plastique maintenant la membrane. Centrifuger de nouveau 3 min à 13000 rpm.
14. Placer la colonne dans un tube propre de 1,5 ml. Déposer 50 μ l d'eau ultrapure à 70 °C sur la membrane. Laisser incuber 3 min à t°C ambiante. Centrifuger 1 min à 8000 rpm.(faire cette étape 2 fois en faisant passer les 50 μ l d'eau à travers la colonne)

ANNEXE 3. Arbre de consensus majoritaire à 50% obtenu en analyse en parcimonie en utilisant le marqueur nucléaire ITS pour les quatre espèces du genre *Phytoseiulus* et une espèce « outgroup » : *Neoseiulus californicus*. Les numéros des nœuds correspondent aux valeurs de Bootstrap.



ANNEXE 4. Poster présenté au congrès international d'Acarologie, Recife, Brésil, Aout 2010.



Molecular and morphological variations within the species *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae) : consequences for diagnostic and biological control

M. Okassa, M.S Tixier, S. Guichou and S. Kreiter

CBGP-INRA UMR 1062, Campus international de Baillarguet CS 30016, F-34988 Montpellier-sur-lez

INTRODUCTION

Neoseiulus californicus (McGregor) is an important biological control agent used worldwide to control pest mites in many crops. In order to have a successful biological control, an accurate **diagnostic** of that species is required.

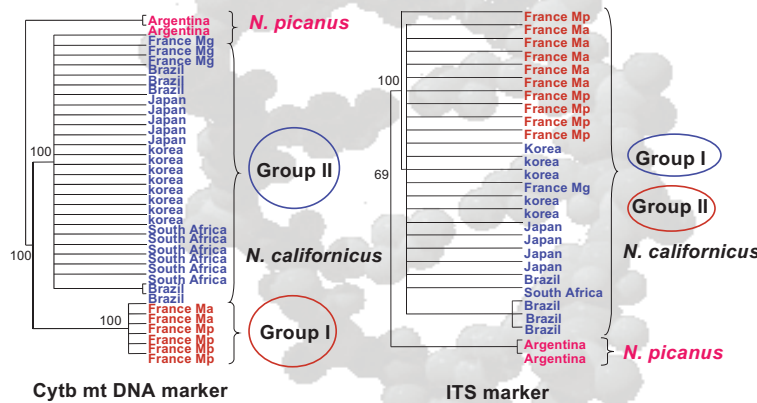
For that scope, an accurate estimation of intraspecific variation is essential. In the present study, the intraspecific variation of this species was assessed (using molecular and morphological experiments).

MATERIAL AND METHODS

- 7 populations of *N. californicus* were field collected in 5 countries: France (Marsillargues: Ma, Midi-Pyrénées: Mp, Mauguio: Mg), South Africa, Korea, Japan and Brazil.
- *Neoseiulus picanus* (Ragusa) was considered as a control species for molecular analyses.
- Molecular analyses with two molecular markers: Cytb mtDNA (416 bp) and ITS (710 bp).
- Morphological analysis on 33 characters.

RESULTS/DISCUSSION

➤ **Molecular analyses: Maximum Parsimony trees**



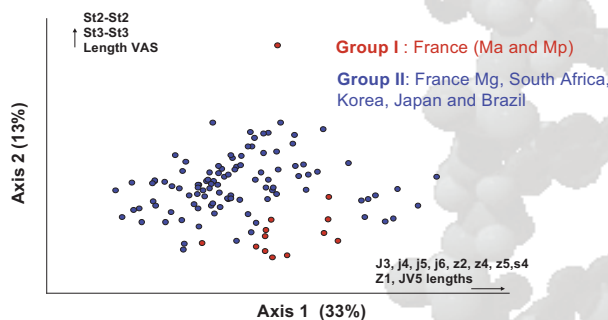
▪ With Cytb mt DNA marker:
Two sub-groups (I and II) within the clade including the specimens identified as *N. californicus*.

➔ **high genetic diversity within this species**

▪ With the ITS marker:
All specimens are mixed and **the two sub-groups (I and II)** previously emphasized **are no more observed**.

▪ For the two markers:
N. californicus is **well separated** from the control species *N. picanus*.

➤ **Morphological analysis: Multifactorial analysis (ACP)**



▪ The combination of **33 morphological characters** did not separate the populations into two sub-groups as obtained with Cytb mt marker.

▪ **ITS marker and Morphological analyses led to the same results.**

CONCLUSION

Such a high unexpected mtDNA variation questions the existence of **two or one species** within the specimens identified as *N. californicus*. However, the absence of morphological and molecular variations (with the ITS marker) emphasized that all of these specimens belong to the same species. This study shows the necessity to apply an **integrative taxonomic approach** for avoiding misidentifications. However, to clearly conclude, cross breeding would be required. Furthermore, in a biological control framework, it would be interesting to compare the biological performances of these strains.