



**HAL**  
open science

## Des outils moléculaires pour caractériser la diversité réelle des thysanoptères en cultures ornementales et faciliter le diagnostic

Alexandre Bout, Anaël Marchand, Fabien Robert, Emmanuelle Silvy, Didier Crochard, Thibaut Malausa, Nicolas Ris, Philippe Reynaud

### ► To cite this version:

Alexandre Bout, Anaël Marchand, Fabien Robert, Emmanuelle Silvy, Didier Crochard, et al.. Des outils moléculaires pour caractériser la diversité réelle des thysanoptères en cultures ornementales et faciliter le diagnostic. *Innovations Agronomiques*, 2018, 63, pp.421-432. 10.15454/1.5191199117687397E12 . hal-02623097

**HAL Id: hal-02623097**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02623097v1>**

Submitted on 26 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## **Des outils moléculaires pour caractériser la diversité réelle des thysanoptères en cultures ornementales et faciliter le diagnostic**

**Bout A.<sup>1</sup>, Marchand A.<sup>1,2</sup>, Robert F.<sup>2</sup>, Silvy E.<sup>1,2</sup>, Crochard D.<sup>1</sup>, Malausa T.<sup>1</sup>, Ris N.<sup>1</sup>, Reynaud P.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Institut Sophia Agrobiotech (Université Côte d'Azur, INRA, CNRS, ISA), 400 route des Chappes, BP 167, F-06903 Sophia-Antipolis Cedex

<sup>2</sup> ASTREDHOR, 44 rue d'Alésia F-75682 Paris Cedex 14

<sup>3</sup> ANSES - Laboratoire de la Santé des Végétaux - Unité d'Entomologie et plantes invasives, 755 avenue du Campus Agropolis. CS 30016. F-34988 Montferrier-sur-Lez Cedex.

**Correspondance** : alexandre.bout@inra.fr

### **Résumé**

Les thrips comptent parmi les ravageurs les plus importants des agrosystèmes serres en raison des attaques récurrentes des espèces indigènes et envahissantes. Pourtant, la biodiversité, la distribution et l'écologie des différentes espèces de thrips sont encore peu documentées. Leur petite taille, la forte similitude morphologique entre les différentes espèces et leur discrétion en dehors des pullulations sur cultures expliquent probablement cette situation. Dans ce travail, nous nous sommes donc intéressés à la diversité des thysanoptères collectés en cultures ornementales en France *via* une approche de type « DNA-Barcoding » couplant une caractérisation moléculaire basée notamment sur une portion du gène mitochondrial cytochrome oxydase (COI) et une caractérisation précise sur des caractères morphologiques. Grâce à un vaste réseau collaboratif, plus de 1000 échantillons de thrips ont ainsi été échantillonnés parmi lesquels plusieurs centaines ont été caractérisés ce qui nous a permis i) de clarifier la diversité réelle des thrips dans ces agroécosystèmes, ii) de rechercher plus particulièrement certaines espèces spécifiques présentant des risques élevés et/ou nouvelles sur le territoire, iii) concevoir un outil de diagnostic moléculaire rapide, simple et peu coûteux pour leur identification en routine.

**Mots-clés** : Agro-écologie, agroécosystème serre, biocontrôle, DNA-Barcoding, identification moléculaire,

### **Abstract: Molecular tools to characterize greenhouses' diversity in ornamentals crops**

Thrips are among the most important pests in greenhouses worldwide because of recurrent outbreaks of both native and invading species. Yet, their biodiversity, distribution and ecology remain still poorly documented, probably because of their small size, the high morphological similarity between taxa and their discretion apart from the outbreak in crops. In this study, we thus developed a so-called DNA-Barcoding approach coupling, on one side, the sequencing of some molecular markers - e.g. a part of the mitochondrial marker Cytochrome Oxidase I (COI) – and, on the other, the precise examination of some morphological characters. Thanks to a collaborative network, several thousands of samples were hence collected in or around crops and more than 1000 individuals were characterized, making it possible (i) to clarify the actual diversity of thrips in these agroecosystems, ii) to focus on some particular (risky and/or invading) species, iii) to design a fast, simple and low cost molecular diagnostic tool for their identification.

**Keywords**: Agro-ecology, DNA Barcoding, molecular identification, ornamentals crops, sustainable agriculture

## Introduction

A l'heure actuelle, les itinéraires culturaux en général et les stratégies de protection en particulier sont reconsidérés à l'aune de deux préoccupations majeures que sont la réduction des intrants chimiques et l'adaptation à des nouvelles pressions de ravageurs. Dans le premier cas, il s'agit directement des conséquences de politiques globales (Directive européenne REACH, Grenelle de l'Environnement, plan Ecophyto, essor du biocontrôle) conduisant à identifier/évaluer/déployer des méthodes alternatives de régulation des ravageurs. L'adaptation à de nouvelles pressions de ravageurs est quant à elle la conséquence, d'une part, de la ré-émergence d'espèces indigènes, favorisées par le retrait de matières actives ou devenues résistantes et, d'autre part, de l'arrivée accrue d'espèces exotiques suite à la globalisation des échanges.

A ce double titre, le développement des stratégies « bas-intrants » nécessite souvent une meilleure connaissance de la composante biotique voire sa manipulation délibérée (introductions d'auxiliaires de lutte biologique, de plantes de services, etc.). Chez les Arthropodes, l'identification à l'échelle spécifique est fréquemment requise de façon, par exemple, à mieux évaluer les risques associés à une espèce nuisible ou le potentiel d'un auxiliaire de lutte biologique. Ce diagnostic étant toutefois compliqué par le manque d'experts disponibles par rapport aux besoins ainsi que par l'existence de complexes d'espèces dites cryptiques (voir par exemple *Malausa et al.*, 2011, *Correa et al.*, 2014 pour des exemples chez un autre type de ravageur). Ces complexes regroupent des espèces bien différenciées génétiquement, isolées reproductivement mais qui présentent cependant très peu de différences morphologiques.

L'exemple type de ravageurs mettant à mal les stratégies « bas-intrants » est l'ordre des *Thysanoptera*. Cet ordre comprend près de 5500 espèces connues dans le monde (Mound, 2002), dont près de 350 en Europe (Zur Strassen, 2003). Il existe à ces échelles une disparité des modes de vie avec notamment des espèces phytophages, saprophytes, mais également des espèces prédatrices. Parmi les thrips phytophages, certaines espèces (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, etc.) causent des pertes économiques majeures du fait des dégâts directs de nutrition et, parfois, de leur rôle de vecteurs de phytovirus (Van Lenteren et Loomans, 1998 ; Bodsgaard, 2004 ; Jones, 2005). Parmi les prédateurs, certaines espèces (*Franklinothrips vespiformis*, *Aeolothrips sp.*, etc.) sont connues pour consommer des ravageurs de cultures (thrips ou autres) et, à ce titre, peuvent/pourraient être mobilisées dans des stratégies de lutte biologique par conservation ou acclimatation. Cependant, ces espèces sont difficiles à détecter et encore plus à identifier au niveau spécifique. De ce fait, la diversité locale des thysanoptères peut être largement sous-évaluée (Pizzol *et al.*, 2014). Pour finir, certaines espèces, telles que *Frankliniella occidentalis*, peuvent effectivement appartenir à un complexe d'espèces cryptiques (Rugman-Jones *et al.*, 2010). Ces problèmes de diagnostic peuvent conduire à des erreurs de stratégie, responsables d'échecs dans la gestion du ou des bio-agresseur(s) (chronologie des interventions inadaptée, inefficacité du traitement chimique, échec de la lutte biologique) et, de ce fait, à des impasses dans la stratégie de production avec des « retours en arrière » voire une « fuite en avant » vers l'usage de toujours plus de pesticides.

Dans ce contexte, le projet BIOTHRIPIDAE a eu pour objectif principal d'étudier la diversité des thysanoptères en cultures horticoles sous serres *via* une approche de type « DNA-Barcoding » qui couple caractérisations moléculaire et morphologique (Hebert *et al.* 2003; Gariépy *et al.* 2007. Plus précisément, ce projet a reposé sur un partenariat entre ASTREDHOR (Institut Technique de l'Horticulture) et son réseau d'expérimentation, l'Institut Sophia-Agrobiotech (UMR ISA) et l'ANSES. Il s'est articulé en quatre volets principaux :

- Echantillonner précisément les populations de thysanoptères dans différentes cultures horticoles et à leurs abords,
- Identifier précisément *via* les méthodes de « DNA-Barcoding » les espèces rencontrées,

- Construire un outil de diagnostic simple, rapide et le moins onéreux possible pour les principales espèces rencontrées,
- Contribuer à une meilleure information auprès des techniciens, conseillers et agriculteurs concernant le risque « thrips » et sa gestion.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1 Echantillonnage

Un réseau d'échantillonnage a été constitué dès la première année du projet. Le dispositif s'est prioritairement appuyé sur les différentes stations du réseau ASTREDHOR participant à ce programme : les stations du CREAT, SCRADH, AREXHOR Pays de la Loire et GIE plante et fleurs du Sud-Ouest. Des prélèvements réguliers, bimensuels en moyenne à hebdomadaires en phase d'épidémie de thrips ont été réalisés dans des parcelles expérimentales de ces stations où chez des producteurs volontaires. Des prélèvements ont également été réalisés sur le site de l'INRA de Sophia-Antipolis suivant les mêmes modalités. Sur ce dernier, un prélèvement complémentaire a également été mené. Il a constitué en des prélèvements hebdomadaires sur l'ensemble des plantes naturelles et semi-naturelles du site. Afin d'augmenter les diversités de sites (région, pays) et de plantes hôtes collectées (petits fruits, tomates, etc.) et s'assurer d'une grande variabilité génétique dans les échantillons, la collection d'échantillons a été complétée par des prélèvements provenant d'autres partenaires (ARMEFLHOR à la Réunion, FREDON Martinique, FREDON Nord Pas de Calais, KOPPERT, Instituto Regional per la Floricultura, San Remo, en Italie) ou d'autres prospections menées par l'INSTITUT SOPHIA-AGROBIOTECH (Chili, Japon, Turquie). L'ensemble des échantillons est conservé en alcool >95%, à -20°C et à l'obscurité afin de ne pas dénaturer les ADN.

### 1.2 Présentation de la démarche de DNA-Barcoding

Pour chaque thrips, les extractions d'ADN sont réalisées avec le kit d'extraction ZYGEM PREPGEM® (VWR, Radnor, Pennsylvanie, USA). Ce kit est optimisé pour les applications basées sur la PCR et le séquençage en aval. Il permet une extraction d'ADN à partir d'insecte entier sans destruction de celui-ci. Il ne nécessite aucune étape de purification ou de lavage, mais seulement un tube (le mix : 10X buffer, l'enzyme et l'eau pure) et un cycle de thermocycleur en deux étapes (75°C et 95°C). Chaque thrips doit être introduit délicatement dans le puit lui correspondant. Le corps de l'insecte doit rester intact pour nous permettre, par la suite, de récupérer l'exosquelette (nous y ferons ci-dessous référence sous le terme de « voucher »), de le conserver dans l'alcool avant de l'étudier morphologiquement.

Trois régions génétiques ont été amplifiées par PCR (Polymerase chain reactions) :

i) le gène mitochondrial Cytochrome oxydase 1 (COI) codant pour une protéine avec le couple d'amorces LCO (5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG 3') and HCO (5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3') (Buckman *et al.*, 2013),

ii) le gène nucléaire de la sous-unité 28S du ribosome avec le couple d'amorce C-28SLong-R (5' GAGAGTTMAASAGTACGTGAAAC 3') and C-28SLong-F (5' TCGGARGGAACCAGCTACTA 3') (Malausa, unpublished),

iii) le gène nucléaire non codant ITS2 avec le couple d'amorces T-ITS2-F (5' TGTGAACTGCAGGACACATG 3') and T-CS250 (5' GAGGAAAAGAAACRAAC 3') (Rugman-Jones, 2010).

Les PCR ont été réalisées à l'aide de la Phusion High-Fidelity DNA polymerase F-530L (FINNZYMES, Finland), dans un volume final total de 25 µL (23 µL de mix + 2 µL d'extrait d'ADN pure). La

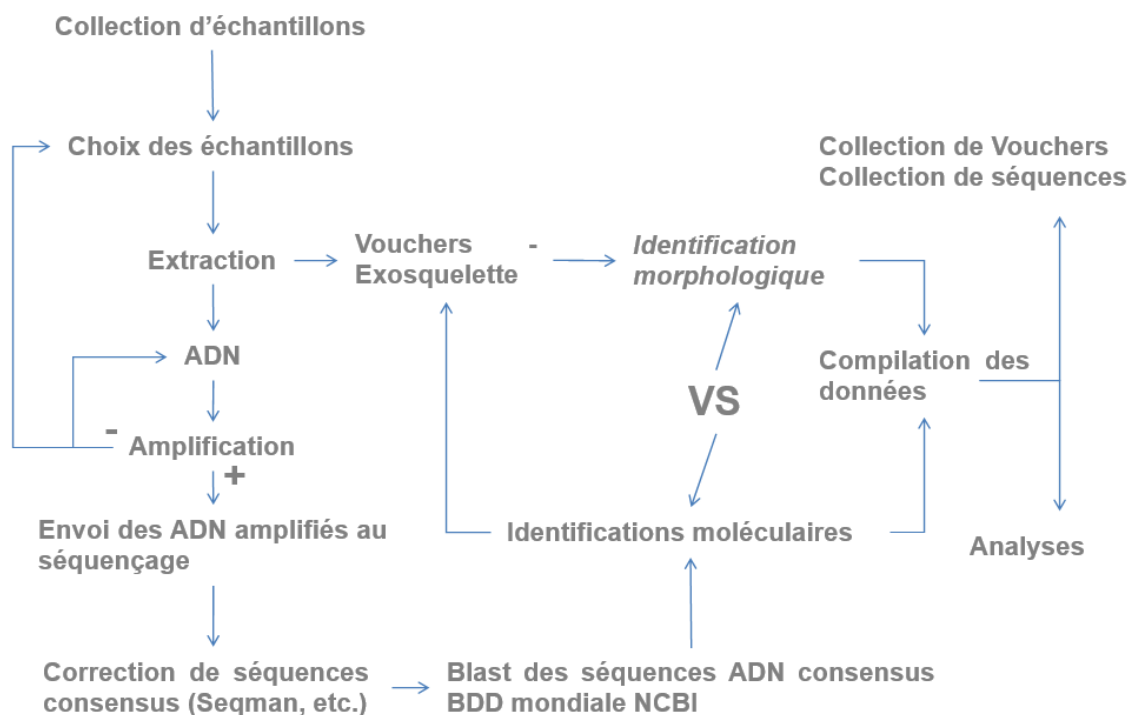
concentration pour chaque réaction est de : 1 x Phusion HF buffer, 0.01 U/  $\mu$ L Phusion enzyme, 200  $\mu$ M dNTPs and 0.5  $\mu$ M de chaque primer. Les conditions de PCR sont :

- Une dénaturation initiale à 95°C durant 15 min
- Une série de 40 cycles de (i) dénaturation à 95 °C durant 30 s, (ii) appariement entre 50°C et 54°C durant 90 s (50°C pour LCO-HCO; et 54°C pour 28S et ITS2), (iii) élongation à 72°C durant 60 s
- Une extension finale à 60°C durant 30 minutes (LCO\_HCO) et à 72°C durant 10 minutes (28S and ITS2).

Les produits de PCR sont ensuite envoyés pour séquençage double sens à la société Beckman Coulter Genomics (Essex, France). Les séquences obtenues sont ensuite corrigées et alignées manuellement (BioEdit, Seqscape, etc.) puis confrontées à celles connues et référencées dans la base de données internationale GenBank.

Les « vouchers » correspondant à une fraction représentative des individus ainsi caractérisés moléculairement sont envoyés à P. Reynaud, spécialiste reconnu de la taxonomie des thysanoptères, pour identification et/ou confirmation morphologique. Les individus ainsi déterminés morphologiquement sont montés en préparation microscopique entre lame et lamelle après décoloration au KOH (5%). Les Vouchers sont alors placés dans une goutte de Baume du Canada. Toutes les lames sont immédiatement référencées et les déterminations réalisées sous microscope optique à contraste de phase. Les identifications sont réalisées à l'aide de la clé taxonomique des thrips européen de Zur Strassen (2003). Les vouchers sont alors déposés dans la collection de référence officielle des Thysanoptères en France au sein du Laboratoire de la Santé des Végétaux, ANSES, Campus International de Baillarguet, Montferrier sur-Lez, France.

La Figure 1 résume le flux de travail suivi par un échantillon.



**Figure 1** : Schéma du processus d'analyse mis en place pour les échantillons dans le cadre de l'approche « DNA-Barcoding » du projet BIOTHRIPIDAE.

### 1.3 Réalisation d'un outil de diagnostic moléculaire

Sur la base des appariements entre caractérisations moléculaire et morphologique, l'objectif est de développer un outil permettant d'identifier rapidement, simplement et à faible coût des thrips parmi ceux les plus fréquemment observés sur cultures horticoles et/ou présentant un intérêt significatif pour la gestion de ces cultures. La conception de ce kit de diagnostic moléculaire nécessite d'une part, pour chaque espèce prise en compte, la définition de couple d'amorces dites « espèces-spécifiques » permettant l'amplification uniquement pour l'espèce considérée et, d'autre part, une réflexion globale afin que les produits PCR générés par les différents couples d'amorces espèces-spécifiques présentent des tailles suffisamment contrastées (différence supérieure à 100 paire de bases entre les tailles les plus proches) pour être distingués lors de la phase de révélation *via* l'usage d'un robot de type Quiaxcel comme à l'Institut Sophia Agrobiotech mais également sur gel d'électrophorèse (technique basique plus susceptible d'être utilisée en routine).

Concernant la définition des amorces espèces spécifiques, plusieurs critères ont été pris en compte notamment :

- Une absence d'hybridation entre les amorces
- Une température d'hybridation ( $T_m$ ) proche entre les différentes amorces pour homogénéiser leur fonctionnement,
- Un nombre de sites diagnostic le plus élevé possible (zones de spécificité stricte entre l'amorce et l'ADN cible),
- Un pourcentage de nucléotides GC présent dans les amorces qui doit se situer entre 40 et 60%,
- La présence de GC aux extrémités 3' des amorces pour favoriser leur hybridation,
- Dans une large mesure, ce travail est facilité par le logiciel SP-Designer (Villard et Malausa, 2012 v6.5.0.0).

Afin d'en tester la robustesse, le kit ainsi obtenu est ensuite testé d'abord avec des ADN préalablement identifiés (vérification d'éventuels « faux positifs » ou « faux négatifs ») puis avec des individus non caractérisés jusque-là (évaluation du pourcentage global de réussite incluant l'extraction).

## 2. Résultats

### 2.1 Echantillonnage et Concordance des approches moléculaire et morphologique

La collection de thrips obtenue dans le cadre de ce projet comprend plus de 1000 échantillons (Tableau 1) qui correspondent chacun à un prélèvement de thrips issu d'une parcelle, d'une même plante hôte (mais différentes plantes de cette espèce) et d'une même date.

Près de 1357 individus ont été soumis à la caractérisation moléculaire sur chacun des trois marqueurs (COI, ITS2 et 28S). Comme indiqué dans le Tableau 2, le pourcentage d'échec dans cette entreprise est faible, de l'ordre de 12% (167 / 1357).

Au final, 95, 118 et 163 haplotypes différents ont respectivement été obtenus pour les locus 28S, COI et ITS2 ce qui est conforme à ce que l'on pouvait escompter. Il convient de noter que la divergence (en particulier la présence de longues insertions ou délétions) observée pour le marqueur ITS2 est telle qu'elle ne permet pas de mener des reconstructions phylogénétiques. D'une façon générale, les résultats obtenus sur les gènes COI (détaillés ici) et 28S s'avèrent concordants. Comme indiqué dans la Figure 2, les résultats obtenus sur le gène COI mettent en évidence une quarantaine de « clusters »

c'est-à-dire de groupes de séquences assez différents entre eux, chacun incluant les séquences très proches entre elles.

Ces résultats moléculaires ont ensuite été croisés avec les séquences déjà disponibles sur la base de données Genbank et, surtout, avec le travail de caractérisation morphologique. D'une façon générale, les approches moléculaires et morphologiques se sont révélées concordantes. A priori, aucune espèce nouvelle pour la science n'a donc été mise en évidence lors ces caractérisations. La seule exception majeure à cette concordance concerne *F. occidentalis*. En effet, les individus identifiés morphologiquement comme tels se distribuent dans 3 « clusters » moléculaires clairement différenciés. Des travaux complémentaires doivent encore être menés pour clarifier cette situation.

**Tableau 1 :** Tableau récapitulatif des prélèvements obtenus dans le cadre du projet BIOTHRIPIDAE. Chaque population correspond à un prélèvement de 1 ou plus thrips sur un site, une espèce de plante hôte pour une ou plus plante de cette espèce et une date donnée. Dans un « tube populationnel », plusieurs espèces peuvent être en mélange.

	Nombre de populations	Nombre de sites de prélèvements	Dates de prélèvements	Plantes « hôtes »
Arexhor	25	4	19	11
Creat	124	4	56	28
GIE	52	7	34	15
SCRADH	81	5	38	22
RATHO	2	1	1	1
Armeñhor Réunion	63	8	11	17
Fredon Martinique	2	2	2	1
Fredon Nord pas de Calais	19	3	16	3
INRA UMR ISA	638	7	>100	73
Italie IRF San Remo	16	2	9	16
« Turquie »	10	4	1	6
Totaux	1032	47	Non pertinent	71 (plantes hôtes différentes)

## 2.2 Diversité des thrips en cultures ornementales

En s'appuyant sur la démarche de « DNA-Barcoding » précédemment discutée, Le Tableau 2, ci-après, récapitule les espèces rencontrées et leur fréquence. Plus d'une trentaine d'espèces ont ainsi été diagnostiquées sur l'ensemble des sites. Incontestablement, *Frankliniella occidentalis* domine dans ces cultures (plus de la moitié des individus identifiés), la seconde espèce étant *Thrips tabaci* (environ 15%). Numériquement parlant, les thrips prédateurs s'avèrent peu nombreux (moins de 3%) et sont représentés uniquement par le genre *Aeolothrips* (absence de *Frankliniella vespiformis*).

Le Tableau 2 précise également les « échecs » liés au deux méthodes (moléculaires et morphologiques). A noter que :

- Les « inconnus » correspondent à des individus dont les séquences d'ADN obtenues sont originales, mais auxquelles aucune correspondance morphologique n'a été associée, des thrips qui n'ont pu être identifié e.g. le voucher est une larve (les larves ne sont pas identifiables morphologiquement parlant) ou le voucher est trop abimé ;

- Les « échecs moléculaires » sont des individus qui n'ont pu être amplifiés pour aucun des 3 marqueurs et ce malgré les amplifications successives réalisées (détérioration globale de l'ADN après collecte).

Au final, ces limites sont très faibles (moins de 15%).

**Tableau 2 :** Liste des espèces identifiées dans le projet BIOTHRIPIDAE et nombre d'individus rencontrés pour chacune d'elles.

Espèce	nombre
<i>Aeolothrips collaris</i>	18
<i>Aeolothrips ericae</i>	1
<i>Aeolothrips propinquus</i>	3
<i>Aeolothrips tenuicornis</i>	9
<i>Echinothrips americanus</i>	11
<i>Frankliniella intonsa</i>	3
<i>Frankliniella occidentalis</i>	622
<i>Frankliniella shlutzei</i>	5
<i>Haplothrips andresi</i>	22
<i>Haplothrips leucantherni</i>	2
<i>Hercinothrips binctus</i>	6
<i>Hercinothrips femoralis</i>	25
<i>Karnyothrips flavipes</i>	1
<i>Megalurothrips sjostedti</i>	10
<i>Melanthrips fuscus</i>	13
<i>Microcephalothrips abdominalis</i>	1
<i>Neohydatothrips samayunkur</i>	2
<i>Nezothrips propinquus</i>	1
<i>Pezothrips kellyanus</i>	7
<i>Tenothrips croceicollis</i>	6
<i>Tenothrips frici</i>	13
<i>Thrips angusticeps</i>	20
<i>Thrips bourbonensis</i>	2
<i>Thrips flavus</i>	52
<i>Thrips hawaiiensis</i>	41
<i>Thrips major</i>	35
<i>Thrips minutissimus</i>	2
<i>Thrips nigropilosus</i>	1
<i>Thrips parvispinus</i>	8
<i>Thrips physapus</i>	19
<i>Thrips setosus</i>	4
<i>Thrips sp.</i>	1
<i>Thrips tabaci</i>	159
<i>Thrips verbasci</i>	9
Inconnues	61
Echec moléculaire	162
Total général	1357





**Figure 2** : Arbre phylogénétique obtenu pour le locus Cytochrome Oxydase I (COI) et qui illustre la diversité des thysanoptères collectés dans le cadre du projet. Cet arbre a été réalisé *via* la méthode de Neighbor Joining avec les paramètres des distances de Kimura 2 (500 répliques). Sont indiqués 3 clades distincts de *Frankliniella occidentalis*, indiquant une possible ambiguïté dans les identifications morphologiques.

### 2.3 Focus sur deux espèces invasives

*Thrips hawaiiensis* cité en France pour la première fois en 2008 (Reynaud et al, 2008) a été retrouvé à des fréquences un peu plus importantes que lors de l'étude précédente réalisée en 2008 par J. Pizzol (2012). Cela semblerait aller en faveur d'une installation de cette espèce. Bien que paraissant en augmentation et ayant été retrouvé dans les serres, ce thrips n'apparaît pas aujourd'hui comme une

espèce problématique. Cette fréquence un peu plus importante observée pourrait d'ailleurs être en partie due à la détection plus fine permise par la caractérisation moléculaire.

Ce travail de caractérisation a également permis d'identifier une espèce nouvelle sur le territoire métropolitain : *Thrips setosus* (Balme *et al.* In prep). Ce thrips a été rencontré quasi simultanément lors du projet et par des prélèvements ANSES, fin 2014, sur hortensias respectivement dans le Var et en Région Centre. C'est une espèce polyphage qui est également connue pour être vectrice de virus de plantes (Murai, 2001). D'après P. Reynaud (communication personnelle), il est encore tôt pour se prononcer sur un risque important concernant cette espèce et il convient d'être vigilant quant à son installation, sa répartition et son expansion sur le territoire, voire même aux dégâts qui pourraient lui être attribués. Vraisemblablement ce thrips aurait été introduit sur le territoire national *via* la filière hortensia. En effet, il a été préalablement rencontré dans d'autres pays d'Europe pour la première fois peu de temps auparavant, également sur hortensia (OEPP, 2014).

#### 2.4 Réalisation du kit de diagnostic moléculaire

Le kit a été *in fine* constitué sur la base du locus ITS2 qui est extrêmement variable. D'après le tableau général d'identification, les thrips phytophages les plus fréquemment identifiés ont été retenus pour ce kit : *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, *Thrips major*, *Thrips hawaiiensis*, *Echinothrips americanus* et *Hercinothrips femoralis*. Ces espèces ont été complétées par l'ajout d'un couple d'amorce espèce spécifique pour le genre *Aeolothrips sp. e.g.* des thrips prédateurs de thrips, et l'espèce de thrips de quarantaine sur le territoire métropolitain, *Thrips palmi*, à des fins de bio surveillance du territoire.

8 couples d'amorces espèces spécifiques ont été définis en 2 lots nécessitant des conditions d'amplification similaires et permettant d'aboutir à des tailles d'amplicons différents (Tableau 3).

Le kit a été testé sur 1310 échantillons inconnus (ADN et morphologie inconnus). Après vérification *via* séquençage et/ou confirmation morphologique, le kit de diagnostic a correctement identifié 1029 *Frankliniella occidentalis*, 102 *Thrips tabaci*, 17 *Thrips hawaiiensis*, 10 *Thrips major*, 6 *Echinothrips americanus* et 4 *Aeolothrips sp.* 142 spécimens n'ont pas été identifiés par le kit. Après vérification de ceux-ci, il apparaît que : 6.7% de ces inconnus correspondent réellement à des mauvaises identifications (espèces présentes dans le kit mais non reconnues), 23.8% sont des échecs d'amplification de l'ADN par la PCR (ADN de mauvaise qualité, dégradé) et que donc 68.27% correspondent à des individus clairement identifiés comme n'appartenant pas aux espèces ciblées par le kit de diagnostic. Ainsi, ramené au nombre total d'échantillons testés le kit de diagnostic moléculaire a présenté un taux d'échec total de 3.4% (les 2.7% d'échecs d'amplification inclus.).

En conclusion, le kit présente, en l'état, un taux de réussite de 96.6%.

**Tableau 3** : récapitulatif du kit de diagnostic moléculaire construit dans le projet BIOTHRIPIDAE. Sont indiquées les espèces de thrips intégrées dans le kit, le regroupement des PCR et conditions de celles-ci ainsi que les tailles de fragments amplifiés attendus en migration pour chaque espèce.

	Espèce	Taille amplicon attendu (en pb)
<b>PCR multiplex 1</b>	<i>Frankliniella occidentalis</i>	169
	<i>Thrips tabaci</i>	109
	<i>Echninothrips americanus</i>	248
	<i>Hercinothrips femoralis</i>	514
<b>PCR multiplex 2</b>	<i>Aeolothrips sp.</i>	136
	<i>Thrips major</i>	89
	<i>Thrips hawaiiensis</i>	233
	<i>Thrips palmi</i>	338

L'identification ainsi réalisée nécessite l'extraction de l'ADN, son amplification par PCR et sa migration sur gel. Le processus est ainsi plus rapide qu'une préparation microscopique morphologique, et moins onéreuse. Elle est évaluée à 5€ (hors coûts de main d'œuvre) par échantillon.

## Conclusion et discussion

Le projet BIOTHRIPIDAE a permis de constituer une collection d'échantillons de thysanoptères des cultures horticoles tout à fait remarquable. Le référentiel moléculaire qui en résulte est donc important avec un grand nombre de séquences nouvelles qui seront prochainement mises à disposition de la communauté scientifique *via* GENBANK. Les « vouchers » (exosquelette des thrips dont l'ADN a été extrait) ont été mis en collection de référence au sein de la collection ANSES hébergée au CBGP à Montpellier. L'ensemble - échantillons, référentiel moléculaire et vouchers en collection - présente donc une forte valeur ajoutée pour les études futures concernant les thysanoptères.

A partir de cette démarche de « DNA-Barcoding », nous avons développé des kits de détection moléculaire ciblant des espèces majoritaires mais également des espèces sous surveillance (cas de *Thrips palmi*, organisme de quarantaine sur le territoire métropolitain) ce qui permet d'ajouter une composante d'épidémiologie-surveillance du territoire, manquante à ce jour. En effet, le suivi de cette espèce dans le cadre de diagnostics de routine devrait permettre d'accroître notre capacité de détection d'introduction de cette espèce à fort potentiel de nuisibilité pour différentes cultures (horticoles ou non). Sur le même principe, l'intégration de séquences spécifiques de *Thrips setosus*, nouvelle espèce envahissante introduite sur le territoire, pourrait être envisagée. Plus généralement, l'adaptation de kits pour d'autres cultures est également envisageable à moindre frais. En fait, le défi principal concernant le déploiement de tels kits de diagnostic ne porte pas tant sur des aspects techniques - ils reposent en effet sur des compétences, techniques et équipement relativement faciles à acquérir - mais plutôt sur le « modèle économique » sur lequel ils doivent reposer : nature du prestataire de diagnostic, clientèle, tarifications, délais de réponse, aspects juridiques.

Pour conclure, plusieurs axes de recherche se dessinent suite à ce travail :

- **L'étude des interactions multi-trophiques impliquant les thrips.** De façon fortuite, le travail de caractérisation moléculaire a occasionnellement fourni des informations non seulement sur le thrips mais également sur les espèces écologiquement associées, de possibles proies (détection par exemple d'ADN de mineuses du genre *Lyriomiza* à l'intérieur de *F. occidentalis*) ou antagonistes (détection de nématodes entomopathogène du genre *Thripinema*) ainsi que des endosymbiotes bactériens (genre *Wolbachia* par exemple). Des techniques plus pointues d'extraction et d'amplification d'ADN pourraient permettre de caractériser simultanément plusieurs des partenaires (J-Y. Rasplus, comm. pers.)
- **L'évaluation de nouvelles solutions de biocontrôle** de certaines espèces de thrips phytophages basées, par exemple, sur l'utilisation de thrips prédateurs de thrips, parasitoïdes de thrips ou nématodes entomopathogènes. La possibilité de diagnostic précis des espèces rencontrées offre en effet, à ce titre, des bases solides pour la recherche d'ennemis naturels spécifiques et adaptés.
- **La caractérisation des populations de *Frankliniella occidentalis* via des marqueurs plus discriminants (marqueurs microsatellites par exemple).** L'idée serait de comparer les populations française collectées i) entre elles pour mettre en évidence une éventuelle structuration géographique, temporelle (mise en évidence d'inoculum externes ou non à la culture) et éventuellement liée à la plante hôte et ii) avec des populations issues de la zone d'origine de *F. occidentalis* (Californie) pour éventuellement mettre en évidence des populations proches ou non d'un phénotype californien de *F. occidentalis* associé à la transmission de phytovirus (Brunner and Frey, 2010). Ce travail est notamment possible car les prélèvements réalisés au sein du projet ont

permis de collecter un grand nombre de populations de *F. occidentalis* dans des contextes variés. Les marqueurs microsatellites nécessaires à ce travail et les protocoles de multiplexes ont déjà été développés.

## Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier les stations expérimentales du réseau Astredhor pour la réalisation des échantillonnages réguliers sur le terrain.

Ce travail a pu être mené grâce au support financier i) du ministère de l'agriculture à travers le projet Casdar IT1220 « Biodiversité des thysanoptères dans les agroécosystèmes semi-confinés et ii) du département scientifique « Santé des Plantes et Environnement » (SPE) de l'Inra à travers le programme « Approche de type « ADN-barcoding » sur les thrips d'intérêts agronomiques ».

## Références bibliographiques

- Balmès V., Bout A., Reynaud F., 2018. La faune des Thysanoptères de France s'enrichit d'une nouvelle espèce invasive : *Thrips setosus* Moulton, 1928 (Thysanoptera : Thripidae). Bulletin de Société Entomologique de France (in prep.).
- Brodsgaard H.F., 2004. Biological control of thrips on ornamental crops. In: Heinz KM, van Driessche RG and Parella MP (eds) Biocontrol in protected culture. Ball Publishing, Batavia, pp 253–264.
- Brunner P.C., Frey J.E., 2010. Habitat-specific population structure in native western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Insect, Thysanoptera). Journal of Evolution Biology, 23: 797-804.
- Buckman R., Mound L.A., Whiting M. F., 2013. Phylogeny of thrips (Insecta: Thysanoptera) based on five molecular loci. Systematic Entomology, 38: 123-133.
- Correa M.C.G., Zaviezo T., Le Maguet J., Herrbach E., Malausa T., 2014. Characterization of microsatellite DNA libraries from three mealybug species and development of microsatellite markers for *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). Bulletin of Entomological Resesearches, 104: 213-220.
- Desneux N., Asplen M., Brady C.M., Heimpel G.E., Hopper K.R., Lo C., Monticelli L., Olivier K.M., White J.A., 2017. Intraspecific variation in facultative symbiont infection among native and exotic pest populations: potential implications for biological control. Biological Control. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.06.007.
- Gariepy T.D., Kuhlmann U., Gillott C., Erlandson M., 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. Journal of Applied Entomology, 131, 225-240.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., DeWaard J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceeding of the Royal Society of Belgium, 270: 313-321.
- Murai T., 2001. Life history study of *Thrips setosus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100: 245-251.
- Jones D.R., 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 119–157.
- Malausa T., Fenis A., Warot S., Germain J.F., Ris N., Prado E., Botton M., Vanlerberghe-Masutti F., Sforza R., Cruaud C., Couloux A., Kreiter P., 2011. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied Entomology*, 135: 142-155.
- Mound L.A., 2002. Thysanoptera biodiversity in the Neotropics. *Review of Biological Tropics*, 50: 477-484.
- OEPP, 2014. [en ligne] (consulté le 2 mars 2016). <https://www.eppo.int/>
- Pizzol J., Nammour D., Voisin S., Ziegler M., Desneux N., Poncet C., Reynaud P., 2012. Survey of Thrips Species in Horticultural Greenhouses in Southern France. *Acta Horticulturae*, 952: 801-808.

Pizzol J., Nammour D., Rabasse J.M., Parolin P., Desneux N., Poncet C., Reynaud P., 2014. Species and population dynamics of thrips occurring inside and outside greenhouses cultivated with roses in southern France. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 2(4), 141-153.

Reynaud P., Balmes V., Pizzol J., 2008. *Thrips hawaiiensis* (Morgan, 1913) (Thysanoptera: Thripidae), an Asian pest thrips now established in Europe. *Bulletin OEPP*, 38:155-160.

Rugman-Jones P.F., Hoddle M., Stouthamer R., 2010. Nuclear-Mitochondrial Barcoding exposes the global pest western flower thrips (as two sympatric cryptic species in its native California. *Molecular Entomology*.103: 877-886.

Van Lenteren J.C., Loomans A.J.M., 1998. Is there a natural enemy good enough for biological control of thrips? In: *Proceedings of the British crop protection conference: pests & diseases*, vol 2, International conference, Brighton, UK, 16–19 November 1998, pp 401–408.

Van Maanen R., Broufas G., Ofejas M.F., Sabelis W.S., Jansen A., 2011. Intraguild predation among plant pest: western flower thrips feed on whitefly crawlers. *BioControl*, 57: 533-539.

Villard P., Malausa T., 2013. SP-Designer: a user-friendly program for designing species-specific primer pairs from DNA sequence alignments. *Molecular Ecology Resources*, 13, 755–758.

Zur Strassen R., 2003. Die terebranten Thysanopteren Europas und des Mittelmeer-Gebietes. [142] – 277 S., 771 Abb.; (Die Tierwelt Deutschlands, Teil 74); Keltern (Goecke & Evers).

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL)