

ANPP - TROISIEME CONFERENCE INTERNATIONALE
SUR LES RAVAGEURS EN AGRICULTURE

MONTPELLIER 7-8-9 DECEMBRE 1993

APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE EN
ACAROLOGIE APPLIQUEE A L'AGRONOMIE

M. NAVAJAS, M.J. PERROT-MINNOT et J. GUTIERREZ

Laboratoire d'Acarologie ENSA.M-INRA-ORSTOM
2, Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

RESUME

La contribution des techniques de la biologie moléculaire en Acarologie est présentée sur la base de résultats obtenus chez les acariens phytophages et prédateurs de phytophages. Différentes situations biologiques sont abordées: identification précise des espèces, élaboration de phylogénies, estimation de la variabilité génétique d'une espèce de prédateur utilisé en lutte biologique.

Mots-clés: Acariens, Tetranychidae, *Typhlodromus pyri*, Biologie moléculaire.

SUMMARY

THE CONTRIBUTION OF MOLECULAR BIOLOGY IN ACAROLGY
APPLIED TO AGRONOMY

The contribution of molecular biology techniques in Acarology is described using results obtained on phytophagous mites and predator of phytophagous mites. Different biological situations are approached: accurate identification of species, the establishment of phylogenies and appraisal of the genetic variability of a predatory species used in biological control.

Key-words: Acari, Tetranychidae, *Typhlodromus pyri*, Molecular biology.

INTRODUCTION

La compréhension des mécanismes et des processus de fonctionnement des populations est un préalable nécessaire à la mise en place de stratégies de lutte contre les organismes nuisibles. L'analyse de la diversité génétique, de la structuration des populations ainsi que de l'évaluation des échanges entre les populations (migration, flux géniques) sont des caractères complémentaires d'autres approches biologiques (morphologie, écologie, dynamique des populations), qui contribuent à appréhender la biodiversité de l'agrosystème. Ces études permettent de mieux cerner les entités biologiques avec lesquelles on travaille et d'analyser la nature des relations que ces entités ont entre elles.

METHODOLOGIE

Les techniques de la biologie moléculaire mettent à notre disposition des outils performants pour définir les marqueurs génétiques qui sont à la base des études de diversité génétique. Dans les dernières années ces techniques se sont allégées et leur usage s'est généralisé, mais c'est surtout le récent développement de méthodes ultrasensibles comme la PCR (réaction de polymérisation en chaîne), qui ont rendu cette approche intéressante en Acarologie. La PCR permet de s'affranchir des difficultés méthodologiques liées à la petite taille des acariens, caractéristique qui est d'ailleurs commune à divers arthropodes ravageurs et auxiliaires.

Les techniques de base qui sont impliquées dans l'étude de la diversité génétique chez les acariens peuvent se résumer comme suit:

1. La PCR permet d'amplifier sélectivement *in vitro* une région définie du génome à partir de très petites quantités de matériel (Seiki, *et al.*, 1988) (Figure 1).
2. Les produits de PCR sont ensuite séquencés et on accède ainsi au niveau le plus fin de variation du génome (figure 2).
3. Analyse de données de séquence: les séquences propres à chaque entité étudiée (espèce ou population) sont alignées et les différences notées. Les relations phylogénétiques entre les taxons sont élaborées à partir de ces données (Felsenstein, 1988).
4. Les marqueurs moléculaires RAPD ("randomly amplified polymorphic DNA") (Williams *et al.*, 1990) sont appliqués à l'analyse de la diversité intraspécifique. Comme la PCR, cette méthode consiste à amplifier des fragments d'ADN, mais à partir d'une seule amorce aléatoire. Si des mutations font apparaître des possibilités d'hybridation supplémentaire de l'amorce sur la matrice, des nouveaux segments d'ADN seront générés. Un polymorphisme du nombre de segments amplifiés sera alors révélé. Cette méthode permet potentiellement de déceler un polymorphisme important. Elle présente alors un grand intérêt pour assurer le suivi des individus dans les populations.

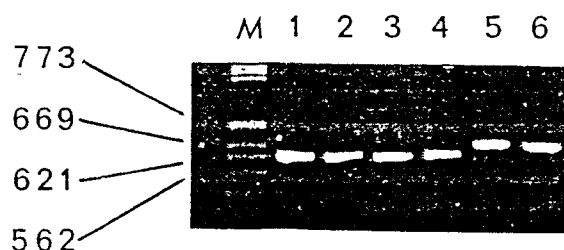


Figure 1: La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) permet d'amplifier sélectivement *in vitro* une région définie du génome. Cette technique a été utilisée pour amplifier la région ITS2 de l'ADN ribosomique de 6 espèces d'acariens Tetranychidae. Pistes 1 à 4: espèces du genre *Tetranychus*; pistes 5 et 6: espèces du genre *Eotetranychus*; piste M: marqueur de taille (λ Hind III).

Figure 1: PCR (polymerase chain reaction) enables selective amplification *in vitro* of a specific region of the genome. The technique was used to amplify region ITS2 in ribosomal DNA of 6 Tetranychidae mite species. Lines 1 to 4 species of the genus *Tetranychus*; line 5 and 6: species of genus *Eotetranychus*; line M: size marker (λ Hind III).

	1	10	20	30	40	50	60
consensus	GATCAAAAATATTGATTAAGTTGATTAATGTATATT TGTGTTTGCAAGCAA GCAAC						
<i>T. urticae</i>	-----T-----TG-----						
<i>T. turkestanii</i>	-----A-----TG-----						
<i>T. mcdanieli</i>	-----A-----GT-----						
<i>T. pacificus</i>	-----A-----GT-----A-----						
	70	80	90	100	110	120	
consensus	GTAAATCTACTTTAA GTTGCACAA TTT C TTGCA TAC TTCTTAGGCTGCTT						
<i>T. urticae</i>	-----T-----A-----TG-CT-----T-----						
<i>T. turkestanii</i>	-----A-----A-----TG-CT-----T-----						
<i>T. mcdanieli</i>	-----C-----T-----GC-AA-----A-----						
<i>T. pacificus</i>	-----C-----T-----GC-AA-----A-----C-----						
	130	140	150	160	170	180	
consensus	TAACAGA ATGAAATAG TACTATTTGTATG TT TACAAGTGCA GAAGATTCATCA						
<i>T. urticae</i>	-----C-G-----C-----C-A-TA-----A--A-----C-						
<i>T. turkestanii</i>	-----A-----C-----T-A-TA-----A--A-----C-						
<i>T. mcdanieli</i>	-----G-----A-----T-T-AC-----GT--A-----C-						
<i>T. pacificus</i>	-----G-----A-----T-T-AC-----CT--G-----A-						

Figure 2: Séquences (partie 3' de l'ITS2 de l'ADN ribosomique) de quatre espèces d'acariens Tetranychidae (Navajas *et al.*, 1992). Les séquences sont alignées par rapport à la séquence consensus et seuls les nucléotides qui en diffèrent sont donnés; les nucléotides identiques sont notés par un tiret, les délétions par un point . Le logiciel MULTALIN Software (Corpet, 1988) a été utilisé pour les alignements.

Figure 2: Sequences of part 3' of ITS2 region of ribosomal DNA in 4 Tetranychidae mite species (Navajas *et al.*, 1992). The sequences are aligned with the consensus sequence and only differing nucleotides are given; identical nucleotides are indicated by a dash and deletions by a dot. MULTALIN software (Corpet, 1988) was used for the alignments.

RESULTATS

1. Identification des espèces et établissement des relations phylogénétiques à l'intérieur de la famille Tetranychidae.

La famille Tetranychidae inclut plusieurs espèces nuisibles à l'agriculture. Leur systématique a surtout été étudiée jusqu'à maintenant par des méthodes classiques utilisant des caractères morphologiques. Les relations phylogénétiques entre 19 espèces appartenant à 8 genres de la famille Tetranychidae ont pu être établies sur la base des séquences d'un fragment d'ADN mitochondrial (Figure 3A). Cet arbre confirme la séparation des familles des Tetranychidae et des Tenuipalpidae [*Cenopalpus pulcher* (Canestrini et Fanzago)], de même que celle de la sous-famille des Bryobiinae [*Bryobia kissophila* van Eynhoven et *Petrobia harti* (Ewing)] et de la sous-famille des Tetranychinae [de *Panonychus ulmi* (Koch) à *Tetranychus urticae* Koch]. Il met ici en évidence l'éclatement du genre *Oligonychus* en deux ensembles distincts. C'est ainsi que les espèces du groupe *Oligonychus ununguis* (Jacobi), ravageurs de gymnospermes seraient proches des genres *Panonychus* et *Mononychellus*, tandis que les *Oligonychus* vivant sur plantes herbacées devraient être rapprochés des *Tetranychus*.

Une étude en cours portant sur des prélèvements d'*Eotetranychus carpini* (Oudemans) effectués sur vigne permet de séparer ce taxon d'autres *Eotetranychus* morphologiquement identiques récoltés sur noisetier, érable, etc., si bien que cette espèce a probablement beaucoup moins de plantes hôtes qu'on ne le pensait.

Une troisième série de travaux, portant sur des séquences d'un fragment de l'ADN ribosomique, permet une analyse fine des relations à l'intérieur du genre *Tetranychus*, en séparant *Tetranychus viennensis* Zacher (figure 3B). Ceci est confirmé par un nouvel examen de la morphologie de cette espèce et l'analyse de sa biologie. On retrouverait ici une des raisons pour lesquelles *T. viennensis* demeurerait plus sensible aux produits agropharmaceutiques que les autres *Tetranychus*, au point de disparaître des vergers les plus traités.

2. Diversité géographique (Origine géographique des introductions de ravageurs)

Le cas de l'acarien vert du manioc *Mononychellus progresivus* Doreste, espèce américaine introduite en Afrique, est abordé dans un deuxième travail présenté dans ce colloque (Navajas *et al.*).

3. Diversité des auxiliaires utilisées en lutte biologique.

Le polymorphisme génétique entre populations de l'espèce *Typhlodromus pyri* Scheuten, acarien prédateur utilisé en lutte biologique a été estimé par des marqueurs RAPD. Diverses amorces ont mis en évidence un polymorphisme entre quatre populations étudiées (figure 4)

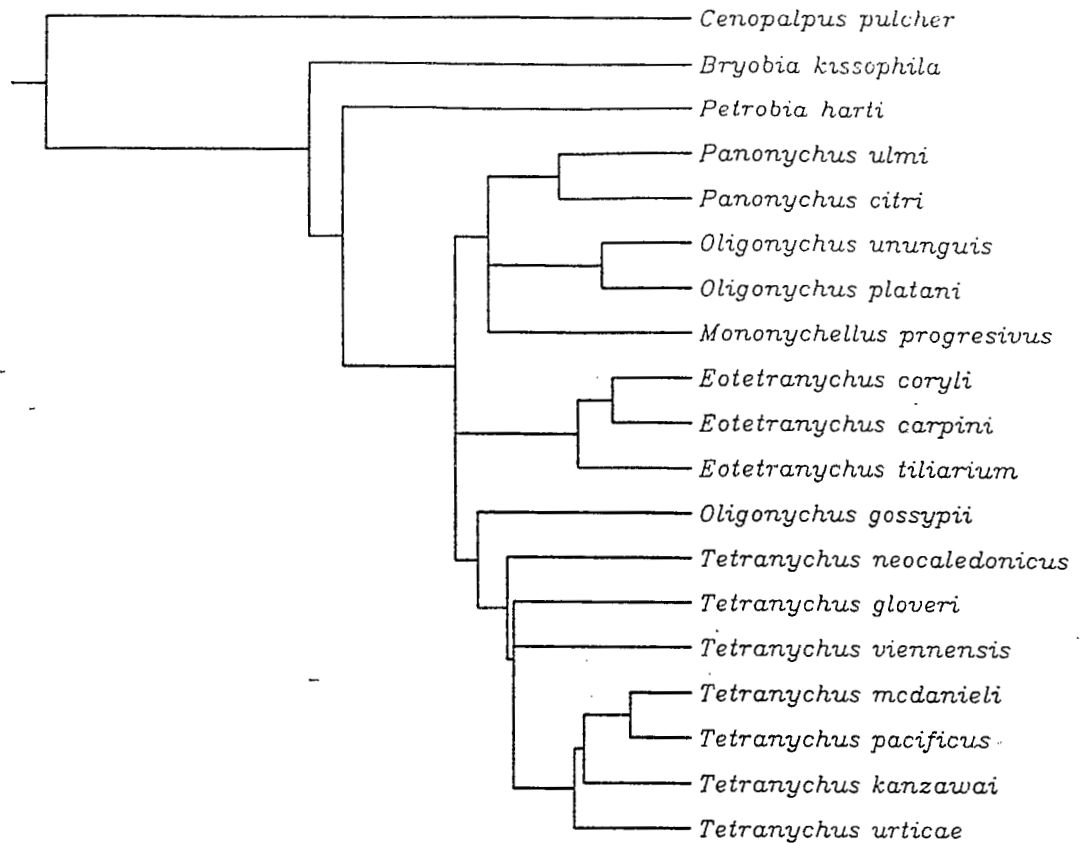
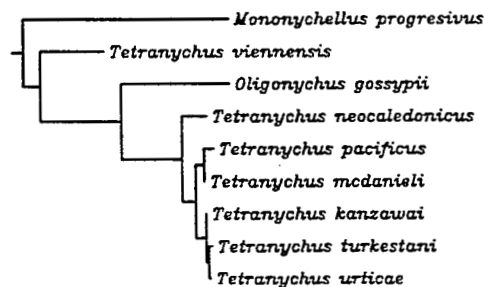
A**B**

Figure 3: L'arbre construit sur la base des séquences d'ADN montre les relations phylogénétiques entre les espèces de Tetranychidae. A: à partir d'un fragment de 350 nucléotides du gène codant pour la cytochrome oxydase I (COI) mitochondriale. B: à partir des séquences de l'ITS2 de l'ADN ribosomique. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées avec l'ensemble de programmes PHYLIP version 3.5p (Felsenstein, 1993).

Figure 3: The tree drawn up using the DNA sequences shows the phylogenetic relations between the Tetranychidae species. A: on the basis of a 350 nucleotides fragment of the gene coding mitochondrial cytochrome oxidase I (COI). B: on the basis of sequences of the ITS2 region of ribosomal DNA. Phylogenetic analyses were performed with all the PHYLIP programs, version 3.5p (Felsenstein, 1993).

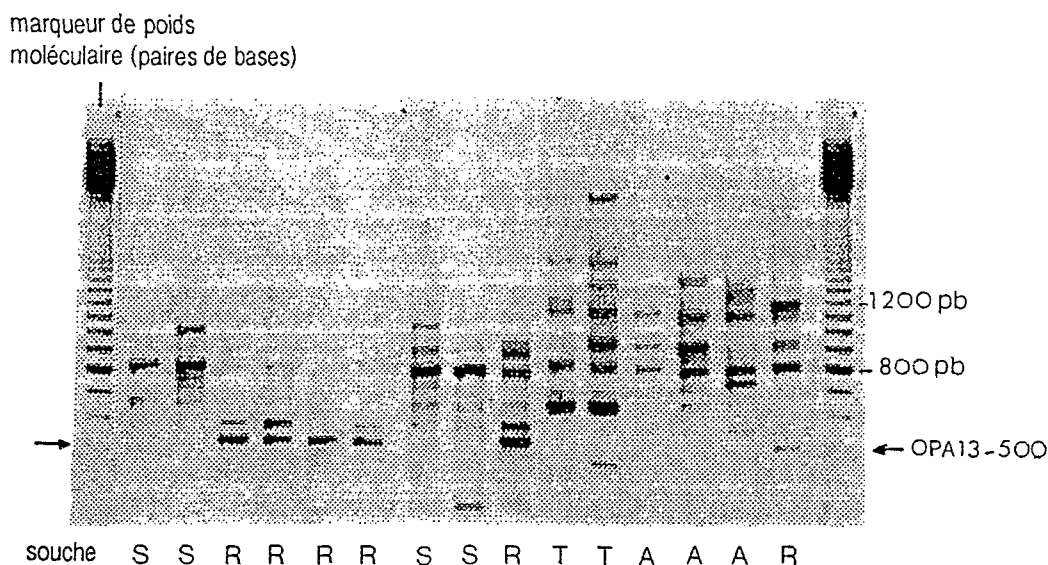


Figure 4: Polymorphisme des patterns d'amplification de l'ADN génomique générés par RAPD ("random amplified polymorphic DNA") dans quatre populations de *Typhlodromus pyri*. La flèche indique le marqueur OPA13-500 correspondant à une bande majeure reproductible et diagnostique de la souche R. Ce marqueur est présent dans la souche R et absent des souches A, T et S. Origine des populations: A: Aude (France), R Champagne (France), S: Suisse, T: République Tchèque. Les différentes populations sont reproductivement compatibles.

Figure 4: Polymorphism of amplification patterns of genomic DNA generated by RAPD (random amplified polymorphic DNA) in four populations of *Typhlodromus pyri*. The arrow shows marker OPA13-500 corresponding to a major reproducible, diagnostic band in strain R. This marker is present in strain R but absent in strains A, T and S. Sources of populations: A: Aude (France); R: Champagne (France); S: Switzerland; T (Czech Republic). The different populations are reproductively compatible.

CONCLUSIONS

La biologie moléculaire doit apporter des nouveaux éléments de réponse à des questions qui sont à la base d'une bonne gestion des populations des ravageurs et des auxiliaires:

- Clarification de la systématique et de la phylogénie.
- Détermination du statut spécifique des ravageurs observés sur différentes plantes hôtes et des niveaux d'échanges éventuels entre acariens de plantes cultivées et de plantes réservoirs.
- Estimation du niveau des échanges éventuels entre populations introduites et autochtones de prédateurs utilisés dans le cadre d'opérations de lutte biologique.

REFERENCES

- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, 16:10881-10889.
- Felsenstein, J. (1988) Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.*, 22:521-565.
- Felsenstein, J. (1993) PHYLIP phylogeny inference package version 3.5p, Dept. of genetics; SK50, University of Washington, Seattle, Washington, USA.
- Navajas, M., Cotton, D., Kreiter, S. et Gutierrez, J. (1992) Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.*, 15:211-218.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. et Erlich, H. A. (1988) Primer -directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. et Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18:6531-6535.