



Apport de l'approche évolutive pour l'étude de l'invasion de l'acarien rouge de la tomate, *Tetranychus evansi*

Angham Boubou

► To cite this version:

Angham Boubou. Apport de l'approche évolutive pour l'étude de l'invasion de l'acarien rouge de la tomate, *Tetranychus evansi*. Biologie animale. Institut National d'Etudes Supérieures Agronomiques de Montpellier, 2010. Français. NNT: . tel-02814931

HAL Id: tel-02814931

<https://hal.inrae.fr/tel-02814931>

Submitted on 6 Jun 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.

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

**Apport de l'approche évolutive pour l'étude de l'invasion
de l'acarien rouge de la tomate, *Tetranychus evansi***

THÈSE

**Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO**

Discipline : Biologie des Organismes et des Populations

Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et
Environnement

Présentée par

Angham BOUBOU

Le 22 novembre 2010

Jury

Marie-Jeanne PERROT-MINNOT	Maître de conférences, Université de Bourgogne	Rapporteur
Thierry HANCE	Professeur, Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Isabelle OLIVIERI	Professeur, Université de Montpellier 2	Examinatrice
Francisco FERRAGUT	Professeur, Universitat Politècnica de Valencia	Examineur
Benoit FACON	Chargé de Recherches, INRA	Examineur
Maria NAVAJAS	Directrice de Recherches, INRA	Directrice de thèse
Denise NAVIA	Directrice de Recherches, EMBRAPA Cenargen	Membre invité

Résumé

L'acarier rouge de la tomate *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) est considéré comme une espèce invasive à fort impact économique sur les cultures de solanacées. Il a été découvert pour la première fois en 1954 au Brésil, d'où il est probablement originaire. Historiquement, *T. evansi* a d'abord été signalé en Afrique et plus récemment en Europe et en Asie. L'objectif de cette thèse était de reconstruire les routes de colonisation de *T. evansi* et de dégager le scénario évolutif décrivant le mieux l'histoire de l'invasion. Nous avons d'abord analysé des échantillons collectés dans son aire actuelle de distribution, à l'aide des séquences d'un fragment du gène codant pour la sous-unité I de la Cytochrome Oxydase (*COI*) de l'ADN mitochondrial et de la région ITS1-5,8S-ITS2 de l'ADN nucléaire ribosomique. Les données soutiennent l'hypothèse d'une origine sud américaine de cette espèce et ont révélé que des événements d'invasions multiples et cryptiques ont eu lieu lors de la colonisation de l'Europe. L'invasion résulte de deux lignées génétiquement divergentes et originaires de deux régions géographiques distantes au Brésil. Ces deux lignées semblent avoir des potentiels invasifs contrastés. Elles s'hybrident en laboratoire ainsi que dans la nature. Grâce à 16 locus microsatellites que nous avons développés et utilisés comme marqueurs, nous avons déterminé les zones géographiques de cette hybridation. Nous avons également pu estimer des paramètres historiques de l'invasion et confronter différents scénarios d'introduction, par la comparaison de la composition génétique des populations récemment introduites avec celles de l'aire d'origine de *T. evansi*, et par l'utilisation de la méthode d'inférence bayésienne (Approximate Bayesian Computation, ABC). Les résultats ABC contredisent partiellement le scénario d'invasion basé uniquement sur des données historiques. Ils suggèrent que *T. evansi* serait d'abord arrivé en Europe dans le sud de l'Espagne (en Andalousie) bien avant les signalements historiques. Ainsi, l'Andalousie semble avoir servi de source de colonisation pour des nouvelles zones d'Afrique, d'autres régions méditerranéennes et d'Asie. Les résultats de cette thèse ouvrent des perspectives d'étude visant à comprendre pourquoi certaines populations d'une espèce allochtone réussissent à s'établir et à envahir un nouvel écosystème.

Mots-clés : *Tetranychus evansi*, espèce invasive, routes de colonisation, microsatellites, l'ADN mitochondrial, invasion cryptique

Abstract

The red tomato spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) is regarded as an invasive species having an important economic impact on solanaceous crops. It was first discovered in Brazil in 1954, where it probably originated. Based on historical records, *T. evansi* was first reported in Africa and more recently in Europe and Asia. This work aims at reconstructing the colonization routes of *T. evansi* and identifies the scenario that best describes the evolutionary history of the invasion. To do this, we first analyzed samples collected from most parts of the world where the mite is currently known to occur. We used sequence variation of a fragment of the mitochondrial Cytochrome Oxidase (*COI*) sub-unit I gene and the ITS1-5.8S-ITS2 of the nuclear ribosomal DNA. Our results were consistent with the hypothesis of a South American origin of this species. They also suggested that the invasion of south Europe resulted from multiple cryptic introductions from two genetically divergent lineages originated from two distant geographical regions in Brazil. These two lineages seem to have a differential invasive potential. Despite the high genetic divergence, crosses between mites stemming from the two lineages do occur both in the laboratory and in nature. Second, we used 16 microsatellite loci that we developed for this study and in association with Approximate Bayesian Computation (ABC) methods; we reconstructed the historical events of the cryptic invasion of the pest. ABC results challenge the invasion scenario captured by historical data only. They suggest that *T. evansi* first arrived to Europe in Southern Spain (Andalusia) long before historic records. Thus, Andalusia seems to have served as a source for colonization of new areas in Africa and other Mediterranean regions. The results obtained in this thesis provide an interesting framework to further study and understand why some populations of an exotic species might become invasive.

Keywords: *Tetranychus evansi*, invasive species, colonization routes, microsatellites, Mitochondrial DNA, cryptic invasion.

Remerciements

Tous mes profonds remerciements vont d'abord à ma directrice de thèse, **Maria Navajas**. Je te remercie chaleureusement pour l'aide continue que tu m'as apportée, pour ta patience et ton encouragement à mener à terme ma thèse. Ton œil critique et ta rigueur scientifique m'ont été très précieux pour structurer et parfaire le travail. Ton soutien moral et ton encouragement jusqu'au bout de cette thèse, m'ont permis de mener à bien cette expérience et de me préparer à ma future carrière dans la recherche dans mon pays.

Je tiens à remercier vivement **Alain Migeon** et **Philippe Auger** pour leurs aides, discussions, commentaires et remarques qui ont contribué au développement et à l'amélioration de ce travail.

Mes remerciements vont évidemment aux personnes qui me font l'honneur de constituer mon jury de thèse. Je tiens à remercier **Marie-Jeanne Perrot-Minot** et **Thierry Hance** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à **Isabelle Olivieri**, **Francisco Ferragut**, **Benoit Facon** et **Denise Navia**.

Je voudrais remercier également les membres de mon comité de thèse **Philippe Jarne**, **Serge Kreiter**, **Gaël Kergoat**, **George Roderick** et **Francisco Ferragut**.

Mes remerciements vont également à mon pays, **la Syrie**, qui m'a permis de terminer cette formation, en me fournissant les ressources nécessaires. Que tous ceux qui ont contribué à faciliter cette étude dans ce cadre trouvent ici le témoignage de ma sincère gratitude. Un grand merci également à tous les membres du bureau culturel de l'ambassade de la Syrie à Paris pour leur disponibilité, sympathie et aide.

Je remercie du fond du cœur **Marie-Pierre**, **Renata**, **Faith**, **Mireille**, **Juliette**, **Dounia**, **Charlotte**, **Fabien** et **Anne Paris**, qui m'ont tous aidée de multiples façons pendant mon séjour en France.

Un grand remerciement à **l'ensemble des personnes du CBGP** pour lesquelles j'exprime toute ma sympathie pour leur accueil et en particulier **Philippe Audirot**, **Nathalie Gauthier**, **Carine Brouat**, **Sabine Guichou** et **Sylvie Hart** pour leur aide et gentillesse.

Je voudrais adresser mes remerciements à tous mes amis ici en France et ailleurs. Leur amitié sincère et leur sympathie m'ont aidée à surmonter beaucoup d'épreuves au cours de mon séjour en France. Je remercie particulièrement **Roua, Rasha, Roula, Nida, Aurélie, Thomas, Darine, Pierre, Anne, Nathalie** et **Nadera**.

Merci de tout mon cœur à mon cher époux, **Sakhr**, qui a su être à mes côtés à tout moment même à plusieurs milliers de kilomètres, m'encourager, me soutenir et avoir cru en moi quoi qu'il arrive. Je te remercie infiniment pour ton amour, tes sacrifices, ta patience, ton soutien et pour tout ce que tu es pour moi.

Enfin, mes énormes remerciements vont à **mes parents** et à **mon frère**. Merci pour votre soutien inconditionnel, merci pour m'avoir appris à mener les choses jusqu'au bout.

Liste des publications

ARTICLE I. 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**, 485-501.

ARTICLE II. Cros-Arteil S., Migeon A., **Boubou A.**, Navia D., Navajas M. 2009 Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium. 2009. Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources database 1 January 2009–30 April 2009. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1375–1429.

ARTICLE III. **Boubou A.**, Migeon A., Roderick G., Navajas M. 2010 Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. *Biological Invasions*. doi: 10.1007/s10530-010-9791-y.

ARTICLE IV. **Boubou A.**, Migeon A., Roderick G., Auger P., Cornuet J.M., Navajas M. Test of colonisation scenarios challenges historical data in reconstructing the invasion history of the red tomato spider mite *Tetranychus evansi*. En préparation.

ARTICLE V. **Boubou A.**, Migeon A., Lebdi-Grissa K., Navajas M. 2009. Genetic diversity of the invasive tomato spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in the Mediterranean basin, assessed by sequences of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS). *IOBC/WPRS Bulletin*. **49**, 115-119.

Communications à des congrès

- C1. **Boubou A.**, Cros-Arteil S., Navajas M. 2006. Genetic markers to trace the dissemination of *Tetranychus evansi*, a new invasive spider mite in Europe. XIIth International Congress of Acarology, 21-26 August 2006, Amsterdam, The Netherlands. (résumé et Poster en Annexe II).
- C2. Navajas M., **Boubou A.**, Migeon A. 2007. Invasive species: a genetic approach to understand movements and evaluate the risk of expansion of pests. 4th African Acarology Symposium, 22-26 October 2007, Hammamet, Tunisia. (Communication orale) (résumé en Annexe II).
- C3. **Boubou A.**, Navajas M. 2007. Approche évolutive pour l'étude des invasions biologiques : biogéographie et écologie de l'acarien rouge de la tomate *Tetranychus evansi*. 2^{ème} rencontres francophones, 14 -16 novembre 2007, Rennes, France. (Communication orale) (résumé en Annexe II).
- C4. **Boubou A.**, Navajas M. 2008. Movement of pests: What a phylogeographical study tell us about the colonisation of new continents by the invasive tomato spider mite *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard? 6th Symposium of European Association of Acarologists, 21-25 July 2008, Montpellier, France. (Communication orale) (résumé en Annexe II).
- C5. **Boubou A.**, Migeon A., Lebdi-Grissa K., Navajas M. 2009. Genetic diversity of the ribosomal internal transcribed spacers regions in the invasive tomato spider mite *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae) in the Mediterranean basin. IOBC/WPRS Working Group "Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate". Preceedings of the meeting at Chania, 6-11 September, Crete, Greece 2009. (Communication orale) (résumé en Annexe II).
- C6. **Boubou A.**, Migeon A., Auger P., Navajas M. 2010. How much environmental conditions drive the invasive potential of *Tetranychus evansi*. XIIIth International Congress of Acarology, 23-27 August 2010, Recife, Brazil. (Communication orale) (résumé en Annexe II).

Liste des annexes

Annexe I Article V. Boubou A., Migeon A., Lebdi-Grissa K., Navajas M. 2009. Genetic diversity of the invasive tomato spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in the Mediterranean basin, assessed by sequences of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS). *IOBC/WPRS Bulletin*. **49**, 115-119.

Annexe II Résumés des communications à des congrès **C1, C2, C3, C4, C5 et C6.**

Annexe III Caractérisation de 16 loci microsatellites isolés chez *Tetranychus evansi*.

Annexe IV Distribution des fréquences alléliques dans les échantillons analysés de *Tetranychus evansi* à l'aide des marqueurs microsatellites.

Liste des figures

Figure 1. La gravure de 1893 représentant l'arrivée de Christophe Colomb aux Amériques en 1492.

Figure 2. Taux annuel d'augmentation de l'établissement des espèces exotiques : mammifères, invertébrés et plantes en Europe depuis l'an 1500 (d'après Hulme, 2009).

Figure 3. Patrons temporels des introductions de vertébrés de l'Europe vers l'Amérique du Nord et vice-versa (d'après Jeschke, Strayer, 2005).

Figure 4. Trajectoires de tous les navires de charge (plus de 10 000 tonneaux de jauge) en 2007 (d'après Kaluza *et al.*, 2010).

Figure 5. Régions d'origine des arthropodes exotiques en Europe : (a) total des arthropodes et (b) insectes (d'après Roques, 2010).

Figure 6. Schéma des différentes étapes d'une invasion biologique (modifié d'après Sakai *et al.*, 2001).

Figure 7. Différences morphologiques entre les femelles et les mâles de différentes espèces de *Tetranychus* rouges.

Figure 8. Aspect dorso-ventral d'une femelle de Tetranychidae (modifié d'après Gutierrez, 1985).

Figure 9. Mâle (♂), femelle (♀) et œuf (W) de *Tetranychus evansi* (Photo : Migeon A.).

Figure 10. Les stades de développement des Tetranychidae (modifié d'après (Gutierrez, 1991).

Figure 11. Formation des amas d'acariens (flèches bleues) observés dans des colonies de *Tetranychus evansi* sur tomate sous serre à Nice (France 2007) (Photo : Migeon A.).

Figure 12. Forte attaque de *Tetranychus evansi* sur tomates (plante et fruit) (Photo : Migeon A.).

Figure 13. Colonies de *Tetranychus evansi* dont le tissage regroupe les organes foliaires d'un plant de tomate (les deux premières photos à gauche) et d'aubergine (à droite) (Photo : Migeon A.).

Figure 14. Distribution actuelle de *Tetranychus evansi* basée sur les données bibliographiques et nos observations.

Figure 15. La distribution mondiale potentielle de *Tetranychus evansi* modélisée par le logiciel CLIMEX (d'après Migeon *et al.*, 2009).

Figure 16. Spectre de plantes hôtes de *Tetranychus evansi* basé sur les signalements historiques.

Figure 17. Localisation des échantillons de *Tetranychus evansi* analysés.

Figure 18. Distribution des haplotypes mitochondriaux dans les localités analysées.

Figure 19. Relations phylogénétiques inférées par la méthode de Neighbour-Joining sur la base des séquences *COI* et des séquences ITS ribosomiques.

Figure 20. Réseau d'haplotypes mitochondriaux obtenu pour les échantillons analysés.

Figure 21. Arbre Neighbor-Joining des populations de *Tetranychus evansi* réalisé à partir des données de marqueurs microsatellites.

Figure 22. Détermination du nombre de groupes génétiquement distincts (K) selon la méthode décrite par Evanno *et al.* (2005).

Figure 23. Représentation graphique de la probabilité d'affectation des individus aux clusters obtenus à l'aide du logiciel STRUCTURE.

Figure 24. Schéma des trois scénarios évolutifs d'introduction reliant les populations de *Tetranychus evansi* considérées pour inférer les routes d'introduction en Afrique et en Europe.

Figure 25. Probabilités *a posteriori* des scénarios obtenues par une régression logistique

Figure 26. Distributions *a priori* et *a posteriori* des paramètres sous le scénario choisi.

Figure 27. Schéma du scénario d'hybridation.

Figure 28. Distributions *a priori* et *a posteriori* des paramètres sous le scénario d'hybridation.

Liste des tableaux

Tableau 1. Voies d'introduction des arthropodes terrestres exotiques en Europe (d'après Rabbitsh, 2010).

Tableau 2. Position taxonomique de l'espèce *Tetranychus evansi*.

Tableau 3. Principaux caractères morphologiques différenciant *Tetranychus evansi* et *Tetranychus marianae*.

Tableau 4. Variabilité génétique des populations de *Tetranychus evansi* analysées à l'aide de 16 marqueurs microsatellites.

Table des matières

Guide de lecture	12
Chapitre I.....	14
I Introduction générale	15
I.1 Les invasions biologiques : historique et définitions	15
I.2 Rôle de l'Homme dans l'ampleur du phénomène de l'invasion biologique.....	16
I.3 Impacts de l'invasion biologique.....	22
I.3.1 Impact écologique	22
I.3.2 Impact économique	23
I.3.3 Impact sanitaire et social	24
I.4 L'invasion biologique : processus écologique et évolutif	26
I.4.1 Les principales étapes de l'invasion biologique.....	26
I.4.1.1 L'introduction	26
I.4.1.2 L'établissement	28
I.4.1.2.1 La colonisation initiale	28
I.4.1.2.2 La naturalisation	29
I.4.1.3 Prolifération	30
I.4.2 Compréhension de l'invasion biologique.....	31
I.4.2.1 Caractéristiques des espèces invasives	31
I.4.2.2 Caractéristiques des communautés envahies	32
I.4.2.3 Approche éco-évolutive	33
I.4.3 Paradoxes évolutifs	34
Chapitre II	36
II Etude de l'espèce invasive <i>Tetranychus evansi</i> l'acarier rouge de la tomate.....	37
II.1 Position systématique de <i>Tetranychus evansi</i>.....	37
II.1.1 Notes sur la taxonomie	39
II.1.2 Identification d'un cas récent de synonymie.....	41
II.2 Généralités sur les tétranyques	41
II.2.1 Morphologie	41
II.2.2 Cycle de développement	43
II.2.3 Mode de reproduction et ses conséquences.....	43
II.2.4 Sex ratio.....	45
II.2.5 Dispersion.....	45
II.2.6 Symptômes et dégâts	47
II.3 Caractéristiques biologiques de <i>Tetranychus evansi</i>	49
II.3.1 Aire de répartition géographique actuelle	49
II.3.2 Traits d'histoire de vie et conditions climatiques.....	49
II.3.3 Potentiel invasif de <i>Tetranychus evansi</i>	50
II.3.4 Plantes hôtes	52
II.3.4.1 La tomate	53
II.3.4.2 Autres plantes hôtes	54
II.3.5 Impact socio-économique de <i>Tetranychus evansi</i>	54

II.3.6	Ennemis naturels de <i>Tetranychus evansi</i>	55
Chapitre III		58
III	Marqueurs moléculaires et description de la variabilité génétique au sein des populations de <i>Tetranychus evansi</i>.....	59
III.1	Choix des marqueurs moléculaires.....	59
III.2	Matériel biologique	61
III.3	Description de la variabilité génétique populationnelle.....	63
III.3.1	Description de la diversité génétique des séquences <i>COI</i>	63
III.3.2	Description de la diversité génétique des séquences <i>ITS</i>	65
III.3.3	Isolement de loci microsatellites chez <i>Tetranychus evansi</i>	67
III.3.3.1	Polymorphisme des marqueurs microsatellites.....	67
III.3.3.2	Variation génétique populationnelle	67
III.3.3.3	Différenciation et structure génétique des populations.....	68
III.3.3.3.1	Indices de différenciation	68
III.3.3.3.2	Inférence de structuration génétique des populations à l'aide du logiciel STRUCTURE	72
III.4	Scénarios d'introduction en Europe et en Afrique	74
III.5	Événement d'hybridation	78
Chapitre IV		80
IV	Routes de colonisation de <i>Tetranychus evansi</i>	81
IV.1	Introduction	81
IV.2	L'Amérique du sud est-elle l'aire d'origine de <i>Tetranychus evansi</i> ?.....	81
IV.3	Événement d'introduction dans les aires envahies.....	84
IV.3.1	Multiples introductions dans le bassin Méditerranéen	84
IV.3.2	Événements d'introductions en Afrique et en Asie.....	85
IV.4	Événement d'hybridation	86
IV.5	Confrontation des données génétiques et historiques	86
Chapitre V		91
V	Conclusion générale et perspectives	92
V.1	Succès de l'invasion de <i>Tetranychus evansi</i>	92
V.2	Validation des scénarios de colonisation de <i>Tetranychus evansi</i>	95
Bibliographie		96
Annexes		110

Guide de lecture

Principaux objectifs de la thèse et déroulement des travaux

L'objectif de cette thèse est d'apporter des informations nouvelles sur l'histoire de l'invasion de l'acarien rouge de la tomate *Tetranychus evansi*. Sa connaissance reposait auparavant uniquement sur des signalements historiques. J'ai réalisé une étude de la variabilité génétique visant à reconstruire les routes de colonisation et à dégager le scénario évolutif décrivant le mieux l'histoire de l'invasion.

Outre les conséquences économiques et écologiques des invasions, qui dans le cas de cet acarien ravageur des cultures ont un impact agronomique considérable, sur un plan théorique, les bioinvasions offrent une opportunité exceptionnelle pour étudier les processus évolutifs dans les populations sur une courte échelle de temps. Au cours de cette thèse j'ai tiré profit de l'étude de *T. evansi* pour réfléchir aux phénomènes qui déterminent l'évolution des espèces dans le cadre des phénomènes d'invasion (**Chapitre I**).

Un préalable à toute étude est la bonne connaissance du matériel biologique sur lequel on travaille, incluant par exemple une identification correcte. C'est une tâche qui s'avère peu aisée dans le cas des acariens Tetranychidae en général et notamment dans le cas de *T. evansi* que l'on peut confondre avec des espèces morphologiquement proches. Je me suis donc attelée à reconnaître les caractères morphologiques qui permettent de séparer *T. evansi* des autres *Tetranychus* (**Chapitre II**).

Les marqueurs génétiques neutres sont à la base de toute étude de génétique des populations. J'ai mis au point chez *T. evansi* puis utilisé en routine deux fragments de séquences nucléotidiques, la *COI* mitochondriale et des espaceurs ribosomiques nucléaires (ITS). Ils se sont révélés informatifs à une échelle phylogéographique large. Il s'est avéré intéressant au cours de la thèse d'inclure les marqueurs microsatellites pour pouvoir aborder une étude aux échelles locale et régionale. J'ai participé à l'isolement et la caractérisation chez *T. evansi* d'une batterie de 16 locus microsatellites. Avec ces marqueurs génétiques puissants en main et après une vaste campagne d'échantillonnage dans la zone native et celles nouvellement

colonisées par *T. evansi*, j'ai quantifié la diversité génétique de ses populations (**Chapitre III**).

Je me suis basée sur ces descriptions de la variabilité génétique pour reconstituer différentes étapes clés de l'invasion (aire d'origine, nombre d'événements fondateurs, routes de colonisation). J'ai ensuite appliqué les méthodes ABC pour tester les scénarios invasifs alternatifs (**Chapitre IV**).

Les résultats de cette thèse ouvrent des perspectives d'étude visant à comprendre pourquoi certaines populations d'une espèce allochtone réussissent à s'établir et à envahir un nouvel écosystème. Je présente et discute certaines hypothèses qui ont émergé lors de mes travaux et qui semblent aisément testables avec le modèle *T. evansi* (**Chapitre V**).

Les résultats de cette thèse ont fait l'objet de **4 publications**. Elles sont intégrées dans les différents chapitres.

Chapitre I

I Introduction générale

I.1 Les invasions biologiques : historique et définitions

Le terme « invasion » a été utilisé pour la première fois par Goeze (1882) dans un contexte écologique (cité dans Rejmanek *et al.* 2002). Il abordait la propagation des espèces non indigènes sans aucun lien avec les impacts négatifs ou positifs sur le milieu colonisé. C'est également dans ce sens que ce terme a été utilisé par les écologistes dans la première moitié du siècle dernier (Rejmánek *et al.*, 2002). C'est avec la publication du livre d'Elton, « *The Ecology of Invasions by Animals and Plants* », en 1958, que le thème de l'invasion écologique est devenu une discipline à part entière. Cet ouvrage fondateur a révolutionné notre perception sur la variété et l'importance des impacts dus aux invasions biologiques. Depuis sa publication, l'étude des invasions biologiques a pris de plus en plus d'essor dans la littérature scientifique, d'un point de vue écologique et plus récemment évolutif. Dans ces études, différents termes ont été attribués aux espèces invasives : espèces exotiques, non indigènes, non autochtones, allochtones, non natives, colonisatrices, naturalisées, importées, introduites, etc. Cette profusion de termes révèle clairement l'ambiguïté entourant la notion d'invasion biologique elle-même (Valéry *et al.*, 2008). Dans son livre, Elton n'a pas clairement défini les termes « invasion » ou « envahisseur » comme Rejmánek *et al.* (2002) l'ont indiqué. Il a abordé des exemples sur des espèces introduites ayant eu des impacts écologiques et économiques importants. Il a également discuté la propagation de certaines espèces exotiques qui n'ont pas eu d'impacts évidents. Il semble qu'Elton ait appliqué ces termes d'une manière assez générale sans nécessairement les relier aux notions d'impacts écologique ou économique. Depuis, de très nombreuses définitions de l'invasion ont été élaborées (Colautti, MacIsaac, 2004; Davis, Thompson, 2000; Kolar, Lodge, 2001; Mack *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2000; Williamson, 1996). Toutefois, celles-ci ont engendré de nombreuses confusions dues au manque de pertinence de deux principaux critères (la géographie et l'impact) utilisés pour définir les espèces envahissantes (Rejmánek *et al.*, 2002; Valéry *et al.*, 2008).

Dans les définitions basées sur le critère de géographie, les espèces envahissantes sont des espèces qui étendent leur aire de répartition soit en dépassant une importante barrière géographique (Colautti, MacIsaac, 2004; Richardson *et al.*, 2000) soit en ayant parcouru une grande distance (Davis, Thompson, 2000). Parmi ceux qui ont adopté cette définition, certains

ne distinguent pas la prolifération des espèces indigènes de celle des espèces exotiques (Davis, Thompson, 2000) d'autres excluent les espèces indigènes du phénomène d'invasion, même si elles commencent à envahir et dominer dans certaines communautés (Colautti, MacIsaac, 2004; Richardson *et al.*, 2000).

Dans la définition basée sur l'impact, une espèce, native ou exotique, doit avoir un impact négatif (écologique ou économique) dans son nouvel environnement pour qu'elle soit considérée envahissante (Davis, Thompson, 2000).

Dans leur revue, Valéry *et al.* 2008 ont analysé ces deux critères et ont proposé la définition suivante : une espèce est considérée comme invasive lorsqu'elle acquiert un avantage compétitif suite à la disparition des obstacles naturels à sa prolifération, ce qui lui permet de se propager rapidement et de conquérir de nouvelles aires au sein des écosystèmes receveurs dans lesquels elle devient dominante.

Conformément aux définitions de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature), les espèces envahissantes sont des taxons exotiques (végétal, animal ou microbien) introduits par l'homme, intentionnellement ou accidentellement, qui perturbent les écosystèmes, les habitats ou les espèces indigènes avec des conséquences négatives écologiques et/ou économiques et/ou sanitaires (IUCN, 2000).

Dans cette thèse, j'ai adopté une définition des espèces invasives restreinte aux espèces exotiques introduites volontairement ou accidentellement, qui réussissent à s'établir et à se répandre en dehors de leur aire d'origine et ayant un impact négatif pour l'homme. Il est toutefois important de noter qu'une espèce invasive est constituée de populations fortement hétérogènes dans son aire d'origine (Lee, 2002). Un nombre croissant d'études révèlent que certaines populations peuvent devenir envahissantes alors que d'autres non (Caldera *et al.*, 2008; Foucaud *et al.*, 2010; Lee, 2002; Winkler *et al.*, 2008). Ceci suggère que le caractère envahissant est caractéristique de certaines populations et non spécifique à une espèce.

I.2 Rôle de l'Homme dans l'ampleur du phénomène de l'invasion biologique

L'invasion biologique n'est ni un phénomène récent, ni exclusivement dû à l'Homme. Depuis l'émergence de la vie, les êtres vivants se déplacent dans de nouveaux environnements sous



Figure 1. La gravure de 1893 représentant l'arrivée de Christophe Colomb aux Amériques en 1492.

l'effet des processus naturels (changements climatiques, tectonique, courants atmosphériques, océaniques et fluviaux) qui ont joué un rôle important dans l'histoire de la répartition des espèces à la surface de la Terre. Par exemple, les courants atmosphériques, océaniques et fluviaux constituent des voies de dispersion des espèces des mangroves et des plantes à longue distance (Mack, 2003). La dispersion des plantes natives d'Australie vers la Nouvelle-Zélande est due aux courants océaniques pendant l'Époque Moderne (Mack, Lonsdale, 2001). Cependant, le nombre d'espèces qui se sont dispersées naturellement semble négligeable par rapport au nombre d'espèces pour lesquelles l'Homme a intervenu dans le processus de dispersion (Mack, Lonsdale, 2001).

Depuis la Préhistoire, l'Homme joue un rôle majeur de propagateur. Avec ses migrations il a permis à de nombreuses espèces d'étendre leur répartition au-delà des barrières géographiques naturelles telles que les océans et les montagnes qui limitent la dispersion à longue distance (Hulme, 2009; Nentwig, 2007). Certaines espèces l'ont accompagné dans ses migrations. C'est le cas du rat du Pacifique originaire d'Asie du Sud-Est et considéré comme un marqueur des migrations humaines dans le Pacifique, les migrants polynésiens l'ayant intentionnellement ou accidentellement introduit sur les îles qu'ils ont colonisées (Matisoo-Smith, Robins, 2004). Un autre exemple nous est fourni par la souris domestique, originaire du Moyen Orient et maintenant présente dans l'ensemble de l'Eurasie (Auffray *et al.*, 1990).

Toutefois, le début de l'accélération de l'invasion biologique (ou la première phase de l'accélération de l'invasion biologique) remonte aux 500 dernières années. Cette période est associée à la fin du Moyen Âge, à la découverte des Amériques par les Européens (Figure 1), à la naissance du colonialisme, à l'exploration planétaire et aux changements radicaux dans les patrons de la démographie humaine, de l'agriculture, du commerce et de l'industrie (Hulme, 2009; McNeely, 2006). Pendant cette période, les déplacements d'espèces sont réciproques entre l'Europe et les nouveaux territoires, mais aussi entre les territoires récemment découverts. De nombreuses espèces animales et végétales sont rapportées en Europe pour y être acclimatées et cultivées (la pomme de terre, la tomate, le maïs, le haricot, le poivron, etc.). Réciproquement, les colons introduisent dans les nouveaux territoires des animaux (lapins, chèvres, moutons, cochons et bovins), particulièrement dans les îles, pour assurer leur subsistance en cas de naufrage (Pascal *et al.*, 2009). En outre, les colons Européens ont cherché à recréer les paysages familiers dans les lointaines contrées, en emportant avec eux des espèces telles que le blé, l'orge, le seigle, de nombreuses plantes ornementales et des animaux de compagnie (Binggeli, 2001; McNeely, 2006). Cependant, les données sur l'introduction des espèces en Europe mettent en évidence que les introductions se sont

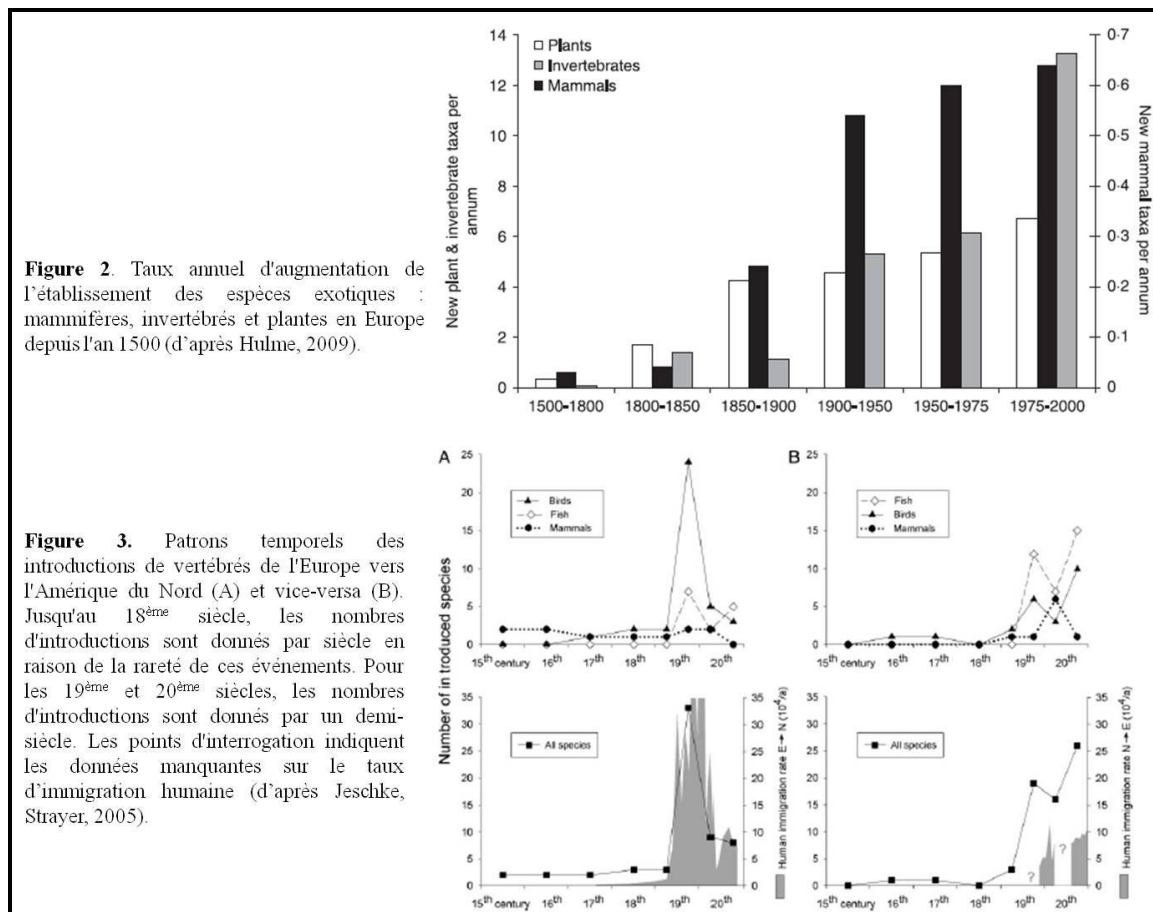


Figure 4. Trajectoires de tous les navires de charge (plus de 10 000 tonneaux de jauge) en 2007. L'échelle de couleur indique le nombre de voyages le long de chaque itinéraire (d'après Kaluza *et al.*, 2010).

progressivement accélérées dans les 200 dernières années (Figure 2) (Hulme, 2009; Jeschke, Strayer, 2005).

Des tendances similaires ont été observées pour l'Amérique du nord (Jeschke, Strayer, 2005; Langor *et al.*, 2009; Mack *et al.*, 2000). Cette nouvelle phase d'accélération des invasions biologiques correspond à la révolution industrielle, une période marquée par le développement du commerce international à travers presque tous les continents et facilitée par le développement des moyens de transport : navires à vapeur, construction des canaux, grandes routes et chemins de fer (Hulme, 2009). Ces échanges ont contribué également à la dispersion des espèces européennes en accompagnant, volontairement ou accidentellement, les voyageurs et les colons Européens durant la période 1820-1930 (Figure 3) (McNeely, 2006).

Les dernières décennies ont été marquées par une augmentation spectaculaire du déplacement des organismes vivants entre tous les continents, incluant toutes les catégories taxonomiques. Cet accroissement est directement lié au phénomène de la mondialisation (Hulme, 2009; Mack *et al.*, 2000; McNeely, 2006; Meyerson, Mooney, 2007; Perrings *et al.*, 2005). Le développement de la vitesse et l'expansion continue des réseaux de transports aérien et maritime (Figure 4) à travers le monde ont accru le nombre de destinations que l'Homme et les marchandises peuvent atteindre et par conséquent le risque d'invasions biologiques (Kaluza *et al.*, 2010; Meyerson, Mooney, 2007; Tatem, 2009).

Le volume des échanges commerciaux et le développement économique sont également parmi les principaux facteurs influençant l'origine, la fréquence et l'ampleur de l'invasion biologique dans une région (Hulme, 2009; Leprieur *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2007; Weber, Li, 2008; Westphal *et al.*, 2008). La Chine, par exemple, a eu une croissance économique exceptionnelle au cours des 3 dernières décennies qui s'est accompagnée d'une augmentation du volume des échanges commerciaux mais également du nombre des bioinvasions (Lin *et al.*, 2007). De plus, au cours des 20 dernières années, une modification des routes du commerce mondial a eu lieu et le commerce avec l'Asie (en particulier la Chine) a augmenté de façon spectaculaire. Par exemple, la proportion d'espèces non indigènes introduites au Canada en provenance d'Asie a fortement augmenté. Elle atteint 19% des espèces contre 6,7% il y a 20 ans (Langor *et al.*, 2009). L'Asie est devenue également la principale source des arthropodes introduits en Europe (Figure 5) (Roques, 2010).

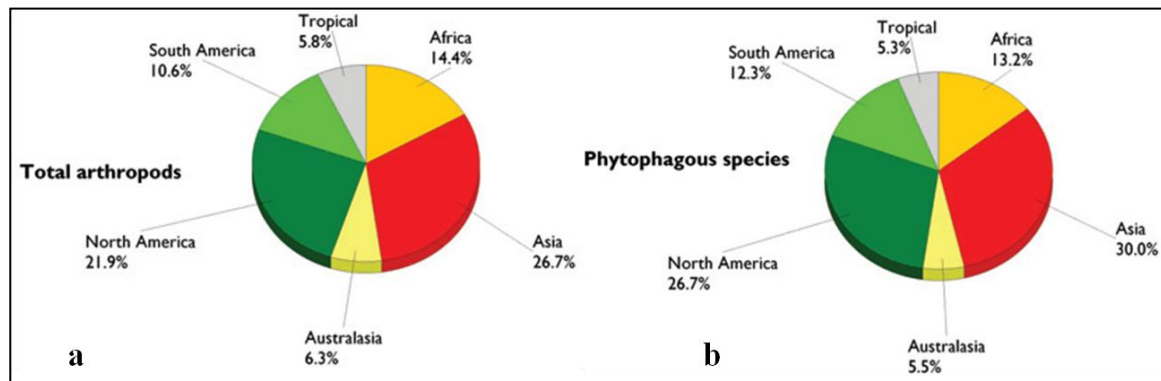


Figure 5. Régions d'origine des arthropodes exotiques en Europe : (a) total des arthropodes et (b) insectes (d'après Roques, 2010).

I.3 Impacts de l'invasion biologique

Les conséquences de l'invasion biologique sont diverses et interconnectées (Mack *et al.*, 2000) et le développement continu des activités humaines, y compris la destruction des habitats, accompagnée par le changement climatique (température, concentration de CO₂, etc.), constituent des facteurs favorisant l'invasion biologique (Vilà *et al.*, 2006). Il est très difficile d'estimer l'ampleur réelle de l'invasion biologique, puisque la plupart des écosystèmes sont touchés à un degré plus ou moins important par les espèces envahissantes. Ces dernières appartiennent à tous les groupes taxonomiques (IUCN, 2000) et les données exhaustives sur le nombre d'espèces introduites ne sont pas disponibles. Sur le plan international, bien que la prise de conscience s'accroisse sur le danger potentiel que représente l'introduction des espèces exotiques, il y a cependant de grandes disparités dans la façon dont les pays traitent cette question. Certains disposent de bases de données sur les espèces exotiques, alors que dans d'autres pays, ces informations sont presque inexistantes (Shirley, Kark, 2006). Lorsque les données sont pauvres ou manquantes, faire des estimations globales sur les impacts des espèces invasives devient très difficile voire impossible.

I.3.1 Impact écologique

L'invasion biologique est considérée comme la deuxième cause de l'érosion de la biodiversité après la destruction des habitats. Elle constitue également une composante importante du changement global provoqué par l'activité humaine (Allendorf, Lundquist, 2003; Hulme, 2009; Mooney, Cleland, 2001; Perrings *et al.*, 2005; Sakai *et al.*, 2001; Shirley, Kark, 2006).

Les espèces introduites peuvent avoir des impacts sur la biodiversité. Elles peuvent interagir de différentes façons avec les espèces indigènes : via les effets trophiques (pâturage, prédation, parasitisme) et / ou la concurrence pour les ressources, par l'hybridation et la propagation d'agents pathogènes (Hulme, 2007). Par conséquent, les espèces invasives peuvent modifier les propriétés fondamentales écologiques des écosystèmes, telles que les espèces dominantes dans une communauté et les caractéristiques physiques d'un écosystème, le cycle des éléments nutritifs et la productivité des plantes (Mack *et al.*, 2000).

L'hybridation entre les espèces exotiques et indigènes est une menace potentiellement grave pour la biodiversité. Elle peut conduire à l'extinction des espèces indigènes comme par

exemple l'introduction du canard colvert *Anas platyrhynchos* dans les îles Hawaï et en Nouvelle-Zélande qui a menacé l'existence des canards indigènes suite à l'hybridation avec eux (Simberloff, 1996). Dans d'autres cas, des conséquences peuvent être encore plus graves et l'hybridation entre une espèce allochtone et une autre native peut produire une nouvelle espèce plus envahissante (Baumel *et al.*, 2001). Par exemple, la spartine nord-américaine *Spartina alternifolia*, introduite en Angleterre s'est hybridée avec une espèce indigène *S. maritima* donnant naissance à une nouvelle espèce *S. x townsendii* qui s'est avérée stérile. Cet hybride a subi des modifications génétiques et est devenu amphidiploïde, produisant ainsi une nouvelle espèce fertile *S. anglica* qui est devenue très envahissante (Baumel *et al.*, 2001). L'hybridation peut menacer une espèce indigène, même si les hybrides ne sont pas fertiles car le croisement réduit le nombre de descendants ajoutés à la population de l'espèce indigène. Par exemple, les femelles du vison d'Europe *Mustela lutreola*, déjà gravement menacées par une dégradation de l'habitat, s'hybrident avec des mâles originaires d'Amérique du Nord. Les embryons avortent systématiquement, ce qui aggrave le déclin des espèces indigènes par réduction du taux de croissance de la population autochtone (Hulme, 2007).

Parmi les exemples ayant eu un impact remarquable sur la biodiversité, un des plus connus est celui de l'introduction de la perche du Nil *Lates niloticus* dans le lac Victoria en Afrique en 1959 qui a engendré l'extinction de plus de 200 espèces endémiques de poissons par la prédation et la concurrence pour la nourriture (Lowe *et al.*, 2007). Aux Etats-Unis les espèces invasives sont considérées comme un facteur prépondérant du déclin des espèces natives dans au moins 49% des cas enregistrés actuellement sur la liste des espèces mises en danger ou menacées (Pimentel *et al.*, 2005). Finalement, parmi les exemples de transmission de pathogènes, citons la transmission du virus parapox à l'écureuil roux européen *Sciurus vulgaris* par l'écureuil gris *Sciurus carolinensis* introduit (Hulme, 2007).

I.3.2 Impact économique

L'invasion biologique constitue également un problème économique (Perrings *et al.*, 2000), car les menaces que les espèces invasives représentent pour les écosystèmes se traduisent presque toujours directement par des conséquences économiques (Mack *et al.*, 2000). Les espèces invasives peuvent causer trois catégories d'impacts économiques : 1) un impact direct qui se traduit par une perte directe de la production agricole (végétale et animale) et de la pêche ; 2) la lutte contre les espèces invasives a un coût, celui de l'éradication et du contrôle

mais également toutes les formes de mise en quarantaine ; 3) le coût de la lutte contre les espèces invasives qui menacent la santé humaine, soit comme des agents directs de maladies ou en tant que vecteurs ou porteurs des pathogènes causant des maladies. Quelques exemples : aux Etats-Unis, dans la région des Grands Lacs, la moule zébrée a causé cinq milliards de dollars de dégâts aux centrales hydroélectriques et canalisations (Simberloff, 1996), les onze espèces invasives majeures en Chine ont coûté environ 6,9 milliards de dollars en 2002 à l'économie Chinoise (Lin *et al.*, 2007). Dans le cas des arthropodes envahissants, les dommages annuels causés par les insectes et les acariens exotiques, aux États-Unis, ont été estimés au moins à 16 milliards de dollars (Pimentel *et al.*, 2005).

I.3.3 Impact sanitaire et social

Les espèces invasives ont aussi parfois des conséquences très importantes en termes de santé humaine. La propagation des maladies s'est avérée un élément essentiel dans l'élaboration de l'histoire du monde, comme les guerres et les migrations qui ont favorisé l'introduction de nouvelles maladies dans des populations sensibles (Tatem *et al.*, 2006). Jusqu'à la Seconde Guerre mondiale, le nombre de victimes mortes à cause des maladies introduites avec les colonisateurs est beaucoup plus important que celui dû à la guerre elle-même. Citons parmi les exemples les plus frappants : la peste, le choléra. Plus de 200 millions de personnes sont considérées comme ayant été tuées par la peste bubonique en trois grandes pandémies entre les XIV^e et XVII^e siècles.

Les espèces envahissantes peuvent causer des dommages indirects sur les populations humaines et menacer la sécurité alimentaire par d'importantes pertes de rendements agricoles. En Irlande, par exemple, le mildiou de la pomme de terre provoqué par l'oomycète *Phytophthora infestans* introduit en 1845, est en partie responsable de la famine qui débuta en 1846 et entraîna la mort d'un million de personnes et l'émigration d'environ cinq millions de personnes vers les Etats-Unis (Anderson *et al.*, 2004).

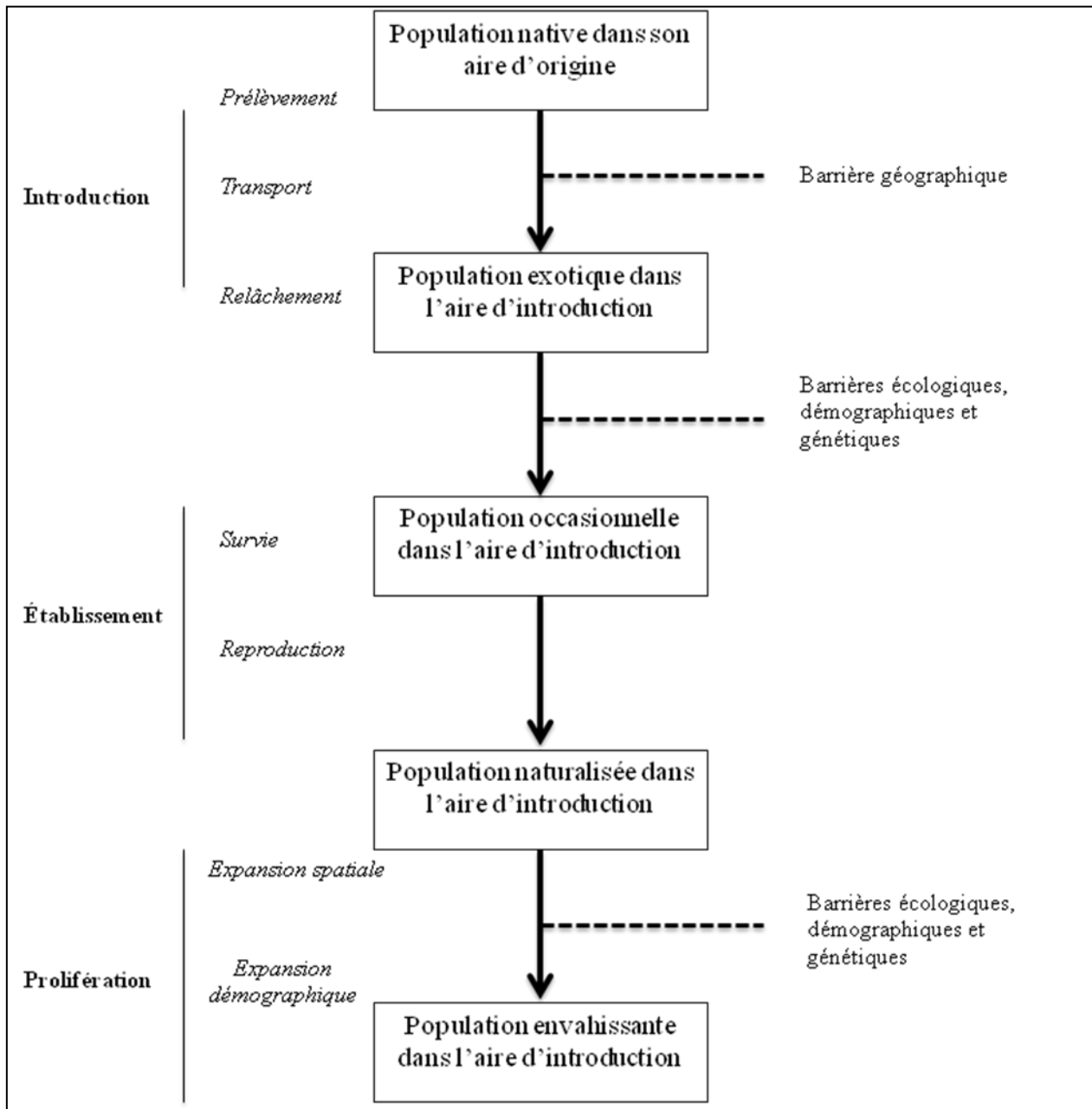


Figure 6. Schéma des différentes étapes d'une invasion biologique (modifié d'après Sakai *et al.*, 2001).

I.4 L'invasion biologique : processus écologique et évolutif

I.4.1 Les principales étapes de l'invasion biologique

Le processus de l'invasion biologique passe par trois étapes principales: (a) **l'introduction** d'une espèce dans un nouvel environnement, (b) la colonisation initiale et le succès de **l'établissement** de l'espèce introduite, et (c) **la prolifération** dans de nouveaux habitats. Le succès de l'invasion nécessite le franchissement d'une ou de plusieurs barrière(s) naturelle(s) à chaque étape (Figure 6) (Kolar, Lodge, 2001; Richardson *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2001).

I.4.1.1 L'introduction

L'étape de l'introduction correspond à l'arrivée d'une nouvelle espèce dans un nouvel habitat, situé hors de son aire de répartition naturelle après avoir franchi plusieurs barrières (la barrière géographique, la survie pendant le voyage et la barrière environnementale lors de l'arrivée dans la nouvelle aire).

L'homme joue souvent un rôle fondamental, accidentel ou voulu, dans cette étape. Il aide l'espèce exotique à franchir la barrière géographique qui est supérieure à sa capacité intrinsèque de dispersion. La survie pendant le voyage, si ce dernier est lointain, constitue la deuxième barrière à franchir. La plupart des plantes vasculaires et des vertébrés exotiques ont été intentionnellement introduits par l'homme pour différentes raisons : l'ornement, la culture, l'élevage, la chasse, l'aquaculture ou la pêche (Cassey *et al.*, 2004a; Hulme, 2007; Hulme, 2009; Perrings *et al.*, 2005). En revanche, la majorité des introductions d'invertébrés (y compris les organismes marins) et de microbes ont été accidentelles, fréquemment attachés à d'autres espèces délibérément introduites (Rabitsch, 2010) (Tableau 1). Par exemple, le commerce des plantes, surtout les plantes ornementales, contribue majoritairement ($\approx 90\%$) à l'introduction des nouveaux ravageurs en Europe provenant principalement d'Asie et d'Amérique du Nord (Richard *et al.*, 2007).

Les caractéristiques de l'espèce involontairement introduite jouent un rôle très important. Par exemple, l'introduction d'espèces possédant des formes résistantes dans leur cycle de vie telles que les graines des plantes, les parasites associés aux plantes ou aux animaux introduits volontairement, ou des espèces marines transportées dans les ballasts des

Tableau 1. Voies d'introduction des arthropodes terrestres exotiques en Europe (d'après Rabbitsh, 2010).

Pathway	Number of species (%)
Intentional	218 (14%)
Released	175 (11%)
Unintentional	1341 (86%)
Animal husbandry	42 (2.6%)
Greenhouse escapees	204 (13%)
Crops	70 (4.3%)
Forestry	90 (5.6%)
Horticultural/Ornamental	468 (29%)
Leisure	13 (0.8%)
Stored products	201 (12%)
Stowaways	95 (5.9%)
Unknown	431 (27%)

bateaux et adaptées à la recherche de nourriture dans l'obscurité sera favorisée, en particulier avec le développement des transports modernes qui ont réduit la durée de voyage (Anderson *et al.*, 2004; Roques *et al.*, 2009; Tatem *et al.*, 2006). Cependant, pour que l'espèce soit transportée et introduite accidentellement, elle doit d'abord être prélevée dans son aire d'origine. Les espèces qui ont une aire de répartition étendue, celles qui se trouvent dans des régions biogéographiques similaires avec un volume d'échanges commerciaux important ou celles qui sont déjà envahissantes dans certaines régions du globe ont plus de chance d'être transportées vers de nouvelles destinations (Hayes, Barry, 2008; Perrings *et al.*, 2005).

La phase d'introduction est souvent associée à un effet de fondation engendrant une réduction de la variabilité génétique de la population introduite par rapport à la population source, due au faible effectif d'individus introduits. La dérive génétique et l'effet de fondation sont susceptibles de réduire la variabilité génétique de la population introduite et constituent des contraintes à la sélection qui pourrait contribuer au succès de l'invasion.

I.4.1.2 L'établissement

Cette deuxième étape du processus d'invasion se déroule en deux phases : 1) la colonisation initiale et 2) l'établissement des populations viables.

I.4.1.2.1 La colonisation initiale

Cette phase correspond à la survie des individus arrivés dans les nouvelles conditions environnementales. Le mode de reproduction de l'espèce introduite et sa plasticité phénotypique jouent un rôle important dans cette étape (Sakai *et al.*, 2001). Les espèces dont des individus isolés peuvent s'autoféconder sont généralement considérées comme de bons colonisateurs (Baker, 1965). Cette autofécondation est particulièrement fréquente chez les plantes envahissantes. Dans différents groupes taxonomiques (arthropodes et vertébrés), il existe des espèces où quelques femelles fécondées ou qui peuvent stocker des spermatozoïdes peuvent démarrer une population (Roques *et al.*, 2009; Whittier, Limpus, 1996).

I.4.1.2.2 La naturalisation

Elle correspond à l'établissement des populations viables et capables de se reproduire normalement dans le nouvel environnement. Cette phase est critique car seule une petite proportion des espèces introduites arrive à la franchir (Williamson, Fitter, 1996) puisque les populations fondatrices sont souvent soumises aux conditions abiotiques (température, humidité, lumière, etc.) ou biotiques (compétiteurs, prédateurs et parasites) du nouvel environnement auxquelles elles ne sont pas adaptées. Ainsi, des espèces d'origine tropicale auront des difficultés à s'établir dans un environnement tempéré et vice-versa.

Cependant, le développement des activités humaines, y compris la destruction des écosystèmes naturels, et les changements climatiques ont contribué à homogénéiser la biosphère (McKinney, Lockwood, 1999; McNeely, 2006; Tatem, Hay, 2007) et à faciliter l'établissement des espèces dans des régions différentes de leur région d'origine (Golani *et al.*, 2007). Citons ici, un grand nombre de ravageurs agricoles d'origine tropicale tels que *Bemisia tabaci*, le charançon du palmier *Rhynchophorus ferrugineus*, le papillon du palmier *Paysandisia archon* qui ont réussi à coloniser le bassin méditerranéen et à s'y établir. En outre, même si une similarité des conditions climatiques entre l'aire d'origine et l'aire d'introduction existe, les espèces introduites sont confrontées à de nouvelles pressions biotiques (compétiteurs, prédateurs et parasites) très différentes. La compétition et la prédation par des espèces indigènes auxquelles l'espèce introduite n'a jamais été confrontée, vont fortement limiter ses capacités d'établissement (Maron, Vilà, 2001).

De plus, des processus démographiques (stochasticité démographique et environnementale et effets Allee) et génétiques (dérive génétique et dépression de consanguinité : diminution de la valeur sélective d'individus) fragilisent l'établissement des populations viables. Du fait que les propagules introduites soient généralement de taille réduite, l'établissement des populations viables sera dépendant de la stochasticité démographique (i.e. fluctuations aléatoires de la taille de la population résultant de variations individuelles et aléatoires de la survie, de la fécondité et du sex ratio), de la stochasticité environnementale (fluctuations temporelles des conditions environnementales abiotiques et biotiques) (Lande *et al.*, 2003) et de l'effet Allee (i.e. la corrélation positive entre la densité et le taux d'accroissement) (Taylor, Hastings, 2005). En outre, la variabilité génétique réduite due à l'effet de fondation, la dérive génétique, et éventuellement la reproduction entre individus consanguins accrus à faible densité peuvent fortement limiter l'établissement des petites propagules. Cette reproduction entre des individus apparentés conduit à la dépression

de consanguinité qui entraîne une diminution de la valeur sélective. Cependant, lorsque la population introduite atteint un équilibre, des changements évolutifs peuvent intervenir et contribuer à l'adaptation de cette population aux nouvelles conditions environnementales. Ainsi, la pression de sélection exercée par le nouvel environnement et la dérive génétique peuvent causer une évolution rapide chez les populations introduites (Dlugosch, Parker, 2008a; Lee, 2002; Sakai *et al.*, 2001; Tsutsui *et al.*, 2000).

L'hybridation avec les espèces indigènes (Ayres *et al.*, 2008; Ellstrand, Schierenbeck, 2000) ou entre des espèces allochtones (Suehs *et al.*, 2004; Blair, Hufbauer, 2010), ou entre des génotypes introduits génétiquement éloignés et jusque là isolés dans l'aire native (Facon *et al.*, 2005; Facon *et al.*, 2010; Kolbe *et al.*, 2004; Pfenninger *et al.*, 2002), conduisent à créer de nouveaux génotypes plus envahissants. De plus, la plasticité phénotypique est considérée comme un mécanisme essentiel dans l'établissement d'une population introduite (Hulme, 2008; Lee, 2002; Matesanz *et al.*, 2010; Reid, Orlova, 2002; Sakai *et al.*, 2001). Le temps de latence entre l'introduction et la dispersion peut être expliqué par ces changements évolutifs (Mack *et al.*, 2000; Mooney, Cleland, 2001; Sakai *et al.*, 2001).

La pression de propagule joue un rôle très important dans l'établissement d'une espèce introduite (Colautti *et al.*, 2006; Drake *et al.*, 2005; Lockwood *et al.*, 2005; Simberloff, 2009). L'introduction d'une propagule très importante favorise l'établissement (Alroth *et al.*, 2003; Berggren, 2001; Hayes, Barry, 2008) en réduisant l'effet de la stochasticité démographique, et l'introduction de propagules de différentes sources réduit les impacts de la stochasticité environnementale (Alroth *et al.*, 2003; Hayes, Barry, 2008; Simberloff, 2009).

I.4.1.3 Prolifération

Cette dernière étape du processus d'invasion correspond à l'explosion démographique et à l'expansion spatiale de la population naturalisée (établie) dans son nouvel environnement. L'expansion, menant à l'invasion, implique que la population s'établisse dans de nouvelles régions. La vitesse de l'expansion géographique d'une espèce sera fonction de sa capacité de dispersion. Les mécanismes démographiques et génétiques, et les changements évolutifs décrits dans les deux étapes précédentes interviendront pendant l'expansion dans de nouveaux habitats : la plasticité et l'adaptation locale favorisant aussi l'expansion géographique des populations introduites. Ainsi, les facteurs qui influencent la pression de propagules, le mode

de dispersion et la fitness seront des facteurs essentiels dans la propagation des espèces envahissantes (Sakai *et al.*, 2001).

I.4.2 Compréhension de l'invasion biologique

Nous avons présenté dans la section précédente les étapes de l'invasion biologique et les mécanismes démographiques et évolutifs associés qui facilitent ou limitent le processus de l'invasion à chaque étape. Dans cette section, nous aborderons l'invasion biologique par d'autres types d'approches couramment utilisées pour comprendre et prédire ce phénomène biologique. Ces approches se concentrent soit 1) sur les caractéristiques des espèces envahissantes, soit 2) sur celles des écosystèmes envahis. Une approche alternative récente fondée sur l'étude de l'interaction entre l'espèce envahissante et l'écosystème envahi (modèle « clef-serrure ») a été proposée (Facon *et al.*, 2006; Heger, Trepl, 2003) pour comprendre l'invasion biologique et sera discutée ici.

I.4.2.1 Caractéristiques des espèces invasives

Les conséquences négatives aussi bien écologiques qu'économiques de l'invasion biologique, ont tout d'abord motivé les chercheurs à étudier les caractéristiques biologiques dont prédisposent les espèces envahissantes pour prédire leurs potentiels invasifs. De nombreuses tentatives ont été faites pour établir des listes de traits communs et partagés par les espèces envahissantes (Goodwin *et al.*, 1999; Kolar, Lodge, 2001; Noble, 1989). Mais établir une liste exhaustive des caractéristiques spécifiques des espèces envahissantes est difficile. On ne dispose pas de données relatives aux implantations infructueuses qui permettent d'identifier les caractéristiques facilitant le franchissement d'une espèce envahissante à une étape donnée de l'invasion (cf. Figure 6) et ni celles limitant ce franchissement de la même étape pour une espèce non envahissante (Levine, 2008). De plus, les différentes étapes de l'invasion biologique ont été souvent confondues, rendant difficile l'identification de certaines caractéristiques nécessaires au succès de l'invasion (Kolar, Lodge, 2001).

De nombreuses caractéristiques biologiques telles que le mode de reproduction (autogamie, végétative et parthénogenèse), les stratégies r ou r/K (Facon *et al.*, 2006; Roques *et al.*, 2009; Sakai *et al.*, 2001) et la plasticité phénotypique incluant la tolérance physiologique (Lee, 2002; Valiente *et al.*, 2009), la plasticité comportementale et la plasticité alimentaire (Cassey, 2004b; Yeh, 2004) ou la polyphagie (Roques *et al.*, 2009) sont

considérées comme attributs favorisant l'invasion biologique et peuvent aider à identifier des envahisseurs potentiels (Facon *et al.*, 2006; Kolar, Lodge, 2001). La diversité génétique élevée chez les populations introduites est considérée comme nécessaire pour le succès de l'invasion biologique car elle constitue le matériel premier nécessaire à l'adaptation (Bossdorf *et al.*, 2005; Dlugosch, Parker, 2008a).

L'ensemble de ces caractéristiques semble utile pour définir le potentiel invasif d'une espèce (Facon *et al.*, 2006; Kolar, Lodge, 2001). Cependant, elles ne permettent pas de déterminer une stratégie générale permettant de prédire l'invasion biologique lorsqu'on l'applique à toutes les espèces ou à des groupes taxonomiques entiers tels que les insectes car les exceptions sont très nombreuses (Mack *et al.*, 2000; Williamson, 1996).

De même, Jeschke, Strayer (2005) ont suggéré qu'une caractéristique prédictive du succès de l'invasion biologique est également l'affiliation humaine. Les espèces qui sont associées aux activités humaines sont donc préférentiellement transportées (Leprieur *et al.*, 2008; Perrings *et al.*, 2005; Robinson, 2008). Différentes études ont mis en évidence le lien entre le succès de l'invasion biologique et les activités humaines telles que le commerce des plantes ornementales (Dehnen-Schmutz *et al.*, 2007a; Dehnen-Schmutz *et al.*, 2007b), celui des animaux de compagnie (Cassey *et al.*, 2004a; Krishnakumar *et al.*, 2009), des poissons d'ornement ou destinés à la consommation humaine (Semmens *et al.*, 2004), et l'agriculture : l'introduction des espèces utilisées pour le contrôle biologique (Roy, Wajnberg, 2008). La majorité des bioagresseurs des cultures ont été introduits involontairement en contaminant les végétaux : arthropodes, pathogènes ou adventices (Anderson *et al.*, 2004; Dalton, 2006; Langor *et al.*, 2009; Roques *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2007). La similarité climatique et biogéographique des aires d'origine et d'introduction contribue également au succès de l'invasion biologique (Duncan *et al.*, 2001; Tatem, Hay, 2007).

I.4.2.2 Caractéristiques des communautés envahies

Une autre approche aidant à comprendre les invasions biologiques consiste à examiner les caractéristiques des écosystèmes envahis et à se concentrer sur l'hypothèse classique d'Elton (1958) sur la résistance biotique qui suppose que les écosystèmes les plus diversifiés sont les plus compétitifs et les plus résistants à l'invasion biologique. Les recherches ont donc porté sur les caractéristiques biotiques (la richesse spécifique et fonctionnelle des écosystèmes, les relations interspécifiques) et abiotiques (le degré de perturbation et de dégradation des

écosystèmes et la pression de propagules dus aux activités humaines) a priori essentielles pour comprendre l'invasion biologique. Sur cette base, les milieux les plus divers sont les plus résistants aux invasions biologiques. Par exemple, les îles et les milieux insulaires sont plus vulnérables à l'invasion biologique que les continents. Cette vulnérabilité est due au fait que ces habitats possèdent un spectre de ressources similaire à celui du continent mais avec une faible diversité spécifique liée à leur petite taille et leur isolation géographique. Dans ces milieux une espèce introduite peut trouver plus facilement une niche vide à occuper comme l'explique « l'hypothèse de la niche vide » (Mack *et al.*, 2000). Cependant, les études empiriques n'ont pas toujours donné de résultats cohérents sur la résistance biotique (Levine, D'Antonio, 1999; Robinson, 2008). La contribution relative des facteurs intrinsèques et extrinsèques à la résistance biotique des écosystèmes varie à travers les échelles spatiales (Kennedy *et al.*, 2002; Naeem *et al.*, 2000; Robinson, 2008). La perturbation des écosystèmes, notamment liée aux activités humaines, favoriserait l'installation d'espèces exotiques. C'est notamment le cas dans les agroécosystèmes (Robinson, 2008).

I.4.2.3 Approche éco-évolutive

Les deux approches mentionnées ci-dessus portent sur les propriétés d'un seul protagoniste l'envahisseur, ou l'écosystème envahi et non sur les caractéristiques de leur relation. L'identification des caractéristiques des espèces qui peuvent favoriser l'introduction et l'établissement d'espèces exotiques ainsi que les caractéristiques qui peuvent rendre les écosystèmes plus vulnérables aux invasions peut aider à développer des stratégies de prévention. Néanmoins, ces deux précédentes approches n'ont pas abouti à des résultats cohérents. Toutefois, il semble y avoir des cas où le succès d'une invasion n'est pas dû aux caractéristiques générales de l'espèce envahissante, ni à celles des écosystèmes envahis. Le succès d'une invasion biologique implique des interactions complexes entre les espèces envahissantes et les caractéristiques abiotiques et biotiques du milieu récepteur (Heger, Trepl, 2003). Sur cette base, il convient de citer l'approche proposée par (Facon *et al.*, 2006; Heger, Trepl, 2003), appelée modèle « clef-serrure » : elle consiste à combiner les caractéristiques de l'espèce envahissante avec celles de son écosystème d'introduction. Cette approche met l'accent sur les changements écologiques et évolutifs de l'espèce envahissante et/ou de l'écosystème envahi qui ont permis l'expansion géographique, démographique et fonctionnelle de l'espèce envahissante (Facon *et al.*, 2006).

I.4.3 Paradoxes évolutifs

Cette interaction entre les caractéristiques des espèces envahissantes avec leurs écosystèmes et le modèle clef-serrure soulève clairement deux paradoxes évolutifs.

Le premier paradoxe : *comment des populations adaptées aux conditions environnementales de leur écosystème d'origine arrivent-elles à envahir un nouvel écosystème auquel elles n'ont pas été confrontées auparavant et ne sont pas ou peu adaptées, surpassant parfois en compétition les populations locales* (Sax, Brown, 2000) ?

Différentes explications peuvent être avancées. Dans certains cas, une grande similarité biogéographique existe entre l'environnement d'introduction et celui d'origine de l'espèce envahissante. L'espèce introduite dispose d'une préadaptation à son nouvel environnement et aucun changement évolutif n'est nécessaire (Facon *et al.*, 2006).

Egalement, déplacées hors de leur écosystème d'origine, certaines populations introduites seraient avantagées par un relâchement de la pression biotique qu'elles subissent dans l'aire native de la part des ennemis naturels et les compétiteurs (Colautti *et al.*, 2004; Keane, Crawley, 2002; Torchin *et al.*, 2003; Torchin, Mitchell, 2004).

Une autre catégorie d'arguments postule que des changements écologiques dans l'aire d'introduction, créés par l'anthropisation croissante des milieux, les changements climatiques et la fragmentation des habitats, perturbent fortement les milieux, privilégiant les espèces introduites au détriment des espèces locales (Grosholz, 2005; Whitney, Gabler, 2008).

Le deuxième paradoxe : *comment les populations introduites, présentant a priori une faible variabilité génétique (due à un fort effet de fondation et une forte dérive) et par conséquent une faible potentialité adaptive, réussissent-elles à s'adapter dans leur nouvel environnement* (Allendorf, Lundquist, 2003; Dlugosch, Parker, 2008a; Frankham, 2005; Roman, Darling, 2007) ? Il est reconnu que l'adaptation des populations introduites dans les nouveaux écosystèmes joue un rôle important dans le succès de l'invasion. La variabilité génétique constitue la matière première nécessaire pour cette évolution (Cox, 2004; Sakai *et al.*, 2001). Or, différentes études démontrent clairement une perte significative de diversité génétique associée aux populations introduites par rapport à celle des populations d'origine due à l'effet de fondation (Dlugosch, Parker, 2008a; Roman, Darling, 2007). Pourtant, cette perte ne constitue pas un obstacle à l'invasion biologique (Dlugosch, Parker, 2008b; Golani *et al.*, 2007; Lindholm *et al.*, 2005; Mergeay *et al.*, 2006; Puillandre *et al.*, 2008; Solignac *et al.*,

2005; Zayed *et al.*, 2007). Différentes études ont montré que les espèces envahissantes peuvent rapidement s'adapter aux nouveaux environnements dans lesquels elles se trouvent (Mooney, Cleland, 2001; Suarez, Tsutsui 2008; Whitney, Gabler, 2008). Une des hypothèses couramment émises pour expliquer le manque d'importance de la perte de variabilité génétique au cours de l'invasion est l'invasion biologique résultant de multiples introductions (Dlugosch, Parker, 2008a; Roman, Darling, 2007; Facon *et al.*, 2006). La colonisation de nouvelles régions par des individus issus de sources génétiquement divergentes offre l'opportunité d'augmenter la variation génétique. Cette variabilité peut être le résultat de multiples sources d'introduction (Chen *et al.*, 2006; Darling *et al.*, 2008; Durka *et al.*, 2005; Genton *et al.*, 2005; Kolbe *et al.*, 2004; Roman, 2006) ou bien d'une hybridation inter ou intraspécifique avec des espèces natives ou non natives (Blair, Hufbauer, 2010 ; Ellstrand, Schierenbeck, 2000, Facon *et al.*, 2005 ; Lombaert *et al.*, 2010).

Dans la suite de ce document, nous nous intéressons à l'étude d'une espèce invasive probablement originaire d'Amérique du Sud récemment introduite en Afrique, en Europe et en Asie. Il s'agit de l'acarien rouge de la tomate *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960.

Chapitre II

II Etude de l'espèce invasive *Tetranychus evansi* l'acarien rouge de la tomate

II.1 Position systématique de *Tetranychus evansi*

Tetranychus evansi Baker & Pritchard est un acarien prostigmaté (les stigmates respiratoires sont placés sur la partie antérieure du corps) qui appartient à la superfamille des Tetranychoïdeae et à la famille des Tetranychidae Donnadieu, 1875 (Tableau 2). Cette famille représente un groupe d'arthropodes terrestres important et cosmopolite. Elle comprend plus de 1250 espèces (Migeon, Dorkeld, 2006) réparties dans deux sous-familles, les Bryobiinae Berlese (1913) et les Tetranychinae Berlese (1913) à laquelle *T. evansi* appartient et dans 67 genres.

Tableau 2. Position taxonomique de l'espèce *Tetranychus evansi*.

Phylum	Arthropoda
Classe	Arachnida
Sous-classe	Acari
Ordre	Prostigmata
Super-famille	Tetranychoidea
Famille	Tetranychidae
Sous-famille	Tetranychinae
Tribu	Tetranychini
Genre	<i>Tetranychus</i>
Espèce	<i>evansi</i>

La distinction des genres de Tetranychidae est notamment basée sur la chétotaxie dorsale et ventrale du corps, la forme de l'ambulacre et de l'empodium et la disposition des soies doubles sur les pattes I et II. Différents caractères sont utilisés pour la distinction spécifique des tétranyques. La chétotaxie du corps et des pattes des femelles et la forme de l'édéage (organe génital) des mâles, sont les principaux caractères utilisés pour identifier les espèces du genre *Tetranychus* (Gutierrez, 1991). Dans la Figure 7, nous présentons une comparaison de ces deux derniers caractères entre *T. evansi* et d'autres espèces proches, également rouges, avec lesquelles une confusion d'identification pourrait avoir lieu dans les observations sur les solanacées sur le terrain.

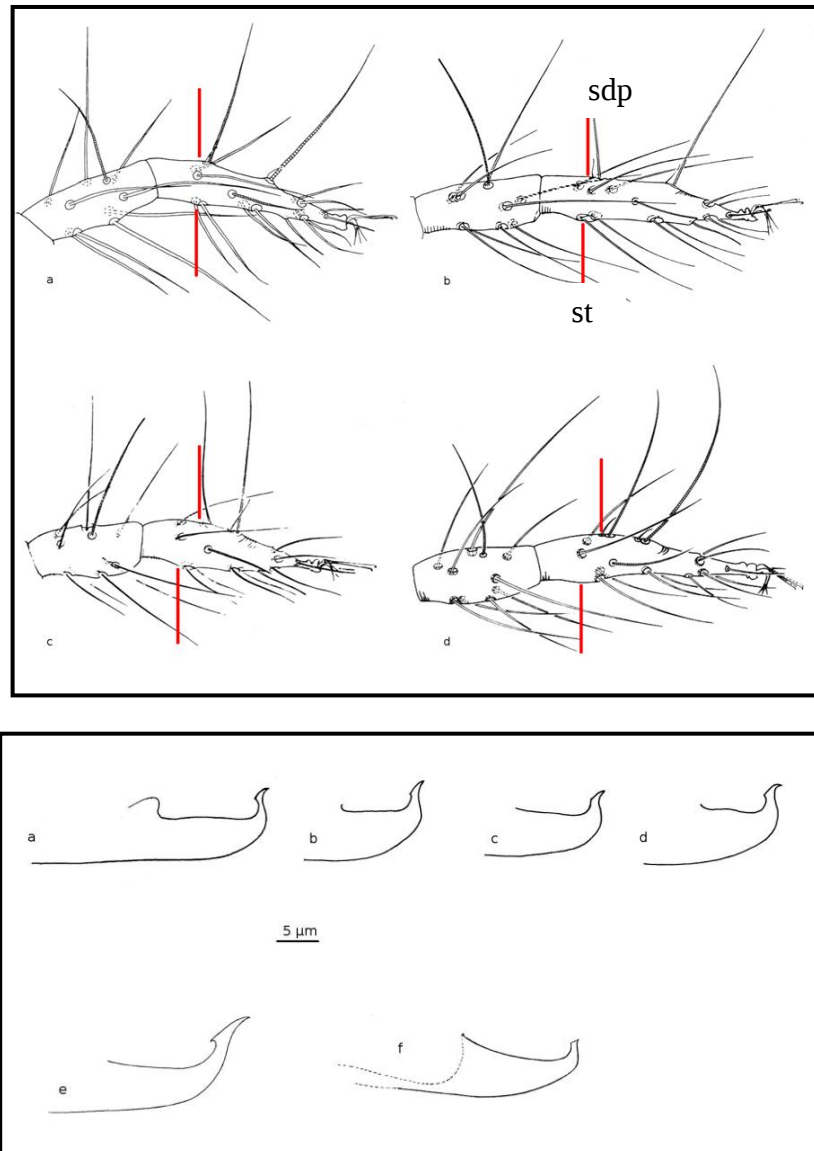


Figure 7. Différences morphologiques entre les femelles (en haut) et les mâles (en bas) de différentes espèces de *Tetranychus* rouges. Femelles : tarse I : variation des patrons de sétation sur le tarse I. a – *T. evansi* (Japon), b – *T. evansi* (île Maurice) c – *T. marianae*; d – *T. piercei*. Les soies tactiles (st) sont alignées avec la soie double proximale (sdp) pour a et b. Alors que pour c et d les soies tactiles sont distantes de la soie double proximale. (a – d’après Ehara, Ohashi, 2002; b – d’après Baker, Pritchard, 1960; c – d’après Pritchard, Baker 1955; d – d’après Gutierrez *et al.*, 1979). Mâles : édéages en vue latérale : a – d variation de la forme des édéages chez *T. evansi* : a – île Maurice, b – d (Japon), e – *T. marianae* et f – *T. piercei* (a – d’après Baker, Pritchard, 1960; b – d d’après Ehara, Ohashi, 2002; e – d’après Pritchard, Baker 1955; f – d’après Gutierrez *et al.*, 1979).

II.1.1 Notes sur la taxonomie

Tetranychus evansi fut décrit pour la première fois à partir de spécimens récoltés sur la tomate *Solanum lycopersicum* et la pomme de terre *Solanum tuberosum* à l'île Maurice en 1952. Cet acarien a été fréquemment confondu avec d'autres espèces de tétranyques, notamment avec *Tetranychus marianae* McGregor, 1950 nom sous lequel il a été signalé à plusieurs reprises dans différentes parties du monde avant d'être décrit : au nord est du Brésil en 1952 par Silva (1954), à l'île Maurice par Moutia (1958) et aux États-Unis au Texas (Schuster, 1959; Wene, 1956), où il causait d'importants dégâts sur les cultures. Cette espèce ne fut décrite qu'en 1960 par (Baker, Pritchard, 1960) à partir des spécimens collectés en 1952 sur la tomate et la pomme de terre de l'île Maurice et mal identifiés par Moutia (1958). Malgré la publication de sa description les signalements de *T. marianae* en Floride (Denmark, 1970; Wolfenbarger, Getzin, 1964) et en Californie par (Harper, 1966; Oatman *et al.*, 1967) et en Argentine (Rossi Simons, 1961) sont des erreurs d'identification puisqu'il s'agit de *T. evansi*. En 1987, De Moraes *et al* ont réexaminé la majorité des spécimens précédents cités sous le nom de *T. marianae* et établi une liste des caractères différenciant les 2 espèces (Tableau 3). Des erreurs d'identification de *T. evansi* ont également été fréquentes en Afrique australe où au cours des années quatre-vingt et quatre-vingt-dix, une recrudescence des attaques d'acariens rouges a été observée chez les petits producteurs de tomates. *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (la forme verte) et *T. cinnabarinus* Boisduval, 1867 (forme rouge) ou simplement *Tetranychus sp* avaient été signalés comme responsables. Pourtant, Knapp, Luchen (2000) ont indiqué que *T. evansi* était le responsable de ces ravages au Zimbabwe et en Zambie. Récemment, Ho et Wang (2007) ont indiqué que le signalement de *T. piercei* McGregor, 1950 à Taiwan était erroné et que *T. evansi* y serait présent depuis 1992.

Tableau 3. Les principaux caractères morphologiques différenciant *T. evansi* et *T. marianae*.

Caractères discriminants	<i>T. evansi</i>	<i>T. marianae</i>
Soie duplex proximale du tarse I de la femelle	alignée avec les soies tactiles proximales	distale aux soies tactiles proximales
Eperon empodial de la femelle	rudimentaire, présent au niveau de toutes les pattes	absent
Eperon dorsal de l'empodium I du mâle	réduit par rapport à l'éperon proxi-ventral	ressemble à une griffe

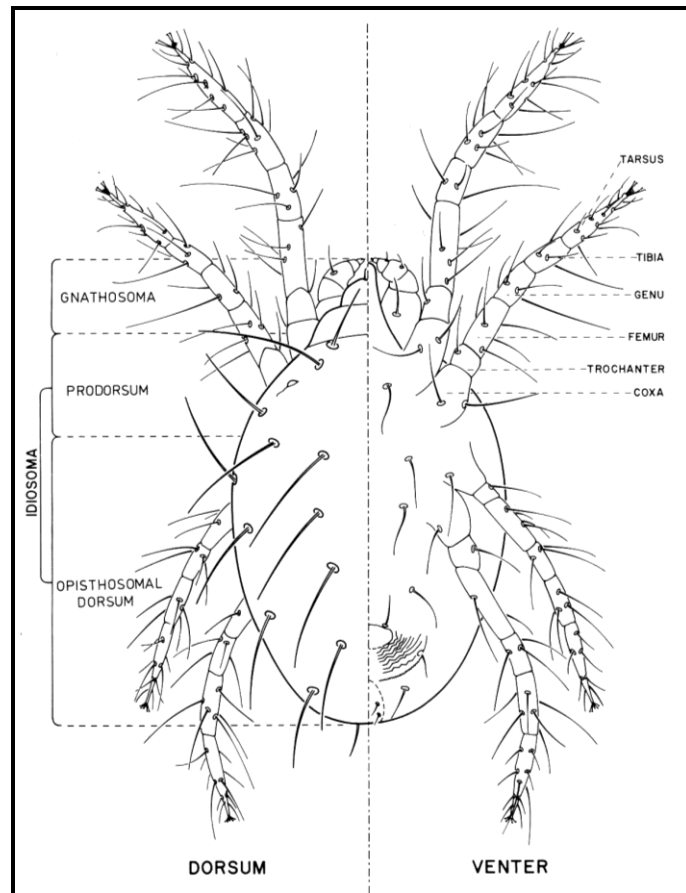


Figure 8. Aspect dorso-ventral d'une femelle de Tetranychidae (modifié d'après Gutierrez, 1985).



Figure 9. Mâle (♂), femelle (♀) et œuf (W) de *Tetranychus evansi* (Photo : Migeon A.).

II.1.2 Identification d'un cas récent de synonymie

Tetranychus takafujii a été récemment décrit du Japon par (Ehara, Ohashi, 2002). Les caractères morphologiques de l'espèce et le spectre de plante-hôte utilisés pour cette description nous suggéraient la possible synonymie avec *T. evansi*. Pour tester cette hypothèse, nous avons mené une étude en combinant trois approches complémentaires moléculaire, morphologique et biologique. La synonymie entre ces deux espèces, basée sur ces données a pu être établie. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article qui se trouve à la fin du chapitre.

II.2 Généralités sur les tétranyques

La sous-famille des Tetranychinae à laquelle *T. evansi* appartient présente des similarités et des différences morphologiques, biologiques et écologiques qu'il convient de présenter afin de mieux appréhender ce ravageur.

II.2.1 Morphologie

Les tétranyques sont des arthropodes de petite taille (environ 0,4 mm), de couleur variable, blanc ou jaune verdâtre à rouge foncé. Leur corps n'est pas segmenté mais on peut néanmoins reconnaître deux parties principales : 1) le gnathosoma qui porte les palpes et les pièces buccales et 2) l'idiosoma qui porte les quatre paires de pattes. Les pièces buccales sont constituées par les chélicères modifiées en stylets et les pédipalpes. Le segment basal des chélicères est fusionné pour former le stylophore où s'insèrent les stylets chélicéraux. L'idiosoma peut lui-même être subdivisé en deux parties : le propodosoma qui porte les deux premières paires de pattes et l'opisthosoma qui porte les deux autres paires de pattes (Figure 8) (Gutierrez, 1985). Le dimorphisme sexuel est marqué, les mâles sont plus petits que les femelles et leur corps est plus allongé (Figure 9).

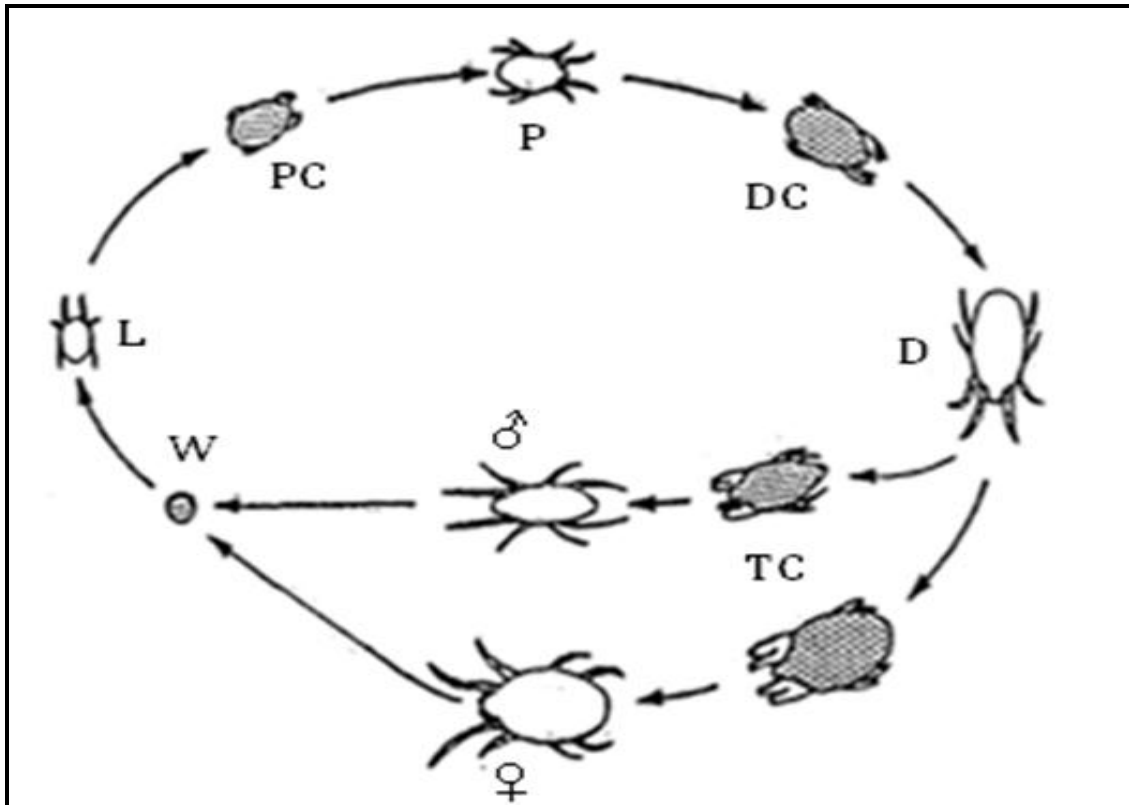


Figure 10. Les stades de développement des Tetranychidae (modifié d'après Gutierrez, 1991). W : œuf ; L : larve ; P : Protonympe ; D : Deutonympe ; F : femelle adulte et M : mâle adulte. PC, DC et TC sont les stades de mues immobiles et inactifs et sont respectivement protochrysalide, deutochrysalide et téléochochrysalide.

II.2.2 Cycle de développement

Le cycle de vie chez les Tetranychidae comporte entre l'œuf et l'adulte 3 stades immatures mobiles alternant avec 3 stades immobiles. L'œuf donne naissance à une larve hexapode, qui se nourrit activement puis entre dans le premier stade de mue la protochrysalide. Le deuxième stade actif est la protonymphe déjà octopode, puis c'est une deuxième phase de mue la deutochrysalide, suivie du dernier stade larvaire ou deutonymphe, qui se distingue de la protonymphe par la taille. A partir du stade deutonymphe, la différence entre les individus mâles et femelles commence à s'établir. C'est enfin le troisième stade de mue la téléiochrysalide auquel fait suite l'adulte (Gutierrez, 1991) (Figure 10).

II.2.3 Mode de reproduction et ses conséquences

Les acariens du genre *Tetranychus* se reproduisent par parthénogenèse arrhénotoque (Helle *et al.*, 1981) : les mâles sont haploïdes issus d'œufs non fécondés et les femelles sont diploïdes issues d'œufs fécondés. L'accouplement a lieu dès l'émergence des femelles. La reproduction arrhénotoque présente certains avantages évolutifs et adaptatifs. Lorsque les populations sont soumises aux agressions extérieures telles que des conditions climatiques défavorables, des compétiteurs ou des prédateurs, ce système de reproduction assure une meilleure survie et une plus grande diffusion des populations, puisqu'une seule femelle suffit pour démarrer une nouvelle population (Gutierrez, 1991).

Griffing (1982) a montré que les mâles haploïdes assurent un taux d'évolution plus élevé que les mâles diploïdes, ce qui est avantageux pour les espèces colonisatrices (Wrensch, 1993). Les conséquences de la reproduction par parthénogenèse arrhénotoque sur le potentiel évolutif des espèces d'acariens phytophages ont été notamment étudiées par (Croft, Van De Baan, 1988). Du fait de l'haploïdie, la sélection s'exerce sur les mâles hémizygotes à chaque génération, ce qui contribue à une accélération de l'adaptation aux conditions environnementales défavorables, puisque même les caractères récessifs, dans la mesure où ils ne sont contrôlés que par un seul gène, sont mis en évidence immédiatement chez la moitié des individus. De plus, on estime que la vitesse de fixation des mutations favorables est accrue d'un tiers par rapport aux espèces diploïdes (Crozier, 1985; Cornuet *et al.*, 2006). Le développement rapide de la résistance vis-à-vis des pesticides chez les arthropodes



Figure 11. Formation des amas d'acariens (flèches bleues) observés dans des colonies de *Tetranychus evansi* sur tomate sous serre à Nice (France 2007) (Photo : Migeon A.).

haplodiploïdes, est dû en partie à ce mode de reproduction (Croft, Van De Baan, 1988; Crozier, 1985; Denholm *et al.*, 1998; Havron *et al.*, 1987). Les recombinaisons génétiques pouvant se produire lors de la formation des femelles diploïdes, les femelles maintiennent les avantages de la reproduction sexuée dans la parthénogenèse arrhénotoque. La mobilité limitée des tétranyques favorise les conditions de consanguinité : une grande majorité d'accouplements a lieu entre frères et sœurs. Cela entraîne à la fois une réduction de la variabilité génétique à l'intérieur d'une population et une forte différenciation entre les populations à l'intérieur d'une même espèce issues de différentes localités ou plantes hôtes (Carbonnelle *et al.*, 2007; Tsagkarakou *et al.*, 1997). Ceci peut favoriser l'apparition d'incompatibilités entre populations d'une même espèce. Ce phénomène a été bien documenté chez *T. urticae* (De Barro, 1985; Perrot-Minnot *et al.*, 2004), *T. neocaledonicus* André, 1933 (Gutierrez, Van Zon, 1973) et *Panonychus citri* McGregor, 1916 (Osakabe, Komazaki, 1997). Toutefois l'effet de la dépression de consanguinité, chez les tétranyques (haplodiploïdes), est réduit puisque les mutations délétères sont immédiatement éliminées (Helle, 1965).

II.2.4 Sex ratio

Le sex-ratio (i. e. la proportion d'individus mâles et femelles par génération) est un trait d'histoire de vie contrôlé génétiquement (Helle, Pijnacker, 1985; Takafuji, Ishii, 1989). Il peut varier en fonction des facteurs biotiques (la plante-hôte et la présence de prédateurs et compétiteurs, etc.) et abiotiques (la température, l'humidité, la photopériode, etc.) (Wrensch, 1993). Ce caractère dépend également de la quantité de sperme transféré aux femelles pendant l'accouplement et de l'âge de la femelle (Helle, Pijnacker, 1985; Takafuji, Ishii, 1989). Chez *T. evansi* et l'ensemble des tétranyques, le sex-ratio est biaisé en faveur des femelles. Il est en moyenne de un mâle pour trois femelles (Helle, Pijnacker, 1985).

II.2.5 Dispersion

Les acariens sont des organismes de petite taille et aptères. Leur capacité de dispersion à longue distance est limitée mais pas inexistante. Leur dispersion à longue distance est principalement assurée passivement par le vent. Néanmoins, la phorésie joue un rôle non



Figure 12. Forte attaque de *Tetranychus evansi* sur tomates (plante et fruits) (Photo : Migeon A.).



Figure 13. Colonies de *Tetranychus evansi* dont le tissage regroupe les organes foliaires d'un plant de tomate (les deux premières photos à gauche) et d'aubergine (à droite) (Photo : Migeon A.).

négligeable dans les zones cultivées car les tétranyques peuvent également être disséminés par l'homme en s'accrochant aux vêtements des ouvriers agricoles et à leurs outils de travail. Certaines espèces de tétranyques, en particulier les espèces du genre *Tetranychus*, ont la capacité de tisser des toiles abondantes. Outre leur rôle de protection contre des agressions structuration de l'habitat, les toiles peuvent également être utilisées pour la dispersion collective chez les tétranyques tisserands par le phénomène de ballooning « formation d'un ballon ». Ces ballons se forment dans les conditions de surpopulation, où des individus se mettent à tisser une toile commune portant une grande quantité d'acariens. Cette toile qui se retrouve attachée à la plante en suspension dans l'air (Figure 11) sera reprise par le vent et transportée vers des nouvelles plantes (Gutierrez, 1991). Pour assurer la dispersion de l'espèce, les femelles en phase de pré-oviposition sont généralement les plus concernées par la dispersion aérienne (Kennedy, Smitley, 1985).

La dispersion ambulatoire, quant à elle, est impliquée dans la dispersion à l'intérieur d'une même plante ou entre des plantes contiguës ou proches, un acarien pouvant parcourir en fonction du type de support de 5 cm à 6 m en une heure (Kennedy, Smitley, 1985). La dissémination des acariens à l'échelle mondiale est principalement assurée par l'homme via les échanges commerciaux des produits végétaux (Gutierrez, 1983).

II.2.6 Symptômes et dégâts

Tous les stades mobiles se nourrissent en piquant les feuilles avec leurs stylets en suçant le contenu des cellules (Gutierrez, 1991). Les premières attaques passent souvent inaperçues et elles se manifestent ultérieurement par l'apparition de quelques taches blanches sur le feuillage. Les piqûres nutritionnelles détruisant les cellules de l'épiderme et du parenchyme, dans un premier temps, les feuilles prennent un aspect moucheté. La blessure mécanique des cellules due aux piqûres provoque des pertes d'eau et la dégradation des chloroplastes, ce qui entraîne une diminution importante de la quantité de chlorophylle et par conséquent une réduction de la photosynthèse de la plante. Des attaques sévères peuvent entraîner le dessèchement, et éventuellement la défoliation et parfois la mort de la plante (Figure 12). Les tétranyques du genre *Tetranychus* vivent de préférence à la face inférieure des feuilles où ils sont mieux protégés. Néanmoins lorsque la population atteint des densités importantes, les deux faces de la feuille sont occupées et on peut observer des toiles abondantes qui peuvent enserrer les organes de la plante et entraver leur développement (Figure 13).

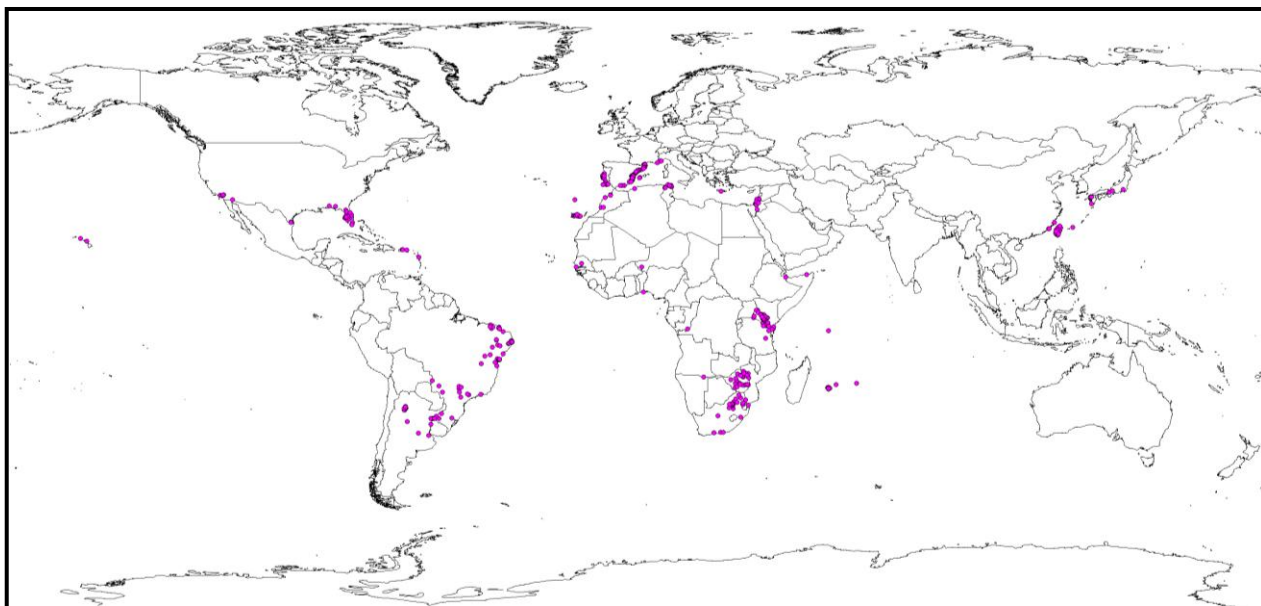


Figure 14. Distribution actuelle de *Tetranychus evansi* basée sur les données bibliographiques et nos observations.

II.3 Caractéristiques biologiques de *Tetranychus evansi*

L'acarien rouge de la tomate *T. evansi* est une espèce colonisatrice (Sabelis, 1985). Il colonise des plantes pionnières telles que les adventices comme la morelle noire *Solanum nigrum* L. dans des milieux temporaires. Les populations sont soumises, de manière successive et récurrente, à des successions de goulots d'étranglement, d'effets fondateurs, de forte densité, d'extinction locale et de recolonisation. De ce fait, une persistance locale des populations est rare. Etant donné que les acariens sont aptères et que leur dispersion est aléatoire, la chance de coloniser un hôte favorable est très faible pour *T. evansi*. Par conséquent, pour assurer leur dispersion et leur survie, la sélection sera en faveur des génotypes ayant un taux intrinsèque d'accroissement élevé et des génotypes ayant une forte capacité à atteindre des nouvelles ressources, s'y installer et fonder des nouvelles populations (Sabelis, 1985). Nous savons que cette espèce possède un fort pouvoir d'accroissement et les populations atteignent rapidement de très fortes densités (Sabelis, 1985).

II.3.1 Aire de répartition géographique actuelle

L'acarien rouge de la tomate *T. evansi* est apparu depuis une trentaine d'années comme un nouveau ravageur redoutable pour les cultures de solanacées dans de nombreuses régions du monde surtout en Afrique et dans le bassin méditerranéen. Depuis son premier signalement au nord est du Brésil en 1952 (Silva, 1954), cet acarien d'origine tropicale ne cesse de s'étendre à d'autres régions tropicales, sub-tropicales et tempérées. Il a actuellement une vaste répartition géographique englobant tous les continents (Migeon, Dorkeld, 2006) (Figure 14).

II.3.2 Traits d'histoire de vie et conditions climatiques

Les paramètres biologiques et démographiques de *T. evansi* ont été amplement étudiés (Bonato, 1999; De Moraes, McMurtry, 1987; Moutia, 1958; Qureshi *et al.*, 1969; Silva, 1954). Bien que ces travaux aient permis de connaître plusieurs éléments de sa biologie, certaines lacunes demeurent, notamment concernant l'influence de la plante hôte sur son développement.

Tetranychus evansi se développe dans une large gamme de températures : de 10 à plus de 38°C avec un optimum à 34°C (Bonato, 1999; De Moraes, McMurtry, 1987) et son taux intrinsèque d'accroissement potentiel (r_m) varie de 0,179 à 0,398 femelle/ femelle/ jour à 21 et 34°C respectivement. La durée totale de développement (de l'œuf à l'adulte) varie en fonction des conditions environnementales (température, humidité et plante hôte) et va d'environ 6 jours à 36°C à 13.6 jours à 22°C sur la tomate à 75 ± 10% d'humidité relative (Bonato, 1999). Sur la morelle blanche *Solanum douglasii*, l'œuf atteint le stade adulte en 6.5 jours à 35°C et en 13 jours à 25°C pour une Humidité Relative (H.R.) variant de 30 à 60% (De Moraes, McMurtry, 1987). La durée moyenne d'une génération est de 12 jours à 31°C , de 17 jours à 26°C et de 22 jours à 21°C (Bonato, 1999). Oatman *et al.* (1967) ont montré que le temps d'une génération était de 8 jours sur la pomme de terre à 28°C et 50% HR.

La fécondité de cet acarien est relativement élevée puisqu'à 26°C une femelle pond en moyenne 111 œufs sur une période de 2 semaines pour atteindre 123 œufs sur une période de 10 jours à 31°C (Bonato, 1999).

II.3.3 Potentiel invasif de *Tetranychus evansi*

Etant d'origine tropicale, *T. evansi* ne possède pas de diapause hivernale (Migeon, 2005). Sa propagation potentielle dans les zones tempérées est essentiellement limitée par le froid. Les facteurs qui semblent nécessaires au maintien de l'acarien durant l'hiver et à son développement pendant l'été, sont résumés comme suit (Migeon, 2005) :

- des hivers relativement doux,
- des températures estivales suffisamment élevées durant une période assez longue pour assurer le développement de plusieurs générations.
- des plantes présentes toute l'année : l'absence de diapause permet un développement même l'hiver mais nécessite aussi la présence de plantes hôtes qui ne peuvent pas être des annuelles gélives. La morelle noire *S. nigrum*, plante hôte largement exploitée par *T. evansi* et la morelle douce-amère *Solanum dulcamara*, qui sont des plantes hôtes potentielles largement disséminées en Europe méditerranéenne constituent un facteur susceptible de faciliter l'expansion de ce ravageur.

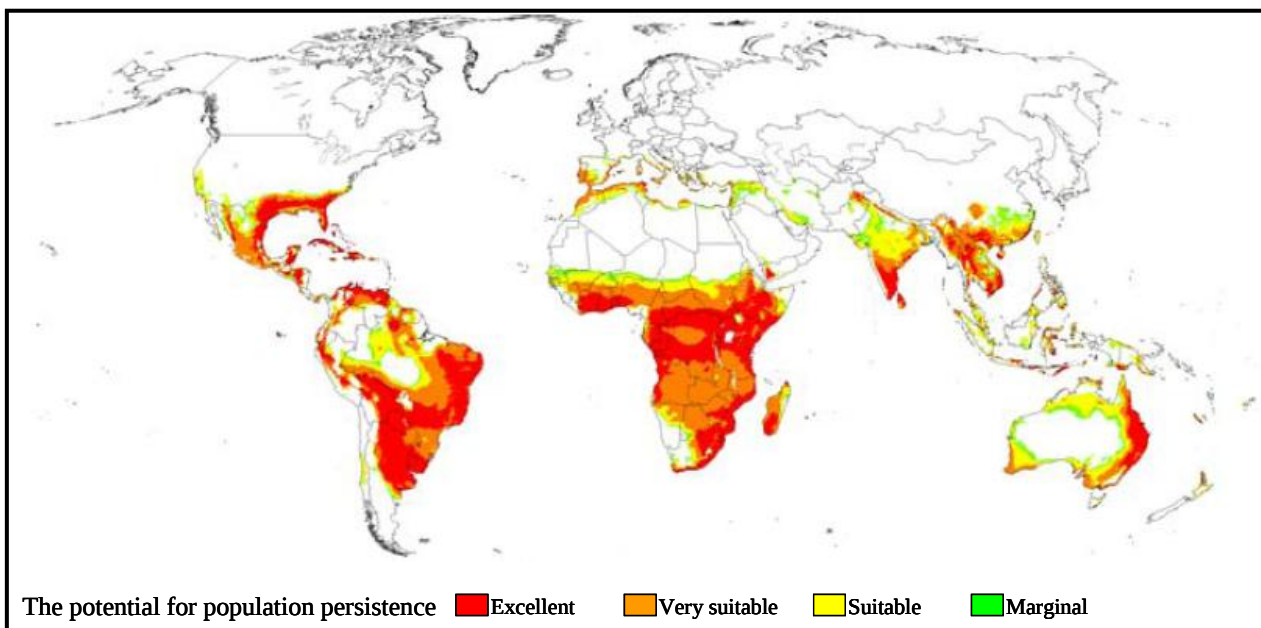


Figure 15. La distribution mondiale potentielle de *Tetranychus evansi* modélisée par le logiciel CLIMEX (d'après Migeon *et al.*, 2009).

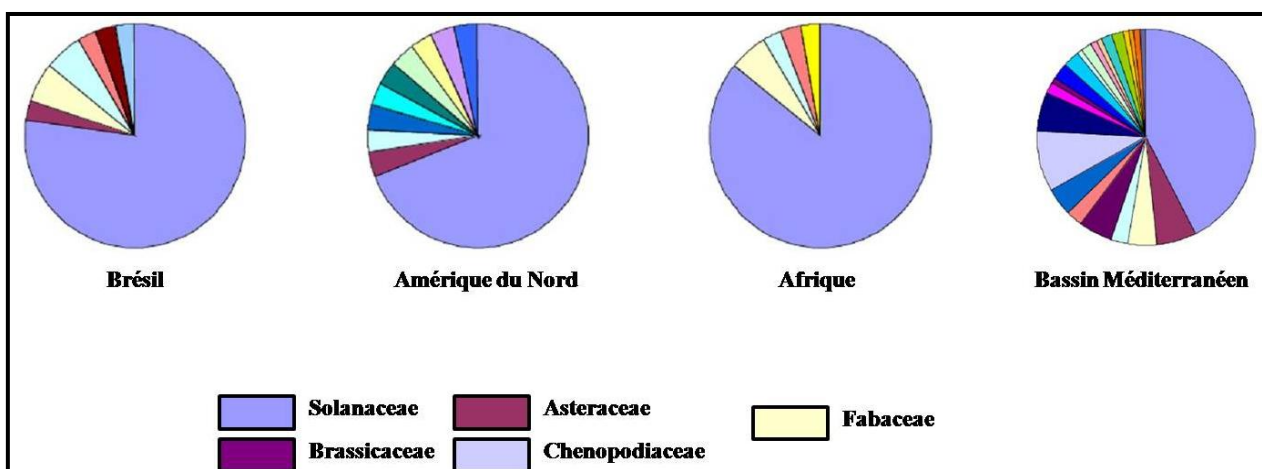


Figure 16. Spectre de plantes hôtes de *Tetranychus evansi* basé sur les signalements bibliographiques.

La sécheresse ainsi que l'humidité excessive sont signalées comme des facteurs limitant la propagation de *T. evansi* dans les zones tropicales, alors qu'en Amérique du Nord et en Eurasie, sa distribution potentielle semble être essentiellement limitée par le froid (Migeon *et al.*, 2009). Cependant, *T. evansi* a colonisé des régions au-delà de la répartition potentielle modélisée par (Migeon *et al.*, 2009). C'est le cas dans le sud de la bordure sahélienne où la sécheresse limite son extension. De même, en Asie, *T. evansi* a été détectée dans des zones où, théoriquement, l'humidité (à Taiwan) ou le froid (au Japon) devraient avoir limité son expansion. Il est possible que sa distribution puisse ne pas être correctement prédite par la modélisation climatique actuelle et une attention particulière devrait être accordée à son expansion dans le monde. Migeon *et al.* (2009) ont démontré par la modélisation de la répartition potentielle de *T. evansi* que toute la région méditerranéenne, l'est de l'Australie et une zone étendue du sud de l'Inde au sud de la Chine semblent particulièrement bien appropriées à l'établissement de cet acarien, mais sa distribution serait limitée aux zones côtières (Figure 15).

Cet acarien peut ainsi avoir une potentialité élevée à envahir des aires plus tempérées et notamment les cultures protégées en Europe, comme *Bemisia tabaci*, d'origine tropicale et également ravageur des tomates, qui se maintient dans les serres jusqu'en Norvège et de manière importante dans un pays tel que les Pays-Bas.

II.3.4 Plantes hôtes

Tetranychus evansi est une espèce oligophage. Bien qu'ayant été signalé sur 94 plantes appartenant à 30 familles botaniques différentes (Migeon, Dorkeld, 2006), les solanacées sont des hôtes préférentiels pour cet acarien. Cette espèce a toujours été signalée comme un ravageur très nuisible pour les solanacées cultivées notamment celles à feuilles poilues telles que la tomate, la pomme de terre, l'aubergine et le tabac et moins sur les plantes à feuilles lisses comme le poivron. La morelle noire *S. nigrum*, le datura *Datura stramonium*, et d'autres solanacées sauvages et adventices constituent des hôtes réservoirs et des sources de contamination pour les solanacées cultivées. Outre les cultures de solanacées, des observations récentes ont rapporté la présence de cette espèce sur d'autres plantes cultivées : sur haricot *Phaseolus vulgaris* au Kenya (Knapp, comm. pers. 2006) et à la Réunion (Caplong comm pers. 2006), sur pastèque *Citrullus lanatus* en Espagne (Ferragut, comm. pers. 2007).

Le spectre des plantes hôtes le plus diversifié a été observé dans le bassin méditerranéen (Migeon, Dorkeld, 2006) (Figure 16) et particulièrement en Espagne (Ferragut, Escudero, 1999). En France, *T. evansi* a été uniquement observé sur les solanacées *Solanum chenopodioides*, *Solanum quitoense*, *S. nigrum*, *D. stramonium* et tomate. Il a été avancé que cet acarien aurait pu élargir son spectre de plantes hôtes au cours de la colonisation de nouveaux territoires et des travaux sont en cours afin d'étudier cette hypothèse (Garzón-Luque *et al.*, 2008).

II.3.4.1 La tomate

La tomate est probablement originaire des régions andines côtières du nord-ouest de l'Amérique du Sud (Costa, Heuvelink, 2005). Elle fut introduite en Europe au début du XVI^e siècle par les Espagnols, d'abord en Espagne, puis en Italie. La tomate constitue actuellement le légume le plus diffusé, cultivé et industrialisé dans le monde. Selon la FAO, elle est cultivée dans 170 pays sous divers climats, y compris dans des régions relativement froides grâce au développement des cultures sous abri. Elle constitue une des cultures essentielles dans les régions tropicales aussi bien que tempérées. La production mondiale de tomates, incluant la production pour la consommation en frais (tomate de marché) et les cultures industrielles, s'est accrue d'environ 450 % pendant les quatre dernières décennies (FAOSTAT, 2008) et a atteint, en 2008, 129 649 883 de tonnes pour une surface de 5 227 883 d'hectares.

Les principaux pays producteurs sont dans l'ordre la Chine, les États-Unis, la Turquie, l'Inde, l'Égypte, l'Italie, l'Iran, l'Espagne et le Brésil. Considérée globalement, l'Union Européenne se place au deuxième rang avec 12.5 % de la production mondiale (20 403 445 tonnes) et les quatre pays méditerranéens (dans l'ordre : Italie, Espagne, Grèce et Portugal) assurent plus des trois quarts (76.8 %) de cette production. Le rendement moyen s'établit à 24.8 t/ha et il s'étale entre 50 et 170 dans les pays du sud de l'Europe, tandis que les pays du nord, dont la production est quasi exclusivement assurée sous serre, ont des rendements records : 480 t/ha aux Pays-Bas, 428 au Royaume-Uni et 408 en Belgique. En Afrique, cette culture occupe une place de plus en plus importante surtout chez les petits producteurs pour l'autoconsommation ou la vente directe.

II.3.4.2 Autres plantes hôtes

D'autres solanacées cultivées d'importance économique constituent des plantes hôtes de *T. evansi* : la pomme de terre *S. tuberosum*, le tabac *Nicotiana tabacum* et l'aubergine *S. melongena*. La pomme de terre est également une culture importante, elle constitue le cinquième produit agricole au niveau mondial. En 2008, la production mondiale de pommes de terre est estimée à 314 140 107 de tonnes, pour une surface cultivée de 18 192 405 d'hectares. L'Europe (40,54 %) et l'Asie (40,45 %) concentrent 81 % de la production totale mondiale de cette culture. La Chine est le principal producteur de ces cultures. Différents pays méditerranéens sont parmi les vingt principaux producteurs de l'aubergine, dont l'Égypte, la Turquie, l'Italie, l'Espagne, la Syrie, la Jordanie et la Grèce.

II.3.5 Impact socio-économique de *Tetranychus evansi*

Tetranychus evansi constitue un des ravageurs les plus importants des cultures de tomate durant la saison sèche en Afrique, notamment au Kenya (Knapp *et al.*, 2003) et au Zimbabwe (Sibanda *et al.*, 2000). Cet acarien a engendré des dégâts considérables sur les solanacées maraîchères en Afrique de l'Ouest au Sénégal (Duverney *et al.*, 2005) et au Bénin (Martin, comm. pers. 2009). Pour les pays méditerranéens, il n'y a pas encore de données sur l'impact économique de *T. evansi* sur les cultures de solanacées. Cependant, des infestations importantes ont été observées sur des cultures maraîchères en Espagne, aussi bien sous serre qu'en plein champ (Ferragut, Escudero, 1999), sur la pomme de terre et le poivron en Algérie (Guenauoui, comm. pers. 2009) sur l'aubergine aux îles de Canaries et sur la tomate en France (observations réalisées lors de ma thèse).

Bien que cet acarien montre une sensibilité élevée vis-à-vis des acaricides en Europe, cela ne doit pas nous faire perdre de vue l'importance potentielle de cette espèce en prenant en compte la capacité rapide des acariens à développer des résistances (Crozier, 1985), ou la possibilité d'introduction des souches résistantes aux acaricides. En Afrique cette espèce a déjà développé des résistances vis-à-vis de différents acaricides (Blair, 1989). La menace que *T. evansi* représente pour les cultures maraîchères dans les régions tempérées mais également pour les cultures sous serre, prend de l'importance en Europe dans un contexte de réchauffement climatique.

II.3.6 Ennemis naturels de *Tetranychus evansi*

Bien que cette espèce ait été signalée au Brésil depuis plus de 50 ans, elle n'y a jamais atteint le seuil de dommage économique (Furtado *et al.*, 2007), à l'exception de la fin des années soixante-dix et au début des années quatre-vingt. Durant cette période, lorsque la production de tomate a été l'une des plus importantes activités dans les zones irriguées au nord est du Brésil, *T. evansi* a été considéré comme l'un des ravageurs les plus importants de la tomate dans cette région (De Moraes *et al.*, 1986). Humber *et al.*, (1981) ont indiqué que le pathogène *Neozygites floridana* a été la cause du déclin des populations de *T. evansi* au nord est du Brésil et depuis il n'a jamais été signalé comme un ravageur. Cependant, vu le danger potentiel que *T. evansi* présente pour les cultures de tomate les recherches se sont concentrées sur l'utilisation des acariens prédateurs en lâchers inondatifs parce que cette méthode reste un moyen privilégié de lutte contre les tétranyques, grâce à son efficacité et à sa facilité d'utilisation (Zhang, 2003). Des études ont été ultérieurement réalisées dans les années quatre-vingt pour tester l'efficacité de différents acariens prédateurs pour contrôler cet acarien (De Moraes, McMurtry, 1986; De Moraes, Lima, 1983; De Moraes, McMurtry, 1985). Aucun de ces prédateurs testés ne s'est avéré efficace. Plus tard, avec l'émergence récente de *T. evansi* comme un des ravageurs les plus redoutables de la tomate en Afrique (Saunyama, Knapp, 2003), son danger potentiel pour les cultures de solanacées dans les régions tempérées en serre ainsi qu'en plein air (Migeon, 2005), et la tendance internationale accrue à la réduction de l'utilisation des pesticides, des nouvelles recherches ont été entreprises sur la lutte biologique à l'aide d'ennemis naturels (agents pathogènes ou prédateurs) contre cette espèce. Des expérimentations sur l'efficacité des prédateurs habituellement utilisés tels que, *Phytoseiulus persimilis*, *Neoseiulus californicus*, contre les acariens ravageurs (Escudero, Ferragut, 2005) n'ont donné aucun résultat satisfaisant. En revanche, les résultats obtenus avec les champignons entomopathogènes ont été plus encourageants (Wekesa *et al.*, 2005; Wekesa *et al.*, 2006) et particulièrement une souche du champignon *Neozygites floridana* découverte au Brésil (Wekesa *et al.*, 2007). Cependant, *T. evansi* semble être bien contrôlé par l'acarien prédateur *Neoseiulus californicus* sur le haricot *Phaseolus vulgaris* (Koller *et al.*, 2007) et par la coccinelle généraliste *Stethorus tridens*, sur *Solanum americanum* (Britto *et al.*, 2009; Fiaboe *et al.*, 2007a).

L'échec de l'utilisation d'auxiliaires pour lutter contre les tétranyques tisserands sur la tomate a été interprété comme résultat de la présence de trichomes glandulaires sur les feuilles et les tiges des plants de tomates et de la présence de métabolites secondaires qui pourraient

rendre les proies moins appropriées à ces prédateurs. De plus, *T. evansi* semble présenter des caractéristiques répulsives, ou toxiques, pour les prédateurs sur solanacées (De Moraes, McMurtry, 1986). Par conséquent, des prospections ont été conduites au Brésil et en Argentine (l'aire d'origine supposée de *T. evansi*) afin de chercher des acariens prédateurs associés avec *T. evansi* sur les solanacées (Da Silva *et al.*, 2008; De Vasconcelos *et al.*, 2008; Fiaboe *et al.*, 2007b; Furtado *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2006; Furtado *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2005). Plusieurs acariens prédateurs ont été récoltés en association avec *T. evansi*, mais une seule espèce *Phytoseiulus longipes* s'est montrée efficace pour le contrôler. Cependant, seules certaines populations de ce prédateur (argentine et brésilienne) sont capables de le contrôler sur tomate alors que les populations chiliennes et sud africaines ne le peuvent pas (Ferrero, 2009).

ARTICLE.I

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**, 485-501.

EVIDENCE OF CO-SPECIFICITY BETWEEN *TETRANYCHUS EVANSI* AND *TETRANYCHUS TAKAFUJII* (ACARI: PROSTIGMATA, TETRANYCHIDAE): COMMENTS ON TAXONOMIC AND AGRICULTURAL ASPECTS

Tetsuo Gotoh¹, Ryouji Araki¹, Angham Boubou², Alain Migeon², Francisco Ferragut³
and Maria Navajas²

1. Laboratory of Applied Entomology and Zoology, Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki 300-0393, Japan (e-mails: gotoh@mx.ibaraki.ac.jp and mushiken_a@yahoo.co.jp); 2. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre de Biologie et Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, CS 30 016, 34988 Montferrier sur Lez, cedex, France (e-mails: boubou@supagro.inra.fr, migeon@supagro.inra.fr, and navajas@supagro.inra.fr); 3. Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica, Camino de Vera, 14, 46022 Valencia, Spain (e-mail: fferragut@eaf.upv.es).

ABSTRACT – Using a combination of the cytochrome oxidase subunit I gene (*COI*) and internal transcribed spacer (ITS) sequence information, cross-breeding, and morphological criteria, the taxonomic status of *Tetranychus takafujii* was reassessed. Described from Japan and very close to *Tetranychus evansi*, only the male empodium II separated the two species. Six *T. evansi* samples collected in Brazil, France, Kenya, Spain (including the Canary Islands), Taiwan, and two samples from Japan previously species-identified as *T. takafujii*, were examined. DNA sequences consistently divide the samples into two groups: group I held the mites from Brazil and France and group II contained the remaining samples of *T. evansi* together with the two mites collected in Japan. Likewise, cross-breeding experiments detected the same two groups that were reproductively partially incompatible. However, the Japanese samples were completely compatible with the rest of the group II *T. evansi* samples. The empodium II shape failed to distinguish consistently between the *T. evansi* and *T. takafujii* samples, but rather highlighted its variability, questioning its utility for separating these taxa. Congruent results support the co-specificity of the two taxa. It is concluded that *T. takafuji* is a junior synonym of *T. evansi*.

Key words – Acari, systematics, Tetranychidae, new synonym, reproductive compatibility, genetic distance, morphology.

INTRODUCTION

The unambiguous identification of species is a prerequisite for any biological study and in the case of agricultural pests it is also an essential step for effective pest management issues. A clear understanding of the taxonomic status of the target species is crucial not only to the design of control strategies for choosing the adapted biological control agents or for applying the right chemicals, but also to decision-making on quarantine measures. The family Tetranychidae, or spider mites, contains the most injurious plant-feeding mites and represents one of the most cosmopolitan

and economically important groups of terrestrial arthropods [Jeppson *et al.* (1975); see Bolland *et al.* (1998) and Migeon and Dorkel (2006) for an updated list]. Despite the facts that the systematics of the family has been extensively studied for many years and that excellent and useful taxonomic keys exist, the limited number of potential diagnostic characters (partly because of the small size of these mites: < 0.5 mm) and the intraspecific variations of some of the key traits used to separate taxa (Wauthy *et al.*, 1998; Zhang and Jacobson, 2000) make the morphological identification of tetranychid species problematic in some cases (Navajas *et al.*, 1999, 2001).

Distinction between species of the genus *Tetranychus* has conventionally been based on the shape of the male aedeagus (Pritchard and Baker, 1955). More recently (Flechtmann and Knihinicki, 2002) provided a key for the groups defined in this large genus (more than 100 species) mainly based on female tarsus I chaetotaxy. The precise determination of species based on the aedeagus alone might sometimes not be accurate enough and the use of morphological characters of both sexes becomes necessary. For example, *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard was initially misidentified as *Tetranychus marianae* McGregor (Silva, 1954) because of the similarity of the shape of the aedeagus of the two spider mites. A subsequent more detailed examination of the chaetotaxy on the legs of female mites allowed the two species to be distinguished by the proximal pair of duplex setae on female tarsus I (Baker and Pritchard, 1960; de Moraes *et al.*, 1987).

The limit of species identification in the Tetranychidae based on morphological characters alone is exemplified by the species *Tetranychus takafujii* Ehara and Ohashi, which was first described as occurring in different localities in Japan (Ehara and Ohashi, 2002). Although the species was described as being very close to *T. evansi*, these two spider mites could be separated by the shape of the male empodium II as the sole male character, but the females were indistinguishable (Ehara and Ohashi, 2002; Ehara and Masaki, 2005). The discrimination of the two species based on the shape of the male empodium II, relies on such small differences that the reliability of this character for species diagnosis and hence for the synonymy of *T. takafujii* and *T. evansi* can be questioned. These two species belong to the subgenus *Tetranychus s. str.* characterized by hooked peritremes and female dorsohysterosomal striae longitudinal between setae *e*1 and *f*1 and forming a diamond-shaped pattern. The two species belong to the group *desertorum* as defined by the female tarsus I bearing all four proximal tactile setae in line with proximal pair of duplex setae (Flechtmann and Knihinicki, 2002).

Whereas *T. takafujii* has been described exclusively from Japan, *T. evansi* has a wider distribution. *Tetranychus evansi* is currently known to occur in several countries in the Americas, in Africa, and in the Mediterranean basin (so far being reported from Spain, Portugal, France, Italy, Greece, Morocco, and Israel), as well as in China and Taiwan in Asia [see Migeon and Dorkel (2006) and Migeon *et al.* (2009) for a detailed list of worldwide records]. Considered to be a species that originated from South America, the records of *T. evansi* that have accumulated from other continents in the last 10 years indicate that this mite is an invasive species, as well as a significant pest of tomato and other solanaceous crops in Africa and

Europe. *Tetranychus evansi* has recently been added to the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) alert list. By contrast, *T. takafujii* has been only reported from Japan on solanaceous plants (Ehara and Ohashi, 2002; Ehara and Masaki, 2005). The important agricultural issues related to this spider mite pest make it essential to be precise about the species status of *T. evansi* and *T. takafujii* because the apparent confusion in their species diagnostics could have considerable economic consequences. As an example, quarantine services of countries considered to be free of *T. evansi* could refuse the importation of plant material from regions where the species has been reported.

As for many other arthropods, molecular information is increasingly used to solve taxonomic and systematic questions in the Tetranychidae, including comparisons of interspecific and intraspecific variation among populations (see Navajas *et al.*, 1996; Navajas and Fenton, 2000). Among the genome regions most frequently used for molecular diagnostics in arthropods, the internal transcribed spacer (ITS) of the nuclear ribosomal DNA (rDNA) and several mitochondrial (mt) genes, in particular the cytochrome oxidase subunit I gene (*COI*), have proved to be powerful when addressing the systematics of Acari. For example, Gotoh *et al.* (1998) confirmed the species status of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara and Gotoh and *Tetranychus urticae* (Koch) using the sequence of the second ITS (ITS2) of the rDNA. Similarly, Navajas *et al.* (2001) showed by molecular analysis of the ITS2 sequences and cross-breeding experiments that *Tetranychus hydrangeae* Pritchard and Baker is a synonym of *Tetranychus kanzawai* Kishida. Likewise, mitochondrial *COI* sequences used for DNA bar-coding techniques (Savolainen *et al.*, 2005) have also proved to be a useful tool for species discrimination, as for example in the identification of field samples where several closely related tetranychid species are often found together (Hurtado Ruiz *et al.*, 2006; Hinomoto *et al.*, 2007).

The two DNA regions, ITS and *COI*, were used in the present study to investigate the taxonomic status of *T. evansi* and *T. takafujii*. To take into account the eventual interspecific variation of mites having originated from different geographical areas, we examined individuals sampled from several countries in different continents [Brazil, France, Kenya, Spain (including the Canary Islands), Japan, and Taiwan]. The information obtained for *COI* and ITS sequences was contrasted with a morphological study conducted to validate the congruence between the two data sets. Cross-breeding experiments were also carried out to provide additional and independent

evidence of the taxonomic status of *T. takafujii* and *T. evansi*. Reciprocal laboratory crosses and backcrosses between mites that had been identified as *T. evansi* and *T. takafujii* were performed to examine the reproductive compatibility of these species. By an integrative taxonomic approach examining congruence between morphological, DNA, and compatibility data, the taxonomic status was reassessed and the synonymy of *T. evansi* and *T. takafujii* is proposed.

MATERIAL AND METHODS

Mite samples – Mite samples were collected from either black nightshade (*Solanum nigrum* L.) or tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in a total of eight localities from six different countries (Table 1). The two Japanese mite populations, already studied (Ehara and Ohashi, 2002; Ehara and Masaki, 2005), had previously been identified as *T. takafujii*, whereas all other samples were previously identified as *T. evansi*. Mites from each origin were maintained alive for crossing experiments and others were kept in absolute ethanol at -20°C until DNA analysis. Some individuals were preserved in 70% ethanol for further morphological study. All *T. evansi* samples were imported to Japan with the authorization of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan (nos. 18-Y-685–688, –861 and –1091). Laboratory stocks were separately reared on leaf discs (c. 10 cm^2) of black nightshade placed on water-saturated polyurethane mats in plastic dishes (9 cm in diameter) at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and under a 16 : 8 h light : dark photoperiod.

Molecular analysis – DNA extraction, amplification and sequencing – Total DNA was extracted from individual adult females using the DNeasy tissue Kit (Qiagen S.A. France, 3 avenue du Canada LP 809, 91974 Courtabœuf Cedex, France), following the protocol for cultured animal cells. The manufacturer's instructions were modified for DNA extraction from small mites, as described in Tsagkarakou *et al.* (2007). DNA was suspended in 50 μL ultra-pure water. Two target DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced: the nuclear ribosomal ITS region and part of the mitochondrial *COI*. The PCR conditions were as described in detail by Tsagkarakou *et al.* (2007) except that 2 μL template DNA was used to amplify the ITS region and 4 μL was used for the *COI* fragment. The PCR amplifications were carried out in an Eppendorf Mastercycler. Primers used to amplify and sequence ITS and *COI*, and annealing temperatures used for the PCR, are shown Table 2. The PCR products were purified using ultra-filtration membranes and subsequently sequenced commercially (Cogenics, Meylan, France).

The SEQSCAPE package (SEQSCAPE® Software v2.5, Applied Biosystems Inc. 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404, USA) was used to edit sequences and CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) was used for sequence alignments. The package MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) was used to calculate pairwise nucleotide divergence of the *COI* and ITS sequences using the Kimura 2-parameter (K2P) model.

PCR detection of intracellular bacteria infection – Arthropods might be infected by intracellular bacteria of the genera *Wolbachia* (alpha Proteobacteria) and *Cardinium* (Sphingobacteria), which can cause reproductive abnormalities in the host when infected individuals are crossed with uninfected ones, or when individuals infected with different strains are crossed. Therefore, before conducting the cross-breeding experiments described below, we checked whether *T. takafujii* and *T. evansi* strains were infected with two types of bacteria commonly found in spider mites. The presence of *Wolbachia* was examined using two pairs of *Wolbachia*-specific 16S rDNA (99f-992R; O'Neill *et al.*, 1992) and the *ftsZ* gene (*ftsZ* fl-r1; Holden *et al.*, 1993). The primers used for detection of *Cardinium* were CLO-fl and CLO-r1 (Gotoh *et al.*, 2007). All samples were also examined by a set of primers for a mitochondrial *cytb* gene (Muraji *et al.*, 2000) to verify the quality of the DNA template used in the reaction to detect eventual false negatives for *Wolbachia*. The techniques used here have been described by Gotoh *et al.* (2003, 2007).

Cross-breeding experiments – To determine the reproductive compatibility among the two *T. takafujii* and six *T. evansi* strains, round-robin crosses were carried out for two generations (total of 184 combinations). Because several backcross combinations (B_1 generation) resulted in extremely low egg hatchability, crosses between the *T. takafujii* JO and the *T. evansi* FT strains and between the *T. evansi* FT and SV strains were carried out until the B_2 generation, to know whether hatchability improves in the B_2 generation in comparison with the B_1 generation. Single females in the teleiochrysalis stage (the final immature resting stage) obtained from each stock culture were transferred onto a small leaf disc (c. 4 cm^2) with two adult males (1–5 days old) from each of the stocks. Five days after the start of oviposition on each disc, the adults (female and male) were removed. After reaching the teleiochrysalis stage, the female offspring were backcrossed with males of both of the parental strains to determine the reproductive compatibility in B_1 and B_2 offspring. Because the egg stage lasts less than 5 days, egg hatchability was determined 7 days after removing the adults. All

Table 1. Collection records of mites. GenBank accession numbers are indicated for sequences of the cytochrome oxidase I gene (*COI*) and the internal transcribed spacer (ITS) regions.

Locality, country (<i>COI</i> , ITS) ^a	Abbreviation	GenBank accession numbers		Geographic coordinates	Collection date	Source plant	Collector
		<i>COI</i>	ITS				
Osaka, Japan (1,1)	JO	FJ440677	FJ440674	34°51'N, 135°36'E	21 June 2005	<i>Solanum nigrum</i>	K. Ohashi
Tokyo, Japan (2,2)	JT	<i>id.</i>	<i>id.</i>	35°35'N, 139°36'E	3 Nov. 2006	<i>S. nigrum</i>	T. Gotoh & Y. Kitashima
Wufeng, Taiwan (2,2)	TW	<i>id.</i>	<i>id.</i>	24°04'N, 121°42'E	16 Dec. 2006	<i>S. nigrum</i>	C.-C. Ho
Mwea Tebere, Kenya (2,1)	KM	FJ440678	<i>id.</i>	01°42'S, 037°25'E	Mar. 2001	<i>Solanum lycopersicum</i>	M. Knapp
Canary Isl., Spain (3,3)	SC	<i>id.</i>	<i>id.</i>	28°23'N, 016°33'W	Dec. 2006	<i>S. lycopersicum</i>	E. Hernandez-Suarez
Valencia, Spain (3,3)	SV	<i>id.</i>	<i>id.</i>	39°29'N, 000°20'W	15 Jan. 2007	<i>S. lycopersicum</i>	F. Ferragut
Piracicaba, Brazil (3,2)	BP	FJ440675	FJ440673	22°41'S, 047°38'W	2002	<i>S. lycopersicum</i>	A. Pallini
Torreilles, France (2,2)	FT	FJ440676	<i>id.</i>	42°45'N, 002°59'E	28 Sept. 2006	<i>S. nigrum</i>	A. Migeon

^aNumber of analysed individuals for *COI* and ITS.

Table 2. Description of the primers used in polymerase chain reaction amplification and sequencing of the ribosomal (ITS) and mitochondrial (*COI*) DNA regions studied.

Primer name	Sequence (5' to 3')	Reference	Position	Amplified region	Primer purpose	Annealing temp.
18S	AGAGGAAGTAA AAGTCGTAAC AAG	(Ben Ali <i>et al.</i> , 2000)	18S	ITS1	PCR	50°C
InternS	GATCACTCGAAT TACCAATCG	(Navia <i>et al.</i> , 2005)	5,8S	ITS2	Sequencing	52°C
28S	ATATGCTTAAAT TCAGCGGG	(Ben Ali <i>et al.</i> , 2000)	28S	ITS2	PCR	50°C
InternS Bis Rev	CACTTCTCAACT CTCAGACAG	(Navia <i>et al.</i> , 2005)	5,8S	ITS1	Sequencing	52°C
InternS Rev	CGATTGGTAATT CGAGTGATC	(Navia <i>et al.</i> , 2005)	5,8S	ITS1	Sequencing	52°C
C1-J-1718	GGAGGATTTGG AAATTGATTA GTTCC	(Simon <i>et al.</i> , 1994)	<i>COI</i>	<i>COI</i>	PCR/Sequencing	50°C
IntCOI	GGNGANCCTAT TTTATATCAAC	This study	<i>COI</i>	<i>COI</i>	Sequencing	52°C
COIREVA	GATAAAACGTA ATGAAAATGA GCTAC	This study	<i>COI</i>	<i>COI</i>	PCR/Sequencing	50°C
IntCOI Rev	GTTGATATAAAA TAGGNTCNCC	This study	<i>COI</i>	<i>COI</i>	Sequencing	52°C

COI, cytochrome oxidase I gene; ITS, internal transcribed spacer region.

experiments were carried out at 25°C and under a 16 : 8 h light : dark photoperiod.

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the influence of cross combinations on the number of eggs laid per female during the first 5 days of the oviposition period, egg hatchability, juvenile survival rate, offspring sex ratio (i.e. fraction of daughters), and average number of female offspring produced per female. Means were compared among cross combinations using Tukey's honestly significant difference test (SPSS, 2002). Egg numbers and daughter production were normalized and log-transformed. Egg hatchability, juvenile survival rate, and offspring sex ratio were arcsine $\sqrt{x}$ -transformed (Sokal and Rohlf, 1995).

Morphological analysis – Fifteen males from each locality were mounted on permanent slides using Hoyer's medium (Pritchard and Baker, 1955; Jeppson *et al.*, 1975). Slides were examined on a phase-contrast microscope (Nikon Optiphot). For each specimen, we observed the empodium of leg II (empodium II) and classified it into one of the three categories defined by Ehara and Masaki (2005): (1) *evansi* – one pair of

proximoventral spurs; (2) *takafujii* A – three pairs of proximoventral spurs; or (3) *takafujii* B – three pairs of proximoventral hairs. Morphological characters were illustrated using a Leica DM LB 2 phase-contrast microscope with the aid of a drawing tube attachment.

RESULTS

Molecular study – The complete ribosomal ITS region including the ITS1, 5.8S and ITS2 genes [1137 base pairs (bp)] and a fragment of the mitochondrial *COI* gene (868 bp) were sequenced for mites from the eight samples indicated in Table 1. No intra-population variation was observed in either DNA fragments among the different individuals examined for each location. Two types of ITS sequences obtained differed by 0.18% nucleotide divergence (two point mutations in the ITS2 region: positions 723 and 1045 in the associated GenBank file). Sequence polymorphism was higher in the *COI* region: 25 variable positions, all resulting from single-nucleotide substitutions (Table 3). As for the ITS, *COI* sequences consistently

Table 3. All variable sites among cytochrome oxidase I gene (*COI*) sequences and pairwise percent sequence divergence among mite samples.

Group	Sample abbreviation	Variable sites			Divergence (%)							
		1111122	2223455667	77778								
		1160001611	7997625330	15574								
		0372398027	7059939473	53784	BP	FT	JO	JT	TW	KM	SC	SV
I	BP	TCTGGAGTGT	CCGACCAAAC	TACAC	–	–	–	–	–	–	–	–
I	FT	A...	T.....	..TG.	0.46	–	–	–	–	–	–	–
II	JO	CTCAAT.CAC	TAAG.TGGGT	AG..T	2.47	2.96	–	–	–	–	–	–
II	JT	CTCAAT.CAC	TAAG.TGGGT	AG..T	2.47	2.96	0	–	–	–	–	–
II	TW	CTCAAT.CAC	TAAG.TGGGT	AG..T	2.47	2.96	0	0	–	–	–	–
II	KM	CTCAAT.CA.	TAAG.TGGGT	AG..T	2.35	2.84	0.12	0.12	0.12	–	–	–
II	SC	CTCAAT.CA.	TAAG.TGGGT	AG..T	2.35	2.84	0.12	0.12	0.12	0	–	–
II	SV	CTCAAT.CA.	TAAG.TGGGT	AG..T	2.35	2.84	0.12	0.12	0.12	0	0	–

Two types of sequences identified as groups I and II. Positions of variable sites listed vertically above each site correspond to those from sequences in the associated GenBank files. Dots indicate sequence matched to the first sequence. See Table 1 for sample abbreviations.

divided samples in the same two groups differing from each other by 2.35–2.96% nucleotide divergence (Table 3). Group I contained BP and FT mites (from Brazil, Piracicaba and France, Torreilles, respectively), which shared the same ITS sequence and had 0.46% *COI* divergence. Group II contained the rest of the *T. evansi* samples together with the JO and JT Japanese samples previously identified as *T. takafujii*. All the mites in this group shared the same ITS sequence. A single point mutation (position 217) was observed in the *COI* sequence in group II (Table 3).

Reproductive compatibility – None of the strains studied were infected by endosymbiont bacteria, neither *Wolbachia* nor *Cardinium* (data not shown). Hence, we did not need to consider the influence of intracellular bacteria on reproductive compatibility in cross-breeding experiments. Total egg production, egg hatchability, juvenile survival rate, and offspring sex ratio were high in all intra-strain crosses in both F_1 and F_2 generations, with some variations among the strains (Table 4). In crosses between the *T. takafujii* JO strain and either the *T. takafujii* JT strain or each of the six *T. evansi* strains, total egg production, hatchability, juvenile survival rate, and offspring sex ratio were similar to the values for intra-strain crosses (Table 5), but when daughter ratios of the intra-strain crosses were compared (cf. Table 4) there were two noticeable combinations: daughter ratios of the JO $\times$ BP and JO $\times$ FT crosses were significantly lower than those of the intra-strain crosses (ANOVA, $F_{4,94} = 35.838$, $P < 0.001$): namely, compared among JO $\times$ JO, BP $\times$ BP, FT $\times$ FT, JO $\times$ BP, and JO $\times$ FT).

When the backcrosses between the *T. takafujii* JO strain and either the *T. takafujii* JT strain or each of the six *T. evansi* strains were performed with males of both of the parental strains, almost all combinations (B_1 generation) resulted in higher values of egg production, hatchability, juvenile survival, and sex ratio, comparable to those in intra-strain crosses (Table 4). However, the backcrossed JO $\times$ BP and JO $\times$ FT combinations (B_1) showed extremely low egg hatchability (<10%) (Fig. 1 and Table 5). This indicates that there is a partial reproductive incompatibility in crosses between the JO strain and either the BP or the FT strain, resulting in a reduction of the number of B_1 daughters. Furthermore, unmated F_1 females obtained from crosses between the JO strain and either BP or FT strain laid eggs with much lower hatchability (<10%), but these values were similar to those of the respective backcrossed females [ANOVA, $F_{5,136} = 1.455$, $P = 0.209$ for the JO $\times$ BP combination; $F_{5,164} = 1.443$, $P = 0.211$ for the JO $\times$ FT combination], namely, (JO $\times$ BP) $\times$ –, (BP $\times$ JO) $\times$ –, (JO $\times$ BP) $\times$ BP, (JO $\times$ BP) $\times$ JO, (BP $\times$ JO) $\times$ JO, (BP $\times$ JO) $\times$ BP; and $F_{5,164} = 1.443$, $P = 0.211$ for the JO $\times$ FT combination, namely, (JO $\times$ FT) $\times$ –, (FT $\times$ JO) $\times$ –, (JO $\times$ FT) $\times$ FT, (JO $\times$ FT) $\times$ JO, (FT $\times$ JO) $\times$ JO, (FT $\times$ JO) $\times$ FT]. This shows that high egg mortality occurred irrespective of the gender. Interestingly, the eggs that did hatch were of good quality, e.g. juvenile survival rate was high and did not differ significantly ($F_{5,136} = 2.043$, $P = 0.077$ and $F_{5,164} = 1.327$, $P = 0.255$ for the respective combinations), and it was as high in these as in other crosses (cf. Table 5).

Table 4. Compatibility of the intra-strain crosses in two *Tetranychus takafujii* (JO and JT) and six *Tetranychus evansi* (BP, FT, KM, SC, SV, and TW) strains at 25°C in a 16 : 8 h light : dark photoperiod.

Cross		Survival rate in				Average number	
Female × Male	n ^a	No. of eggs/female	Hatchability (%)	immature stages (%)	Female offspring (%)	of female offspring produced/female	
JO × JO	16	42.00 ± 1.47 e	99.85 ± 0.15 a	99.61 ± 0.39 a	88.73 ± 1.15 bc	37.06 ± 1.39 d	
JT × JT	16	51.25 ± 1.59 abcde	99.89 ± 0.11 a	99.89 ± 0.11 a	90.12 ± 1.35 abc	46.00 ± 1.44 abc	
BP × BP	19	46.26 ± 0.81 bcde	99.78 ± 0.15 a	97.06 ± 0.95 ab	89.35 ± 0.84 bc	40.11 ± 1.05 bcd	
FT × FT	16	44.19 ± 1.99 de	99.50 ± 0.28 a	97.65 ± 1.18 ab	89.95 ± 1.04 abc	38.94 ± 2.24 cd	
KM × KM	21	46.90 ± 1.81 bcde	99.21 ± 0.40 a	99.32 ± 0.35 a	86.14 ± 0.82 c	39.76 ± 1.56 bcd	
SC × SC	16	51.31 ± 2.50 abcde	99.47 ± 0.24 a	94.49 ± 1.62 b	88.33 ± 0.79 bc	42.69 ± 2.36 bcd	
SV × SV	18	55.94 ± 2.45 ab	99.90 ± 0.10 a	99.81 ± 0.19 a	88.83 ± 0.75 bc	49.50 ± 2.18 ab	
TW × TW	20	45.50 ± 1.77 cde	99.89 ± 0.11 a	98.69 ± 0.58 ab	90.51 ± 0.86 abc	40.70 ± 1.69 bcd	
(JO × JO) × JO	17	50.82 ± 2.13 abcde	99.88 ± 0.12 a	98.53 ± 0.70 ab	91.93 ± 0.78 ab	45.88 ± 1.88 abc	
(JT × JT) × JT	17	51.76 ± 1.73 abcde	99.88 ± 0.12 a	96.61 ± 1.08 ab	90.70 ± 1.08 ab	45.24 ± 1.55 abc	
(BP × BP) × BP	22	53.91 ± 1.52 abcde	99.49 ± 0.18 a	98.56 ± 0.52 ab	90.92 ± 0.68 ab	48.09 ± 1.49 ab	
(FT × FT) × FT	19	49.58 ± 1.91 abcde	99.88 ± 0.12 a	98.89 ± 0.47 ab	89.61 ± 1.18 bc	43.95 ± 1.88 bcd	
(KM × KM) × KM	22	54.27 ± 2.90 abcd	99.66 ± 0.17 a	97.44 ± 0.82 ab	86.37 ± 0.58 c	45.64 ± 2.59 abc	
(SC × SC) × SC	20	51.85 ± 2.01 abcd	99.20 ± 0.23 a	97.97 ± 0.97 ab	90.54 ± 0.79 abc	45.70 ± 1.93 abc	
(SV × SV) × SV	20	54.80 ± 1.72 abc	99.60 ± 0.16 a	97.82 ± 0.62 ab	88.28 ± 0.57 bc	47.15 ± 1.58 abc	
(TW × TW) × TW	20	59.25 ± 1.44 a	99.83 ± 0.12 a	98.56 ± 0.56 ab	93.87 ± 0.51 a	54.70 ± 1.37 a	
F-value ^b		F _{15,283} = 5.059***	F _{15,283} = 1.718*	F _{15,283} = 3.002***	F _{15,283} = 5.645***	F _{15,283} = 4.993***	

^aNumber of females tested.

^bMean values differ significantly at * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ (analysis of variance). Data are shown as mean ± SE. Values in a column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ (Tukey's honestly significant difference test).

Table 5. Compatibility of crosses between *Tetranychus takafujii* JO strain and either *T. takafujii* JT strain or six *T. evansi* strains (BP, FT, KM, SC, SV, and TW) at 25°C in a 16 : 8 h light : dark photoperiod.

Cross		Survival rate in				Average number of	
Female × Male	<i>n</i> ^a	No. of eggs/female	Hatchability (%)	immature stages (%)	Female offspring (%)	female offspring produced/female	
JO × JT	29	36.79 ± 1.54 b	98.72 ± 0.44 ab	97.03 ± 0.91 ab	89.79 ± 0.93	31.59 ± 1.35 b	
JT × JO	20	37.80 ± 1.03 b	99.50 ± 0.23 ab	95.66 ± 1.27 ab	90.71 ± 1.12	32.65 ± 1.08 b	
(JO × JT) × JO	29	40.66 ± 2.02 b	97.77 ± 0.61 b	95.13 ± 1.09 ab	92.29 ± 1.14	34.97 ± 1.82 b	
(JO × JT) × JT	32	44.66 ± 2.00 ab	98.15 ± 0.53 ab	94.04 ± 1.12 b	92.68 ± 0.62	38.22 ± 1.79 ab	
(JT × JO) × JT	13	49.38 ± 2.42 a	99.49 ± 0.27 ab	97.57 ± 0.65 ab	92.25 ± 1.17	44.15 ± 2.15 a	
(JT × JO) × JO	27	41.00 ± 1.17 ab	99.65 ± 0.17 a	98.27 ± 0.81 a	92.61 ± 0.72	37.22 ± 1.18 ab	
<i>F</i> -value ^b		<i>F</i> ₅₁₄₄ = 4.218**	<i>F</i> ₅₁₄₄ = 3.710**	<i>F</i> ₅₁₄₄ = 2.795*	<i>F</i> ₅₁₄₄ = 1.847 ns	<i>F</i> ₅₁₄₄ = 4.678**	
JO × BP	19	46.79 ± 2.51 ab	98.28 ± 0.50 a	91.50 ± 1.69 ab	67.47 ± 3.10 b	28.32 ± 1.89 a	
BP × JO	16	50.75 ± 2.38 ab	98.03 ± 0.38 a	90.20 ± 1.71 b	88.44 ± 1.18 ab	39.69 ± 1.59 a	
(JO × BP) × JO	32	41.84 ± 1.78 b	5.38 ± 0.81 b	95.59 ± 2.45 a	81.54 ± 5.06 ab	1.96 ± 0.24 c	
(JO × BP) × BP	25	45.80 ± 1.26 ab	5.76 ± 0.69 b	95.45 ± 2.19 a	79.37 ± 6.05 ab	2.00 ± 0.22 bc	
(BP × JO) × BP	25	48.96 ± 1.73 ab	6.94 ± 0.68 b	94.12 ± 2.41 ab	81.25 ± 3.47 a	2.60 ± 0.24 b	
(BP × JO) × JO	27	52.44 ± 1.31 a	4.77 ± 0.58 b	91.30 ± 3.13 ab	82.54 ± 5.21 a	2.08 ± 0.25 bc	
<i>F</i> -value ^b		<i>F</i> ₅₁₃₈ = 5.033***	<i>F</i> ₅₁₃₈ = 1044.509***	<i>F</i> ₅₁₃₈ = 3.331**	<i>F</i> ₅₁₃₈ = 2.489*	<i>F</i> ₅₁₃₈ = 130.692***	
JO × FT	19	47.53 ± 2.17 b	99.71 ± 0.16 a	98.82 ± 0.69	68.99 ± 2.73 b	32.11 ± 1.88 a	
FT × JO	16	32.88 ± 1.69 c	98.30 ± 0.49 a	91.31 ± 1.87	95.09 ± 0.90 a	28.06 ± 1.58 a	
(JO × FT) × JO	28	53.89 ± 2.59 ab	7.59 ± 0.86 b	90.37 ± 2.90	75.08 ± 5.18 ab	2.74 ± 0.31 b	
(JO × FT) × FT	28	57.39 ± 1.79 ab	5.17 ± 0.57 b	94.55 ± 2.65	63.40 ± 6.25 b	1.88 ± 0.24 b	
(FT × JO) × FT	27	55.44 ± 2.02 ab	6.49 ± 0.69 b	90.44 ± 3.50	66.53 ± 6.08 b	2.20 ± 0.27 b	
(FT × JO) × JO	24	63.30 ± 2.41 a	6.23 ± 0.54 b	94.51 ± 2.30	75.90 ± 3.84 ab	2.63 ± 0.22 b	
<i>F</i> -value ^b		<i>F</i> ₅₁₃₆ = 18.992***	<i>F</i> ₅₁₃₆ = 1258.418***	<i>F</i> ₅₁₃₆ = 1.742 ns	<i>F</i> ₅₁₃₆ = 2.957*	<i>F</i> ₅₁₃₆ = 108.549***	
JO × KM	19	46.05 ± 2.22 a	99.91 ± 0.09 a	97.37 ± 0.96 a	89.54 ± 1.01 a	40.11 ± 2.06 a	
KM × JO	24	35.25 ± 1.69 b	99.44 ± 0.47 ab	97.27 ± 0.93 a	84.93 ± 0.87 b	29.00 ± 1.43 b	
(JO × KM) × JO	20	43.00 ± 1.19 a	98.53 ± 0.47 abc	91.51 ± 1.02 b	84.69 ± 0.86 b	32.90 ± 1.14 ab	
(JO × KM) × KM	19	43.79 ± 2.23 a	98.04 ± 0.48 c	92.09 ± 1.53 ab	83.78 ± 1.27 b	33.00 ± 1.72 ab	
(KM × JO) × KM	16	45.63 ± 2.21 a	98.49 ± 0.38 bc	89.68 ± 1.91 ab	81.42 ± 1.30 b	32.44 ± 1.30 ab	
(KM × JO) × JO	11	47.09 ± 2.26 a	98.37 ± 0.89 abc	94.08 ± 1.72 b	80.72 ± 1.88 b	35.00 ± 1.61 ab	
<i>F</i> -value ^b		<i>F</i> ₅₁₀₃ = 5.617***	<i>F</i> ₅₁₀₃ = 4.576**	<i>F</i> ₅₁₀₃ = 6.316***	<i>F</i> ₅₁₀₃ = 7.266***	<i>F</i> ₅₁₀₃ = 5.101***	

JO × SC	21	38.38 ± 1.82 c	99.77 ± 0.16	97.69 ± 0.86	89.63 ± 1.22 a	33.43 ± 1.63 b
SC × JO	28	51.82 ± 2.08 ab	99.00 ± 0.23	96.82 ± 0.98	90.34 ± 0.65 a	44.79 ± 1.84 a
(JO × SC) × JO	19	49.32 ± 1.21 ab	99.48 ± 0.21	97.39 ± 0.83	82.14 ± 1.30 b	39.32 ± 1.34 ab
(JO × SC) × SC	25	45.68 ± 1.53 bc	99.75 ± 0.14	94.01 ± 1.27	79.80 ± 1.28 b	34.32 ± 1.46 b
(SC × JO) × SC	26	47.12 ± 2.13 b	99.04 ± 0.32	97.86 ± 0.79	79.81 ± 1.30 b	36.50 ± 1.74 b
(SC × JO) × JO	28	55.46 ± 1.42 a	99.24 ± 0.41	98.36 ± 0.46	83.74 ± 0.83 b	45.29 ± 1.21 a
<i>F</i> -value ^b		<i>F</i> ₅₁₄₁ = 8.871***	<i>F</i> ₅₁₄₁ = 2.267 ns	<i>F</i> ₅₁₄₁ = 1.974 ns	<i>F</i> ₅₁₄₁ = 20.719***	<i>F</i> ₅₁₄₁ = 9.659***
JO × SV	13	40.08 ± 2.33 c	99.35 ± 0.28 ab	97.73 ± 0.98 a	92.65 ± 0.91 a	36.15 ± 2.23 b
SV × JO	16	52.50 ± 2.48 ab	99.63 ± 0.27 a	98.84 ± 0.41 a	87.57 ± 0.88 b	45.56 ± 2.46 a
(JO × SV) × JO	31	47.61 ± 1.61 ab	98.05 ± 0.52 b	98.24 ± 0.35 a	83.30 ± 0.87 c	38.29 ± 1.45 ab
(JO × SV) × SV	19	44.89 ± 1.84 bc	98.95 ± 0.36 ab	98.03 ± 0.56 a	83.61 ± 0.58 c	36.42 ± 1.53 b
(SV × JO) × SV	21	56.29 ± 1.35 a	99.78 ± 0.12 a	98.95 ± 0.67 a	81.80 ± 0.83 c	45.48 ± 1.26 a
(SV × JO) × JO	19	54.00 ± 1.03 a	99.61 ± 0.18 ab	99.70 ± 0.22 a	82.71 ± 0.70 c	44.42 ± 1.10 a
<i>F</i> -value ^b		<i>F</i> ₅₁₁₃ = 8.673***	<i>F</i> ₅₁₁₃ = 4.092**	<i>F</i> ₅₁₁₃ = 2.689*	<i>F</i> ₅₁₁₃ = 22.048***	<i>F</i> ₅₁₁₃ = 5.926***
JO × TW	15	40.80 ± 2.32 c	99.51 ± 0.27	94.75 ± 1.40 ab	90.51 ± 0.94 b	35.00 ± 2.23 c
TW × JO	12	43.25 ± 2.35 bc	98.95 ± 0.39	90.07 ± 1.98 b	91.00 ± 0.88 ab	34.83 ± 1.62 c
(JO × TW) × JO	27	48.30 ± 1.47 ab	99.61 ± 0.16	96.47 ± 1.06 a	93.13 ± 0.55 ab	43.19 ± 1.37 ab
(JO × TW) × TW	26	43.27 ± 1.46 bc	99.62 ± 0.18	96.35 ± 1.21 a	90.39 ± 0.71 b	37.38 ± 1.23 bc
(TW × JO) × TW	19	51.32 ± 1.05 a	99.28 ± 0.25	97.13 ± 1.28 a	92.88 ± 0.69 ab	45.89 ± 1.06 a
(TW × JO) × JO	24	50.17 ± 1.91 ab	99.49 ± 0.19	93.39 ± 1.37 ab	93.92 ± 0.65 a	43.96 ± 2.04 ab
<i>F</i> -value ^b		<i>F</i> ₅₁₁₇ = 5.658***	<i>F</i> ₅₁₁₇ = 1.034 ns	<i>F</i> ₅₁₁₇ = 3.281**	<i>F</i> ₅₁₁₇ = 5.034***	<i>F</i> ₅₁₁₇ = 8.134***

^aNumber of females tested.^bMean values differ significantly at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ (analysis of variance); ns, not significantly different at the 5% level. Data are shown as mean ± SE. Values in a column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ (Tukey's honestly significant difference test).

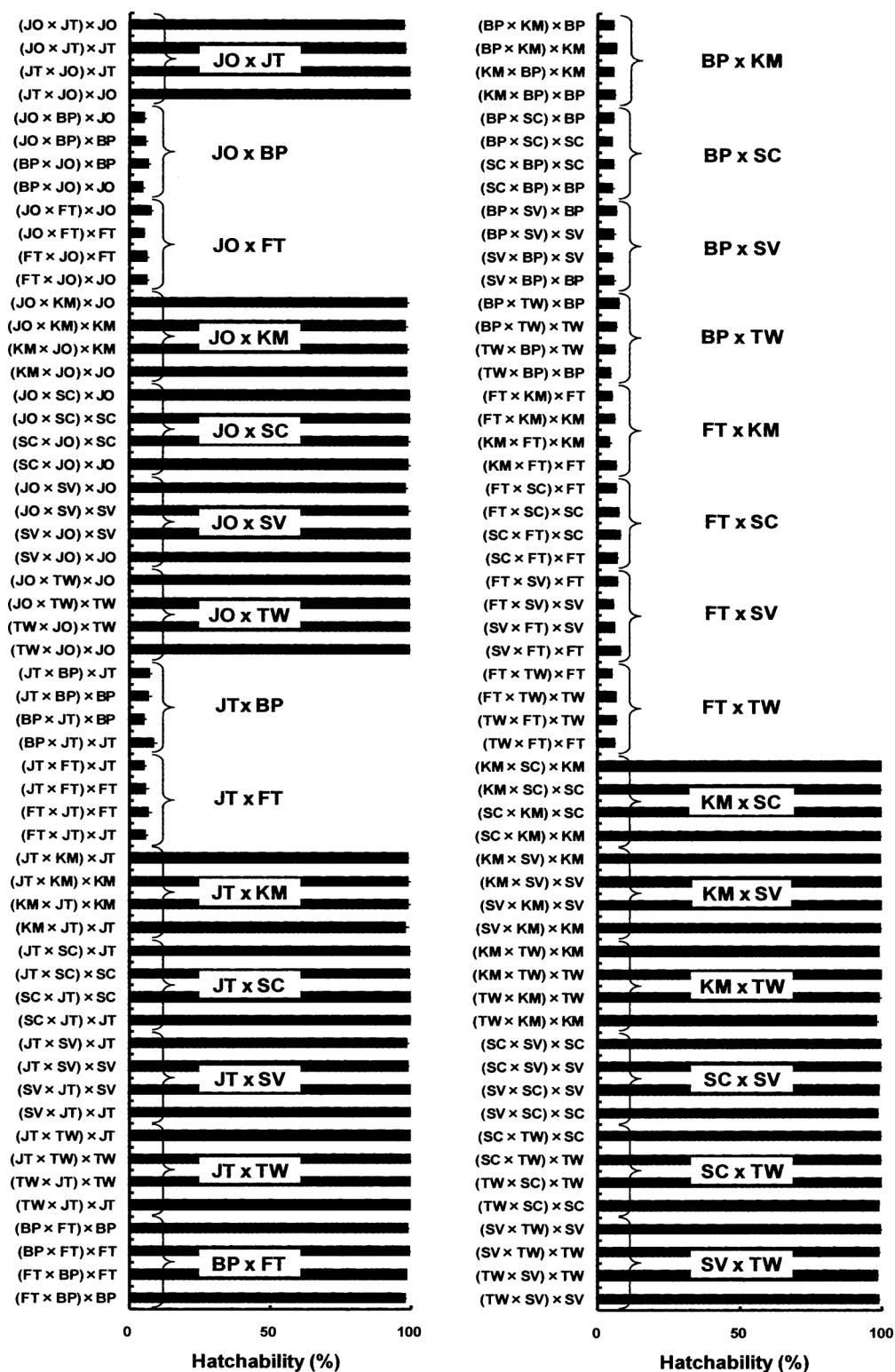


Fig. 1. Egg hatchability of B1 progenies from round-robin crosses between each of the two *Tetranychus takafujii* strains (JO and JT) and each of the six *Tetranychus evansi* strains (BP, FT, KM, SC, SV, and TW) at 25°C and under a 16 : 8 h light : dark photoperiod. Thin lines on tips of bars indicate standard errors.

Table 6. Compatibility of crosses between *Tetranychus evansi* BP and FT strains at 25°C and a 16 : 8 h light : dark photoperiod.

Cross						Average number of female offspring produced/female	
Female × Male	<i>n</i> ^a	No. of eggs/female	Hatchability (%)	Survival rate in immature stages (%)	Female offspring (%)		
BP × FT	23	37.48 ± 1.54 c	99.00 ± 0.33	97.48 ± 0.76	87.88 ± 0.80 b	31.87 ± 1.46 c	
FT × BP	31	39.45 ± 1.22 c	98.88 ± 0.35	94.50 ± 1.10	91.10 ± 0.83 a	33.68 ± 1.26 bc	
(BP × FT) × BP	22	63.50 ± 1.42 a	98.94 ± 0.25	97.59 ± 0.85	76.79 ± 0.62 d	47.09 ± 1.21 a	
(BP × FT) × FT	31	57.81 ± 1.46 a	99.60 ± 0.17	97.31 ± 0.68	75.43 ± 0.94 d	42.10 ± 1.03 a	
(FT × BP) × FT	19	46.32 ± 1.46 b	98.35 ± 0.56	97.04 ± 0.87	83.09 ± 0.78 c	36.74 ± 1.28 b	
(FT × BP) × BP	17	41.71 ± 1.20 bc	98.20 ± 0.74	95.75 ± 1.34	82.13 ± 1.23 c	32.12 ± 0.99 bc	
<i>F</i> -value ^b		<i>F</i> _{5,137} = 48.775***	<i>F</i> _{5,137} = 1.642 ns	<i>F</i> _{5,137} = 1.616 ns	<i>F</i> _{5,137} = 52.61***	<i>F</i> _{5,137} = 23.168***	

^aNumber of females tested.^bMean values differ significantly at ****P* < 0.001 (analysis of variance); ns, not significantly different at the 5% level. Data are shown as mean ± SE. Values in a column followed by different letters are significantly different at *P* < 0.05 (Tukey's honestly significant difference test).

In round-robin backcrosses, egg hatchability in *B*₁ progenies obtained from the crosses between either the *T. evansi* BP or FT strain and each of the other four strains of *T. evansi* and the two strains of *T. takafujii* (JO and JT) was less than 10%, while hatchability in *B*₁ progenies obtained from crosses among the latter six strains was more than 90% (Fig. 1). Hence, the two *T. takafujii* strains are reproductively compatible with the four *T. evansi* strains tested (KM, SC, SV, and TW) throughout two generations. Other parameter values in *B*₁ crosses were similar to the values in the intra-strain crosses with one exception: the (BP × KM) × BP cross had a lower offspring sex ratio (44.6%; data not shown).

Total egg number, hatchability, juvenile survival rate, and offspring sex ratio in crosses between the BP and FT strains were high in both *F*₁ and *B*₁ generations (Table 6), demonstrating that these two strains are reproductively compatible. To know whether the lower egg hatchability observed in the *B*₁ generation was improved in the *B*₂ generation, we performed *B*₂ generation crosses between the JO and FT strains and between the FT and SV strains. As shown in Table 7, hatchability in all *B*₂ combinations was clearly increased (>29%) when compared with the hatchability in *B*₁ combinations (ANOVA, JO × FT: *F*_{11,315} = 17.685, *P* < 0.001; FT × SV: *F*_{11,301} = 12.041, *P* < 0.001), although the daughter ratio was reduced in some crosses [e.g. (FT × JO × JO) × FT and (FT × SV × SV) × FT]. These results suggest that the BP and FT strains are heterospecific from neither the other four *T. evansi* strains, nor the two *T. takafujii* strains.

Morphological analysis – The three empodia II types mentioned in the Material and Methods section and examined in all samples are presented in Fig. 2. The occurrence of these three types in specimens of the eight mite populations examined is presented in Table 8. In some cases differences were observed between two legs of the same individual (see Fig. 3) as previously described by Ehara and Masaki (2005). Such dissymmetry can reach high proportions, as found in 6/14 (43%) of the KM and 5/14 (36%) of the JO samples (Table 8). When comparing the occurrence of the three types of empodia II, type 3 (*takafujii* B), i.e. three pairs of proximoventral hairs, appeared at a high frequency in the JT and JO Japanese (*T. takafujii*) and TW Taiwanese (*T. evansi*) samples. But type 3 is also found in other populations (SV, KM, and SC). The three types of empodia were found in the FT and BP samples. Type 2 was found in all populations. Type 1 was found only in FT (at high frequency), SC and SV samples. Discrimination of the Japanese populations was impossible based on the empodium II shape.

DISCUSSION

Whereas there has been considerable debate in the literature concerning the most appropriate criteria for species definition, it is now well recognized that an integrative approach gathering morphological and other sorts of biological data will be necessary for systematic studies, especially when addressing co-specificity between taxa (Navajas and Roderick, 2008). Using a

Table 7. Compatibility of F_3 progenies from reciprocal crosses between the *Tetranychus takafujii* JO and *Tetranychus evansi* FT strains and between the *T. evansi* FT and SV strains at 25°C and a 16 : 8 light : dark photoperiod.

Cross			n ^a	No. of eggs/female	Hatchability (%)	Survival rate in immature stages (%)	Female offspring (%)	Average number of female offspring produced/female
Female × Male								
(JO × FT × JO) × JO	JO	26	48.27 ± 1.84 ab	44.62 ± 5.61	90.16 ± 2.58	77.37 ± 3.35 ab	15.23 ± 2.16 a	
(JO × FT × JO) × FT	FT	25	47.80 ± 2.28 abc	34.41 ± 5.46	97.36 ± 1.43	64.96 ± 3.20 cd	10.61 ± 1.41 ab	
(JO × FT × FT) × JO	JO	24	44.96 ± 1.98 abc	40.44 ± 5.14	97.40 ± 1.05	86.94 ± 2.68 a	15.29 ± 2.04 a	
(JO × FT × FT) × FT	FT	23	51.26 ± 1.45 ab	43.58 ± 5.44	96.03 ± 2.19	75.39 ± 2.61 abc	16.39 ± 2.43 a	
(FT × JO × FT) × FT	FT	28	52.32 ± 1.18 a	45.01 ± 5.78	98.76 ± 0.50	69.30 ± 2.54 bc	15.54 ± 2.05 a	
(FT × JO × FT) × JO	JO	29	51.62 ± 1.30 a	39.13 ± 5.50	99.05 ± 0.71	73.14 ± 2.48 abc	15.38 ± 2.51 a	
(FT × JO × JO) × FT	FT	20	40.25 ± 2.16 c	29.45 ± 4.91	98.66 ± 0.65	49.14 ± 4.65 d	6.17 ± 1.02 b	
(FT × JO × JO) × JO	JO	28	43.79 ± 2.06 bc	39.96 ± 5.64	96.56 ± 0.96	75.64 ± 2.84 abc	12.59 ± 1.88 ab	
F-value ²			F ₇₁₉₉ = 5.328***	F ₇₁₉₉ = 1.045 ns	F ₇₁₉₉ = 1.926 ns	F ₇₁₉₉ = 9.940***	F ₇₁₉₉ = 4.910***	
(FT × SV × FT) × FT	FT	22	45.77 ± 1.43 bc	41.38 ± 6.37	98.60 ± 0.67	67.04 ± 4.48 c	13.33 ± 2.06 a	
(FT × SV × FT) × SV	SV	27	48.74 ± 1.80 bc	39.05 ± 5.40	97.49 ± 0.94	89.22 ± 2.32 a	15.30 ± 1.92 a	
(FT × SV × SV) × FT	FT	14	43.00 ± 2.41 c	30.40 ± 5.00	94.53 ± 2.74	37.29 ± 8.25 d	4.00 ± 1.03 b	
(FT × SV × SV) × SV	SV	27	44.26 ± 1.76 c	38.36 ± 5.38	97.90 ± 0.82	67.60 ± 3.83 bc	10.33 ± 1.44 a	
(SV × FT × SV) × SV	SV	28	51.86 ± 1.35 ab	39.17 ± 5.10	98.74 ± 0.61	67.90 ± 3.59 abc	15.96 ± 2.19 a	
(SV × FT × SV) × FT	FT	30	57.23 ± 1.37 a	33.28 ± 5.26	98.15 ± 0.99	64.41 ± 3.80 c	12.17 ± 2.04 a	
(SV × FT × FT) × SV	SV	29	52.72 ± 0.99 ab	29.80 ± 3.67	97.87 ± 0.89	87.35 ± 1.81 ab	13.21 ± 1.63 a	
(SV × FT × FT) × FT	FT	31	51.10 ± 1.36 ab	38.16 ± 5.75	95.93 ± 1.35	72.17 ± 3.39 bc	13.03 ± 1.70 a	
F-value ^b			F ₇₂₀₀ = 8.506***	F ₇₁₉₉ = 0.532 ns	F ₇₂₀₀ = 1.204 ns	F ₇₂₀₀ = 10.427***	F ₇₂₀₀ = 4.011***	

^aNumber of females tested.

^bMean values differ significantly at *** $P < 0.001$ (analysis of variance); ns, not significantly different at the 5% level. Data are shown as mean ± SE. Values in a column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ (Tukey's honestly significant difference test).

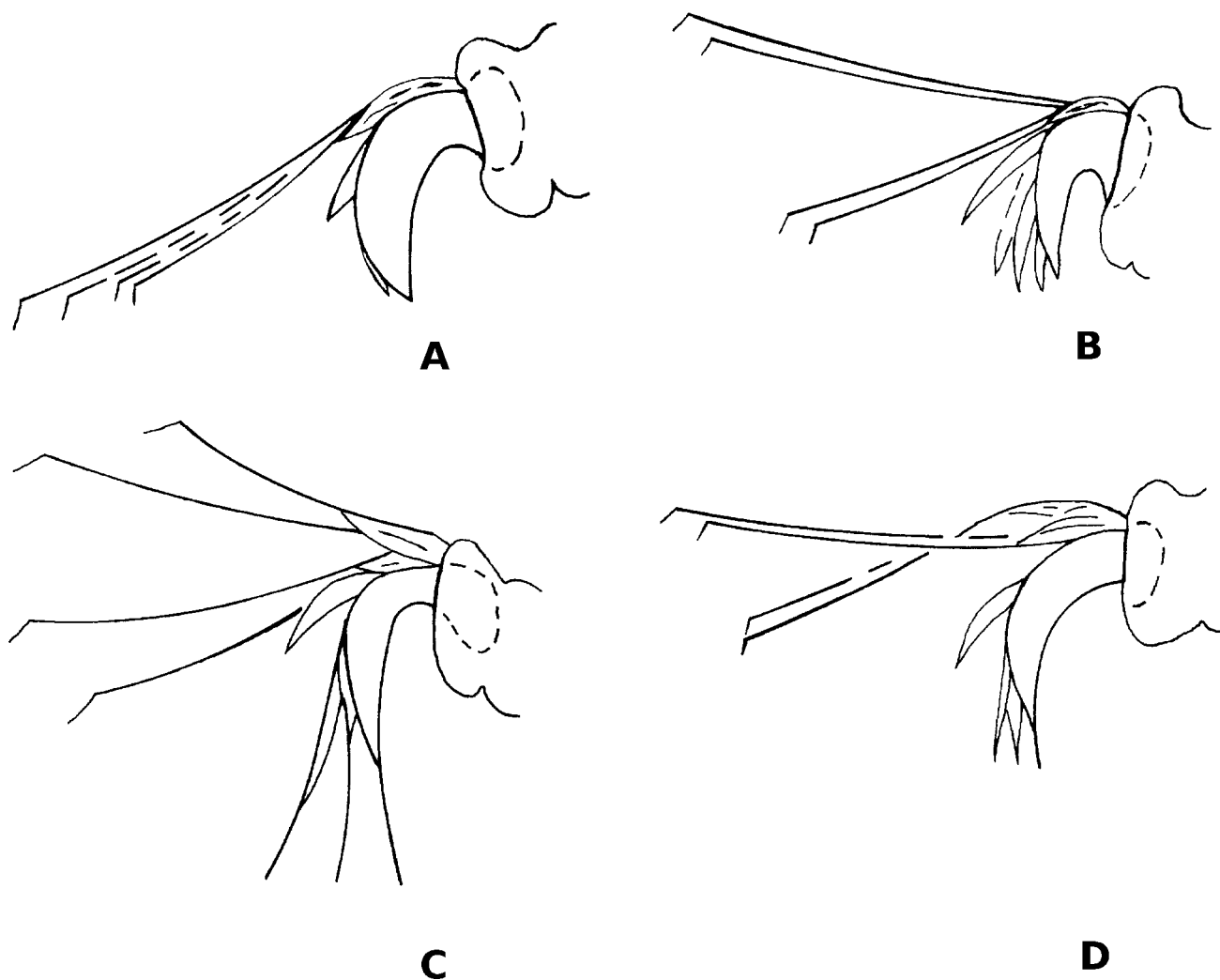


Fig. 2. Variability of male leg II empodia of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus takafujii* specimens. Types of empodia as defined in Ehara and Masaki (2005). Origin and abbreviation of sample are given in parentheses – A. type 1 (Spain, SV); B. type 2 (Brazil, BP); C. type 3 (Japan, JT); D. type 2 with long claws (Taiwan, TW).

combination of DNA-based and reproductive analysis together with morphological criteria, we obtained data that strongly support the taxonomical status of *T. takafujii* Ehara and Ohashi, 2002 as a junior synonym of *T. evansi* Baker and Pritchard, 1960. DNA sequences of the ITS and *COI* regions consistently divided the samples examined in this study into two groups. One group (I) contains the mites collected in Brazil (BP) and France (FT) and a second group (II) contains the remaining samples of *T. evansi* together with the two samples collected in Japan (JT and JO). Likewise, cross-breeding experiments detected two reproductively partially incompatible groups that are congruent with the two types of DNA sequences described as groups I and II. Again, the JO

and JT samples are completely compatible with the rest of group II *T. evansi* samples. Finally, the morphological analysis used here as a third approach to address species identity, did not pinpoint any clear criteria in the shape of the empodium II that were useful to discern between *T. evansi* and *T. takafujii*, but rather highlighted the variability of the pattern, questioning the utility of the sole use of this character to discriminate between the two taxa.

Whereas the three approaches investigated here provide congruent evidence for the co-specificity of samples, sequence analysis distinguished two groups among the *T. evansi* samples which, in addition, showed strong incompatibilities when mites belonging to group I and those of group II were cross-bred.

Table 8. Occurrence of three types of the empodium II in two *Tetranychus takafujii* and six *Tetranychus evansi* strains. The number of examined specimens (*N*) is indicated for each sample.

Locality	Sample abbreviation	Type 1	Type 2	Type 3	Type 1 + 2	Type 1 + 3	Type 2 + 3	<i>N</i>
Japan (Tokyo)	JT	0	2	8	0	0	4	14
Japan (Osaka)	JO	0	4	5	0	0	5	14
Taiwan (Wufeng)	TW	0	1	11	0	0	3	15
Kenya (Mwea)	KM	0	7	1	0	0	6	14
Canary Is. (Tenerife)	SC	1	8	0	3	1	2	15
Spain (Valencia)	SV	4	9	0	1	0	1	15
Brazil (Piracicaba)	BP	0	13	0	1	0	0	14
France (Torreilles)	FT	10	2	0	2	0	0	14

Types of empodia according to the categories by Ehara and Masaki (2005).

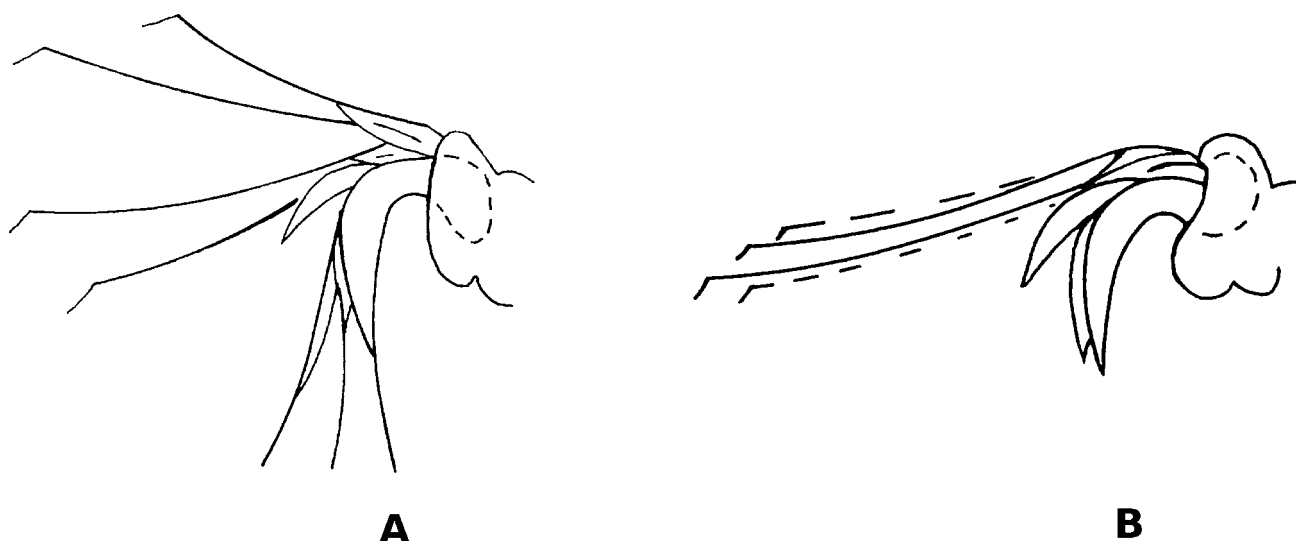


Fig. 3. Two types of leg II empodia found in a single male specimen (sample from Japan, Tokyo) – A. type 3; B. type 2.

However, reproductive incompatibilities are common in spider mites, even among conspecific strains, and have been observed for several species (de Boer, 1981; Fry, 1989; Gotoh and Higo, 1997; Navajas *et al.*, 1999; Perrot-Minnot *et al.*, 2004; Gotoh *et al.*, 2005; Suwa and Gotoh, 2006). Such incompatibilities, revealed by cross-breeding experiments, might be expressed in different ways. In the case of *Amphitetranychus viennensis* (Zacher) for example, incompatibility was revealed by a high mortality of hybrid eggs in the F_1 generation and a higher egg hatchability in the B_2 (F_2) generation than in the F_1 generation (Helle and Pieterse, 1965; de Boer, 1981; Navajas *et al.*, 1999). In *T. pueraricola*, incompatibility was shown by high egg mortality in the B_1 generation even though it was not

observed in the F_1 generation (Suwa and Gotoh, 2006). As reported in *T. pueraricola* populations, reproductive incompatibility in *T. evansi* strains became apparent in the B_1 generation but not in the F_1 generation that showed high egg hatchability. Whereas incompatibility among *T. pueraricola* populations was significantly correlated with the geographical distance between the samples' origin area, in the case of *T. evansi*, which is an invasive species, mite dispersion all around the world is facilitated by human activities, like trade in plant material. It can therefore be misleading to link the degree of incompatibility to the geographical distance between the parental strains of *T. evansi*. However, the DNA sequences clearly separate mites from groups I and II with a nucleotide

divergence ranging from 0% to 0.18% for the ITS and from 0.12% to 2.96% for the *COI*. These figures fall in the range of intraspecific divergence previously detected for other Tetranychidae mites. For example, samples from South America and Africa of the invasive cassava green mite *Mononychellus progresivus* Doreste, diverged in a range of 0% to 0.4% for the ITS2 (803 bp) and of 0% to 2.1% for *COI* (334 bp) (Navajas *et al.*, 1994). Likewise, sequence analysis of *A. viennensis* samples consistently separated mites from France and Japan by 3.8–4.1% nucleotide divergence in the *COI* (350 bp) and by 2.1% for the ITS2 (445 bp) sequences (Navajas *et al.*, 1999). Such uneven and sometimes wide ranging DNA sequence divergence between specimens of the same species, illustrates the need for an integrative taxonomy to be used when species identity is questioned.

A more comprehensive study of *T. evansi* would be necessary to assess the genetic and morphological intraspecific variations uncovered in this study. This issue is addressed in an ongoing study, which examines specimens from different continents. The recognition of the two different groups of mitochondrial haplotypes detected among the *T. evansi* samples examined is of special relevance to the study of this highly invasive species, which is an important pest of solanaceous crops (Migeon *et al.*, 2009). As for many other invasive arthropod pests (Miller *et al.*, 2005; de Barro *et al.*, 2008), the detection of different mitochondrial haplotypes allows us to follow invasion pathways and to retrace the origin of intruders to a precise country or geographical region. Mite occurrence in Japan appears to be linked to port activities. Being restricted first to Osaka and Tokyo and their surroundings and more recently to Kagoshima and Fukuoka, the presence of *T. evansi* seems to result from accidental introductions to the country related to human activities. According to our results, *T. evansi* may have been accidentally introduced into Japan from several potential sources in Taiwan, Kenya, Spain, or other Mediterranean countries, because mites in all these regions carry the same mitochondrial haplotype, share the same morphological traits, and show complete inter-fertility with mites in Japan.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Pr. Carlos H. W. Flechtmann for suggesting these investigations. We are also grateful to K. Ohashi and Y. Kitashima (Japan), A. Pallini (Brazil), M. Knapp (Kenya), E. Hernandez Suarez (Spain), and C.-C. Ho (Taiwan) for kindly collecting mites and to P. Auger (France) for his advice and help in the morphological study. This work was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific

Research (B) (no. 19380032) from Japan Society for the Promotion of Science and by the Project for Agricultural Technology in the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries of Japan (no. 18057).

REFERENCES

- Baker, E. W. and A. E. Pritchard. 1960. The tetranychoid mites of Africa. *Hilgardia* 29: 455–574.
- Ben-Ali, Z., P. Boursot, K. Said, J. Lagnel, N. Chatti and M. Navajas. 2000. Comparison of ribosomal ITS regions among *Androctonus* spp. scorpions (Scorpionida: Buthidae) from Tunisia. *J. Med. Entomol.* 37: 787–790.
- Bolland, H. R., J. Gutierrez and C. H. W. Flechtmann. 1998. *World Catalogue of the Spider Mite Family (Acari: Tetranychidae)*. Brill Academic Publisher, Leiden. 392 pp.
- de Barro, P. J., S. H. Hidayat, D. Frohlich, S. Subandiyah and S. Ueda. 2008. A virus and its vector, pepper yellow leaf curl virus and *Bemisia tabaci*, two new invaders of Indonesia. *Biol. Invasions* 10: 411–433.
- de Boer, R. 1981. Genetic affinities between spider mite *Tetranychus urticae* populations in a non-agricultural area II. *Entomol. Exp. Appl.* 30: 63–67.
- de Moraes, G. J., J. A. McMurtry and E. W. Baker. 1987. Redescription and distribution of the spider mites *Tetranychus evansi* and *T. marianae*. *Acarologia* 28: 333–343.
- Ehara, S. and M. Masaki. 2005. Identity of *Tetranychus takafujii* Ehara and Ohashi (Acari: Tetranychidae). *J. Acarol. Soc. Japan* 14: 123–125.
- Ehara, S. and K. Ohashi. 2002. A new species of *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae) from the Kinki district, Japan. *Acta Arachnologica* 51: 19–22.
- Flechtmann, C. H. W. and D. K. Knihinicki. 2002. New species and new record of *Tetranychus* Dufour from Australia, with a key to the major groups in this genus based on females (Acari: Prostigmata: Tetranychidae). *Aust. J. Entomol.* 41: 118–127.
- Fry, J. D. 1989. Nuclear–nuclear and nuclear–cytoplasmic interactions contribute to the reproductive incompatibility between two strains of two-spotted spider mite. *Entomol. Exp. Appl.* 50: 97–100.
- Gotoh, T., J. Gutierrez and M. Navajas. 1998. Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara & Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Sci.* 1: 55–57.
- Gotoh, T. and Y. Higo. 1997. Differences in host range and reproductive compatibility among populations of *Panonychus mori* Yokoyama

- (Acari: Tetranychidae). *Internat. J. Acarol.* 23: 119–125.
- Gotoh, T., H. Noda, T. Fujita, K. Iwadate, Y. Higo, S. Saito and S. Ohtsuka. 2005. *Wolbachia* and nuclear–nuclear interactions contribute to reproductive incompatibility in the spider mite *Panonychus mori* (Acari: Tetranychidae). *Heredity* 94: 237–246.
- Gotoh, T., H. Noda and X.-Y. Hong. 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity* 91: 208–216.
- Gotoh, T., H. Noda and S. Ito. 2007. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity* 98: 13–20.
- Helle, W. and A. H. Pieterse. 1965. Genetic affinities between adjacent populations of spider mites (*Tetranychus urticae* Koch). *Entomol. Exp. Appl.* 8: 305–308.
- Hinomoto, N., D. P. Tran, A. T. Pham, T. B. N. Le, R. Tajima, K. Ohashi, M. Osakabe and A. Takafuji. 2007. Identification of spider mites (Acari: Tetranychidae) by DNA sequences: a case study in Northern Vietnam. *Int. J. Acarol.* 33: 53–60.
- Holden, P. R., J. F. Y. Brookfield and P. Jones. 1993. Cloning and characterization of an *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 240: 213–220.
- Hurtado Ruiz, M., S. Cros-Arteil, T. Ansaloni, J. A. Jacas Miret and M. Navajas. 2006. Molecular discrimination of Tetranychidae mite species present in citrus orchards in Eastern Spain. *Bull. OILB/SROP.* 29: 139.
- Jeppson, L. R., H. H. Keifer and E. W. Baker. 1975. *Mites Injurious to Economic Plants*. University of California Press, Berkeley, CA. xxiv + 614 pp.
- Migeon, A. and F. Dorkel. 2006. Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae [Internet]. CBGP INRA, France [cited 2009 Mar 6]. 2006–2009. Available from: <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>
- Migeon, A., F. Ferragut, L. A. Escudero-Colomar, K. Fiaboe, M. Knapp, G. J. de Moraes, E. Uecker-mann and M. Navajas. 2009. Modelling the potential distribution of the invasive tomato red spider mite: *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 48: 199–212.
- Miller, N., A. Estoup, S. Toepfer, D. Bourguet, L. Lapchin, S. Derridj, K. S. Kim, P. Reynaud, L. Furlan and T. Guillemaud. 2005. Multiple transatlantic introductions of the western corn root-worm. *Science* 310: 992–992.
- Muraji, M., K. Kawasaki and T. Shimizu. 2000. Phylogenetic utility of nucleotide sequences of mitochondrial 16S ribosomal RNA and cytochrome b genes in anthocorid bugs (Heteroptera: Anthocoridae). *Appl. Entomol. Zool.* 35: 293–300.
- Navajas, M. and B. Fenton. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol.* 24: 751–774.
- Navajas, M., J. Gutierrez, O. Bonato, H. R. Bolland and S. Mapangou-Divassa. 1994. Intraspecific diversity of the Cassava Green Mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp. Appl. Acarol.* 18: 351–360.
- Navajas, M., J. Gutierrez and J. Lagnel. 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., J. Gutierrez, J. Lagnel, G. Fauvel and T. Gotoh. 1999. DNA sequences and cross-breeding experiments in the hawthorn spider mite *Amphitetanychus viennensis* reveal high genetic differentiation between Japanese and French populations. *Entomol. Exp. Appl.* 90: 113–122.
- Navajas, M., J. Gutierrez, M. Williams and T. Gotoh. 2001. Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangeae* (Acari: Tetranychidae), shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments. *Bull. Entomol. Res.* 91: 117–123.
- Navajas, M. and G. K. Roderick. 2008. Molecular diagnostics. pp. 191–196. *In*: Capinera, J. L. (Ed.). *Encyclopedia of Entomology*. Springer, New York.
- Navia, D., G. de Moraes, G. K. Roderick and M. Navajas. 2005. The invasive coconut mite, *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and ribosomal (ITS) sequences. *Bull. Entomol. Res.* 95: 505–516.
- O'Neill, S. L., R. Giordano, A. M. E. Colbert, T. L. Karr and H. M. Robertson. 1992. 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2699–2702.
- Perrot-Minnot, M. J., A. Migeon and M. Navajas. 2004. Intergenomic interactions affect female reproduction: evidence from introgression and inbreeding depression in a haplodiploid mite. *Heredity* 93: 551–558.

- Pritchard, A. E. and E. W. Baker. 1955. A Revision of the Spider Mite Family Tetranychidae. Pacific Coast Entomological Society, San Francisco. 472 pp.
- Savolainen, V., R. S. Cowan, A. P. Vogler, G. K. Roderick and R. Lane. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 360: 1805–1811.
- Silva, P. 1954. Um novo àcaro nocivo ao tomateiro na Bahia. *Bol. Inst. Biol. Bahia.* 1: 1–20.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651–701.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1995. *Biometry*. 3rd ed. W.H. Freeman & Company, New York. 887 pp.
- SPSS. 2002. *SPSS 11.5J Brief Guide* (in Japanese). SPSS Inc., Tokyo. 160 pp.
- Suwa, A. and T. Gotoh. 2006. Geographic variation in diapause induction and mode of diapause inheritance in *Tetranychus pueraricola*. *J. Appl. Entomol.* 130: 329–335.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Tsagkarakou, A., S. Cros-Arteil and M. Navajas. 2007. First record of the invasive mite *Tetranychus evansi* in Greece. *Phytoparasitica* 35: 519–522.
- Wauthy, G., M. I. Noti, M. Leponce and V. Bauchau. 1998. Taxonomy and variations of leg setae and solenidia in *Tetranychus urticae* (Acari, Prostigmata). *Acarologia* 39: 233–255.
- Zhang, Z. Q. and R. J. Jacobson. 2000. Using adult female morphological characters for differentiating *Tetranychus urticae* complex (Acari: Tetranychidae) from greenhouse tomato crops in UK. *Syst. Appl. Acarol.* 5: 69–76.

Chapitre III

III Marqueurs moléculaires et description de la variabilité génétique au sein des populations de *Tetranychus evansi*

III.1 Choix des marqueurs moléculaires

Le choix des marqueurs génétiques présentant le niveau de variabilité adéquat pour le niveau de résolution souhaité (niveau spécifique, populationnel) est un préalable à toute étude de la variabilité génétique. Nous avons utilisé dans cette thèse, trois types de marqueurs :

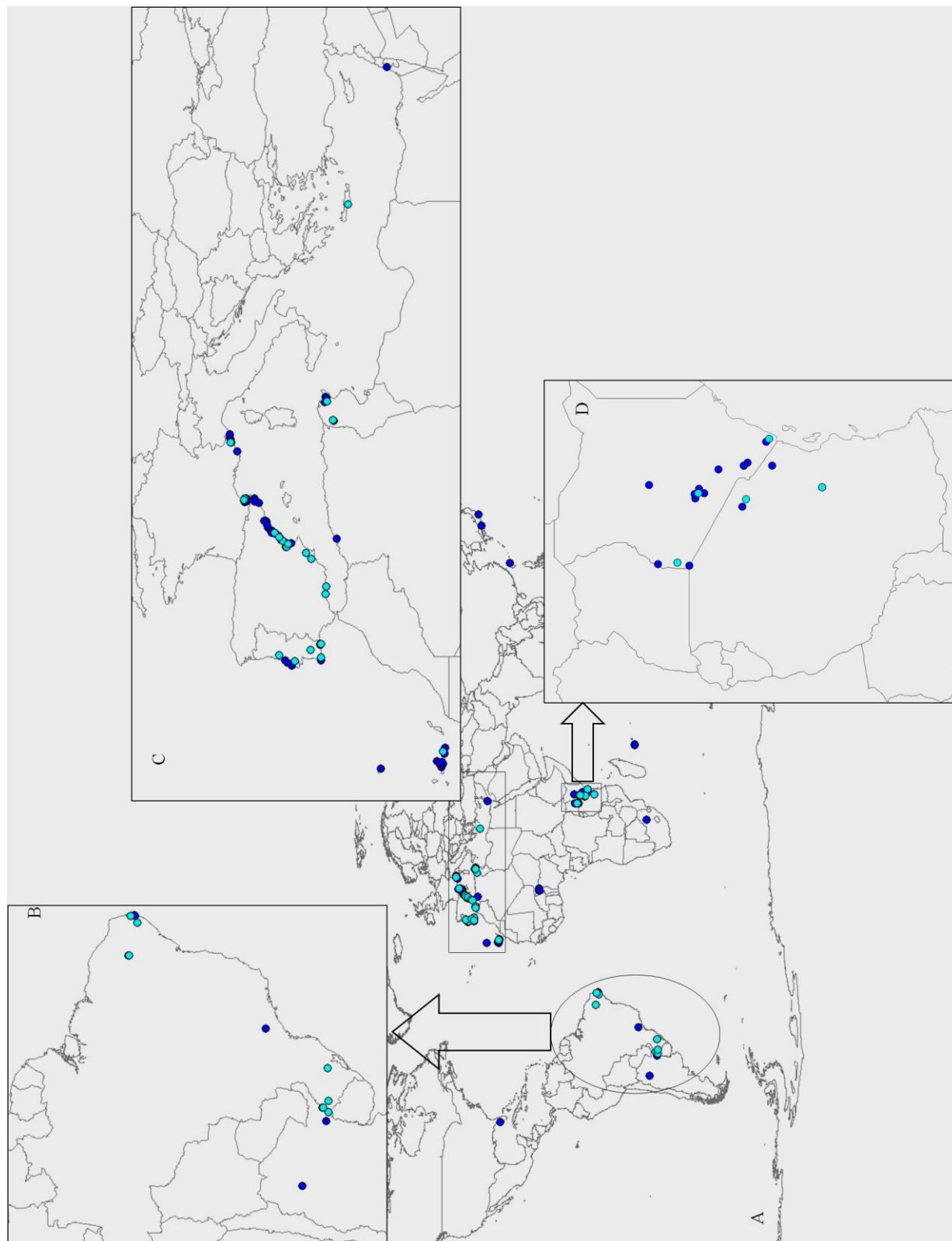
- Un fragment de 868 paires de base (pb), du gène codant pour la Cytochrome Oxydase sous-unité I (*COI*) de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ;
- Les régions Internal Transcribed Spacer non codantes (ITS), 1137 pb, de l'ADN nucléaire ribosomal (ADNr) ;
- 16 locus microsatellites ont été isolés et caractérisés lors de cette thèse et sont présentés dans un article à la fin de ce chapitre.

L'utilisation de 3 marqueurs moléculaires se différenciant par leurs propriétés (leur organisation génomique, le taux d'évolution et le mode de transmission) a permis de collecter des informations complémentaires sur la structure des populations de *T. evansi* et le processus d'invasion étudié.

L'ADNmt est très informatif dans le cas de multiples sources d'invasions (Grapputo *et al.*, 2005; Kolbe *et al.*, 2004; Mabuchi *et al.*, 2008; Roman, 2006; Voisin *et al.*, 2005), il est toutefois soumis à une forte dérive génétique (à cause de son hérédité maternelle et de son haploïdie) au cours de la colonisation, ce qui peut engendrer une perte de la variabilité génétique (Ballard, Whitlock, 2004; Davies *et al.*, 1999; Villablanca *et al.*, 1998). De plus, à cause de son hérédité maternelle et l'absence de recombinaison (mais voir Barr *et al.*, 2005; Lunt, Hyman, 1997; Rokas *et al.*, 2003), l'ADNmt ne permet pas de détecter d'éventuels cas d'hybridation ou d'introgession. L'utilisation de marqueurs nucléaires diploïdes et à transmission biparentale est complémentaire pour appréhender la structuration de la variabilité génétique de l'espèce.

Nous avons choisi deux types de marqueurs nucléaires (microsatellites et ITS). Les microsatellites sont des marqueurs nucléaires codominants, présentant un taux de mutation élevé (Estoup, Angers, 1998; Jarne, Lagoda, 1996).

Figure 17. A : Localisation des échantillons de *Tetranychus evansi* analysés. Trois régions ont été élargies, B : Amérique du Sud, C : région méditerranéenne et D : Afrique de l'est. Les échantillons génotypés à la fois par loci microsatellites et les séquences *COI* sont indiqués en bleu clair.



Grâce à ces propriétés, ils constituent des marqueurs nucléaires puissants utilisés actuellement couramment dans les études de génétique des populations. Ils se sont avérés utiles pour l'étude d'invasions biologiques et pour l'identification des routes de colonisation (Ciosi *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 1999; Lozier *et al.*, 2009; Nardi *et al.*, 2005).

Un intérêt supplémentaire de l'utilisation des séquences ITS est son efficacité comme outil de diagnostic des espèces dans le genre *Tetranychus* (Ben-David *et al.*, 2007; Navajas, Fenton, 2000). Nous savions que la présence d'espèces cryptiques pouvait constituer un problème auquel nous pourrions être confrontés.

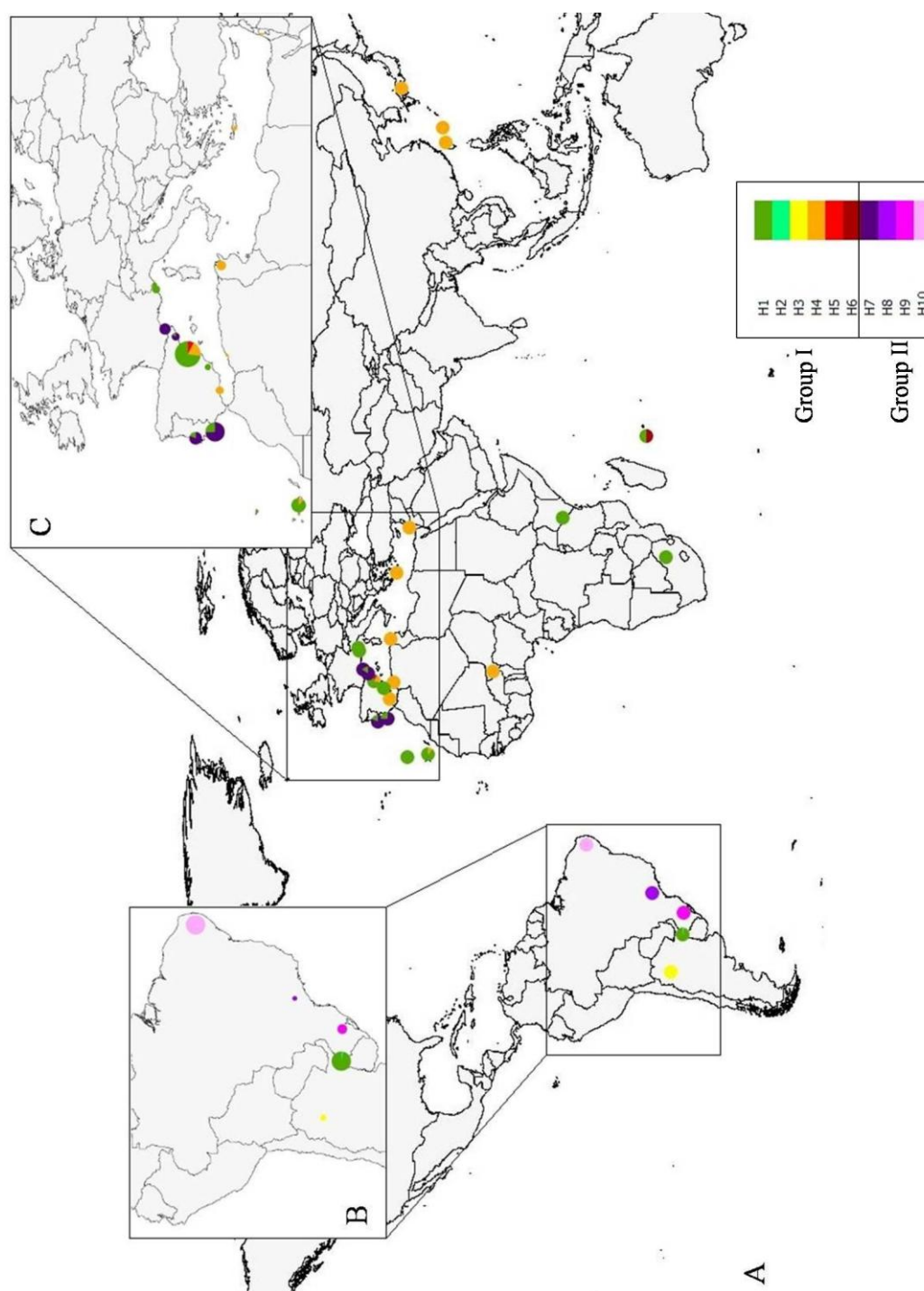
III.2 Matériel biologique

Un total de 112 localités a été échantillonné entre 2004 et 2008 dans l'aire de distribution actuelle de *T. evansi*, en Amérique du Sud (Brésil et Argentine), Amérique du Nord (Floride), Afrique (Afrique du Sud, Kenya, Tanzanie, Niger, Algérie et Tunisie), Europe (Grèce, Italie, France, Espagne et Portugal), Proche-Orient (Israël) et Asie (Taiwan et Japon). Vu l'importance économique que cet acarien représente pour la région méditerranéenne, un effort particulier d'échantillonnage a été consacré à cette région avec un total de 73 localités échantillonnées (Figure 17). La majorité des localités méditerranéennes (66) et sud américaines (10) a été échantillonnée par notre équipe pendant ma thèse et pour le reste, nous nous sommes appuyés sur notre réseau de collaborateurs¹. Les acariens de chaque échantillon ont été conservés dans de l'éthanol absolu à -20 ° C pour les analyses de biologie moléculaire. Quelques individus de chaque échantillon ont été conservés dans de l'éthanol à 70% pour une vérification de l'espèce sur des critères morphologique décrits dans le chapitre II. Les échantillons ont été prélevés dans différents habitats : sur des plantes cultivées (cultures sous serres et en plein champ) ou sauvages (adventice en bordure des champs ou en terrains vagues).

Une fois les trois types de marqueurs mis au point chez *T. evansi*, nous les avons utilisés pour analyser la variation génétique chez les populations de cet acarien.

¹ Les coordonnées des échantillons sont détaillées dans Supplementary Table I dans l'article III « chapitre IV ». De plus, 2 individus supplémentaires de Floride ont été séquencés avec ITS.

Figure 18. A : Distribution et fréquences des haplotypes mitochondriaux (*COI*) dans les localités analysées. Chacun des 10 haplotypes identifiés est indiqué par une couleur différente. Ces haplotypes se regroupent en 2 clades (I et II) selon les analyses présentées dans la figure 19. Plusieurs localités ont été regroupées ensemble sur la base de la proximité géographique, B : en Amérique du Sud et C : dans la région méditerranéenne.



III.3 Description de la variabilité génétique populationnelle

III.3.1 Description de la diversité génétique des séquences *COI*

Des séquences *COI* de 868 pb ont été analysées chez 298 individus collectés dans l'aire de distribution actuelle de *T. evansi*. Dix haplotypes mitochondriaux distincts ont été identifiés avec 29 sites variables. Les trois haplotypes (H1, H4 et H7) majoritaires sont largement distribués dans la zone géographique échantillonnée (Figure 18). Alors que les autres (H2, H3, H5, H6, H8, H9 et H10) ont été observés dans une seule localité. L'haplotype H1 est le plus répandu et partagé par l'Amérique du Sud (Argentine et sud-ouest du Brésil), l'Afrique et l'Europe. Les deux autres haplotypes les plus fréquents, H4 et H7, ont été seulement observés dans l'aire d'introduction : H4 a une large distribution géographique incluant l'Afrique, l'Europe et l'Asie, alors que H7 est présent dans trois pays européens (Portugal, sud de la France et la majorité des localités du nord est de l'Espagne). La majorité des localités ont fixé un seul haplotype. Deux haplotypes ont été détectés dans les localités du sud-ouest du Brésil (Uruguaiana), au Portugal (Castanheira do Ribatejo) et à La Réunion et trois en Espagne (à Valencia).

La diversité génétique des séquences *COI* la plus élevée a été observée en Amérique du Sud avec 6 haplotypes mitochondriaux ($h = 0,685 \pm 0,031$ et $\pi = 0,0137 \pm 0,0004$, diversité haplotypique et nucléotidique $\pm$ écart type, respectivement) détectés parmi les 10 ayant été identifiés.

La région méditerranéenne est la région présentant la plus forte diversité, parmi les zones envahies, avec 4 haplotypes présents et un niveau de diversité génétique similaire à celui de l'Amérique du Sud ($h = 0,642 \pm 0,020$ et $\pi = 0,0122 \pm 0,0008$, diversité haplotypique et nucléotidique, respectivement).

L'arbre de Neighbour-Joining reconstruit à partir des séquences *COI* sépare clairement les échantillons en deux clades fortement soutenus (100 % valeur de bootstrap ; Figure 19) :

- Le premier clade (**Clade I**) contient 6 haplotypes (H1, H2, H3, H4, H5, H6) et regroupe tous les échantillons collectés en Asie, Afrique, Europe [à l'exception des échantillons de la région Catalogne (française et espagnole) et du Portugal] et en Amérique du Sud (extrême sud brésilien et Argentine).
- Le deuxième clade (**Clade II**) comprend 4 haplotypes (H7, H8, H9, H10) et inclut des échantillons brésiliens collectés dans le sud-est jusqu'à la région nord-est et

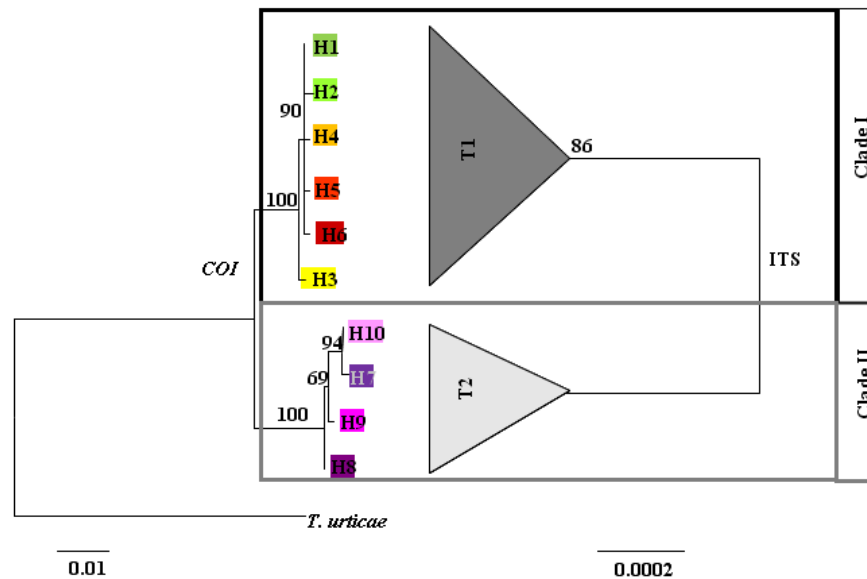


Figure 19. Relations phylogénétiques inférées par la méthode de Neighbour-Joining sur la base des séquences *COI* (à gauche) et des séquences ITS ribosomiques (à droite). Les valeurs de bootstrap sont indiquées sur toutes les branches. *Tetranychus urticae* a été utilisé comme un outgroup pour enraciner l'arbre des séquences *COI*. Les codes des couleurs correspondent aux haplotypes *COI* indiqués dans la figure 18. Deux types majoritaires de séquences ITS ont été identifiés (T1 et T2).

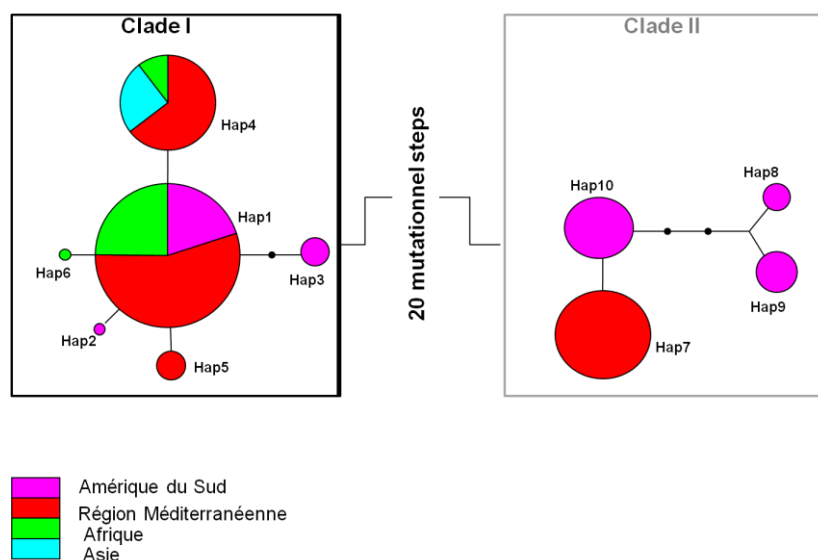


Figure 20. Réseau d'haplotypes mitochondriaux obtenu pour les 298 individus analysés. L'analyse a été réalisée sur les séquences *COI* (868 pb). Les relations supposées entre les haplotypes sont présentées par : de lignes représentant une seule mutation et de petits cercles noirs représentant un haplotype non observé. La taille des disques est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype concerné.

certaines échantillons européens localisés dans deux régions : 1) sud de la France, et nord-est de l'Espagne et 2) une partie des localités du Portugal.

Ces deux clades ont été également clairement identifiés dans le réseau d'haplotypes (Figure 20). Ils ont fixé 20 mutations diagnostiques. A l'intérieur de chaque clade, les haplotypes sont similaires et se différencient en général par un seul nucléotide et dans certains cas par deux ou trois. Cependant, la divergence génétique des séquences *COI* entre ces deux clades est forte (2,72% en moyenne) au contraire de celle observée à l'intérieur de chaque clade.

III.3.2 Description de la diversité génétique des séquences ITS

Les séquences ITS de 1137 pb analysées chez 98 individus ont montré un degré élevé d'homogénéité (0,26% de diversité nucléotidique). Deux types majoritaires de séquences ITS, appelés ici T1 et T2, ont été observés. Ils séparent les échantillons étudiés en deux clades principaux qui concordent avec ceux obtenus avec les séquences *COI* (Figure 19):

- Le premier clade (**I**) comprend tous les échantillons collectés en Asie, en Afrique, dans le bassin méditerranéen (sauf ceux de la Catalogne française-espagnole et du Portugal), en Amérique du nord (Floride) et en Amérique du Sud (Argentine et extrême sud du Brésil). Tous ces échantillons partagent le même type de séquences ITS (T1), sauf l'échantillon nord-est Argentin composé de 5 individus. Dans celui-ci, un autre type de séquences ITS (appelé T3) a été détecté chez un seul individu qui diffère du type T1 par une seule mutation. Les quatre autres individus partagent une séquence hétérozygote (T1/T3).
- Le deuxième clade (**II**) comprend des échantillons collectés dans la région Catalogne française-espagnole, du Portugal et tous les échantillons de la côte Atlantique du Brésil. Ils possèdent le deuxième type de séquences ITS (T2).

Ces deux types de séquences ITS se différencient par 2 sites diagnostiques dans la région ITS2. Une séquence hétérozygote (T1/T2) a été détectée chez un seul individu de l'échantillon portugais (Castanheira do Ribatejo).

Tableau 4. Variabilité génétique des populations de *Tetranychus evansi* analysées à l'aide de 16 locus microsatellites. N: nombre d'individus génotypés, N_A : nombre total d'allèles observés par population, A_A : richesse allélique. H_E et H_O : hétérozygotie moyenne attendue et observée, A_p : nombre d'allèles privés, N_G : nombre de génotypes multilocus et F_{IS} : Indice de consanguinité.

Pays	Localité	Abréviations	N	N _A	A _A	H _E	H _O	F _{IS}	A _P	N _G	Cluster génétique	
Brésil	Uruguaiana	BR-U	34	26	1,55	0.222	0.179	0.208	3	34	BR-SO	
Brésil	Alegrete	BR-A	28	25	1,48	0.189	0.153	0.209	1	28		
Brésil	Itaqui	BR-I	28	30	1,54	0.162	0.143	0.136	8	28		
Camocim de São												
Brésil	Félix	BR-C	34	19	1,10	0.026	0.013	0.418**	0	6	BR-Ad	
Brésil	Goianá	BR-G	20	17	1,02	0.003	0.003	0	0	2		
Brésil	Barbalha	BR-B	32	21	1,27	0.108	0.061	0.442**	1	15		
Brésil	Venâncio Aires	BR-V	28	16	1	0	0	-	3	1		
Kenya	Shimba Hills	KenES	12	17	1,03	0.005	0.005	-0.0000	1	2	AF+EU	
Kenya	Sindo	KenW	10	17	1,07	0.013	0.013	0.0000	1	3		
Kenya	Athi-River 3	Ken-A3	20	16	1,00	0	0	-	0	1		
Kenya	Athi-River 4	Ken-A4	16	17	1,05	0.016	0.010	0.442**	0	3		
Kenya	Athi-River 5	Ken-A5	17	17	1,04	0.010	0.004	0.652**	0	2		
Tanzanie	Tengeru	TZ	21	17	1,01	0.003	0.003	0.0000	0	3		
Tanzanie	Mukuyuni	TZE	19	16	1,00	0	0	-	0	1		
Plusieurs localités												
Îles des Canaries	fusionnées	CRY	12	17	1,03	0.005	0.005	-0.0000	0	2		
Portugal	Luz de Tavira	POR-SE	12	19	1,10	0.024	0.016	0.377**	0	4		
Espagne	Cabanes	SP-C2	5	16	1	0	0	-	0	1		
Espagne	Alcanar	SP-T	4	16	1	0	0	-	0	1		
Alqueras del												
Espagne	Niño Perdido	SP-C1	7	16	1	0	0	-	0	1		
Espagne	Valencia	SP-Vv	18	16	1	0	0	-	0	1		
Espagne	Benferi	SP-Va	6	17	1,01	0.003	0.003	0	0	2		
La Pobla de												
Espagne	Vallbona	SP-V	8	18	1,11	0.033	0.039	-0.129	0	3		
Ahama de												
Espagne	Murcia	SP-M	15	18	1,06	0.013	0.005	0.657**	1	3		
France	Saint-Jeannet	FR-SJ	28	16	1	0	0	-	0	1		
Tunisie	Zaafrane	TU-L	14	16	1	0	0	-	0	1	MED	
Tunisie	Kledia	TU-B	14	16	1	0	0	-	0	1		
Grèce	Timpakion	GR	16	16	1	0	0	-	0	1		
Espagne	Granada	SP-Ag	16	23	1,34	0.122	0.071	0.446	0	15		
Espagne	Malaga	SP-Am	23	24	1,40	0.138	0.087	0.389**	0	17		
Castanheira do												
Portugal	Ribatejo	POR-L	26	32	1,92	0.321	0.191	0.422**	1	9	POR	
Portugal	Aljustrel	POR-B	27	32	1,95	0.375	0.288	0.249	0	15		
Portugal	Ameal	POR-C	10	27	1,58	0.142	0.123	0.196	1	5		
Portugal	Lagos	POR-SW	11	16	1	0	0	-	0	1	POR+Cat	
France	Torreilles	FR-TO	27	17	1,01	0.002	0.002	-0.0000	0	2		
France	Sainte-Marie	FR-SM	31	17	1,04	0.009	0.006	0.362**	1	3		
Total			649									

La significativité des valeurs de F_{IS} a été testée avec des corrections de Bonferroni et l'écart à l'équilibre Hardy Weinberg est indiqué en gras (** $P < 0,01$). Les échantillons ont été regroupés en fonction des clusters génétiques obtenus avec l'analyse STRUCTURE (Figure 23).

III.3.3 Isolement de loci microsatellites chez *Tetranychus evansi*

La faible fréquence de séquences microsatellites chez l'espèce proche, *T. urticae* (Navajas *et al.*, 1998), nous a conduit à appliquer une approche de banque enrichie (Kijas *et al.*, 1994) pour l'isolement de ces loci chez *T. evansi*. Nous avons pu isoler 16 loci microsatellites qui se sont avérés polymorphes. Les amorces de PCR définies pour amplifier ces loci ont aussi été testées avec d'autres espèces de Tetranychidae : 5 espèces du genre *Tetranychus*, 6 de la sous-famille Tetranychinae et 3 de la sous-famille Bryobiinae. L'isolement et la caractérisation de ces marqueurs microsatellites ont fait l'objet d'un article qui se trouve à la fin de ce chapitre. En plus de l'article, qui a été publié dans Molecular Ecology Resources, j'ai inclus le manuscrit qui décrit de manière détaillée le travail réalisé.

III.3.3.1 Polymorphisme des marqueurs microsatellites

Les 16 loci microsatellites, qui se sont avérés polymorphes, ont été utilisés pour génotyper 649 individus prélevés sur différentes solanacées dans 33 localités dans les aires d'origine supposée en Amérique du Sud (Brésil) et d'introduction en Europe (France, Espagne, Portugal et Grèce) et en Afrique (Kenya, Tanzanie et Tunisie) (Figure 17, Tableau 4). Un tableau résumant les caractéristiques des loci microsatellites actualisées après utilisation pour l'étude de population de cette thèse est en annexe III. Le nombre d'allèles par locus varie de 2 à 10 avec un total de 82 allèles identifiés pour les 649 individus génotypés (annexe III). Pour la majorité des loci, des allèles spécifiques sont fixés à haute fréquence dans certaines populations, ce qui conduit à une forte structuration génétique (annexe IV). Un déséquilibre de liaison significatif entre les loci a été détecté.

III.3.3.2 Variation génétique populationnelle

Divers paramètres d'estimation de la diversité génétique ont été calculés pour chaque population : la richesse allélique (A_A) c'est à dire le nombre moyen d'allèles par locus standardisé pour la taille d'échantillon par la méthode de raréfaction, le nombre d'allèles privés (A_P) et l'hétérozygotie observée (H_O) et attendue (H_E) (Tableau 4).

Le nombre d'allèles le plus élevé a été observé dans les trois populations portugaises collectées dans le sud (Aljustrel) et le centre (Castanheira do Ribatejo et Ameal), suivies par

les trois populations brésiliennes du sud-ouest (Uruguaiana, Alegrete et Itaqui) et ensuite les deux populations du sud de l'Espagne en Andalousie (Granada et Malaga). La majorité des populations se sont avérées être monomorphes à plusieurs loci et seulement les deux populations portugaises (Castanheira do Ribatejo et Aljustrel) étaient polymorphes à 15 loci montrant l'hétérozygotie observée la plus élevée (0,288 et 0,191, respectivement), suivis par les populations du sud-ouest du Brésil (0,179, 0,153 et 0,143 pour Uruguaiana, Alegrete et Itaqui respectivement). Ces dernières contiennent la proportion la plus forte d'allèles privés (73%). Un déficit en hétérozygotes multi-loci par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été mis en évidence dans la majorité des populations avec seulement 7 populations à l'équilibre de Hardy Weinberg (Tableau 4).

III.3.3.3 Différenciation et structure génétique des populations

III.3.3.3.1 Indices de différenciation

Les indices de différenciation génétique (F_{ST}) multi-loci calculés par paire de populations varient de -0,0006 à 0,997 (0,659 en moyenne), révélant une certaine structuration au sein des populations analysées. Nous avons réalisé une analyse de variance moléculaire (AMOVA) pour comprendre la partition de la variance génétique à plusieurs niveaux. A une échelle continentale, nous avons regroupé les populations en deux zones géographiques : native (Amérique du Sud) et introduite (Afrique et Europe). Les résultats montrent que 32% de la variance génétique est expliquée par la différenciation entre les deux zones (native et introduite), alors que 59% est due à la différenciation génétique entre les populations au sein de chaque zone géographique. Il apparaît ainsi une structuration génétique à l'intérieur de chaque zone plus élevée que celle entre les deux zones.

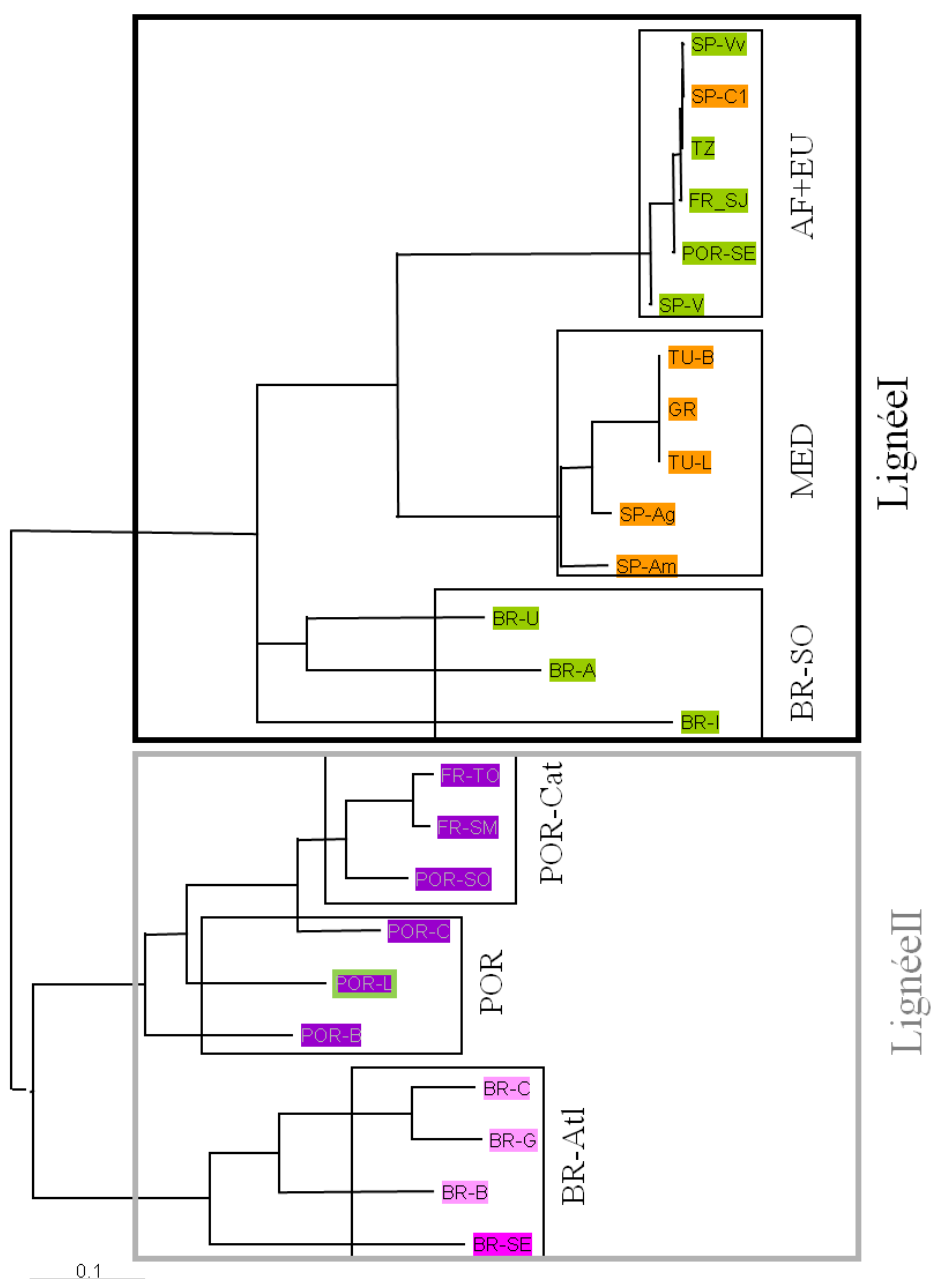
L'arbre *Neighbor-Joining* construit à partir des données microsatellites sépare clairement les populations en deux groupes principaux (I et II) qui correspondent aussi à ceux obtenus avec les séquences *COI* et *ITS* (Figure 21). A l'intérieur de chaque groupe, trois sous groupes génétiques ont été identifiés.

Dans le groupe I, ces sous groupes sont :

- 1) Sud-ouest Brésil (BR-SO) : comprend les trois populations collectées dans le sud ouest du Brésil (Uruguaiana, Alegrete et Itaqui). Une forte différenciation génétique a été révélée entre ces populations (F_{ST} = 0,4 – 0,7

Figure 21. Arbre Neighbor-Joining des populations de *Tetranychus evansi* réalisé à partir des données de marqueurs microsatellites. Les distances entre populations sont estimées par la méthode de Cavalli-Sforza, Edwards (1967) à l'aide du logiciel TreeMaker (S. Piry, comm. pers). Les codes des couleurs correspondent à ceux de la Figure 19. Les abréviations de localités sont présentées dans le tableau 4.

Pour améliorer la lisibilité, toutes les populations européennes et africaines dans le sous groupe (AF+EU) n'ont pas été représentées (l'interprétation reste inchangée pour un arbre incluant la totalité des populations génotypées).



avec une moyenne = 0,6). La population d'Itaqui (BR-I) est la plus éloignée puisqu'elle contient la proportion la plus élevée des allèles privés à haute fréquence.

- 2) Afrique Europe (AF+EU) : contient toutes les populations est africaines (Kenya et Tanzanie) et certaines populations européennes (Saint-Jeannet en France, est de l'Espagne et sud-est du Portugal). Une homogénéité génétique élevée a été observée au sein de ce sous groupe et la différenciation génétique entre les populations varie de 0 à 0,3 (moyenne $F_{ST}= 0,04$).
- 3) Méditerranéen (MED) : inclut les deux populations tunisiennes, la population grecque et les deux populations de l'Andalousie en Espagne. Les populations tunisienne et grecque, monomorphes et identiques pour tous les loci ($F_{ST}= 0$) et les valeurs de différenciation génétique (F_{ST}) entre ces dernières et les deux populations d'Andalousie sont comprises entre 0,16 et 0,27 en moyenne.

A l'intérieur du groupe (II), on distingue également les trois sous groupes génétiques suivants :

- 1) Les trois populations « proches » de la côte Atlantique du Brésil (BR-Atl) collectées dans le nord est (Camocim de São Félix, Goianá et Barbalha) plus une du sud (Venâncio Aires) du Brésil. La différenciation génétique entre ces populations est forte ($F_{ST}= 0,7-1$; 0,8 en moyenne). La population la plus éloignée génétiquement est celle collectée à Venâncio Aires.
- 2) Le sous groupe portugais (POR) est constitué de trois populations portugaises (Ameal, Castanheira do Ribatejo et Aljustrel). La différenciation génétique entre ces populations est faible (moyenne $F_{ST}= 0,04$).
- 3) Le sous groupe (POR+Cat) est formé d'une population portugaise collectée du sud-ouest du Portugal (Lagos) et les deux populations collectées dans les Pyrénées-Orientales (Torreilles, Sainte Marie). Les populations de ce sous groupe ont montré une homogénéité génétique élevée avec une différenciation génétique non significative (moyenne $F_{ST}= 0,01$).

Bien qu'une homogénéité génétique élevée ait été observée entre les populations introduites au sein de chaque sous groupe, une forte différenciation génétique a été révélée entre les sous groupes (AF+EU) et (MED) (moyenne $F_{ST}= 0,08$).

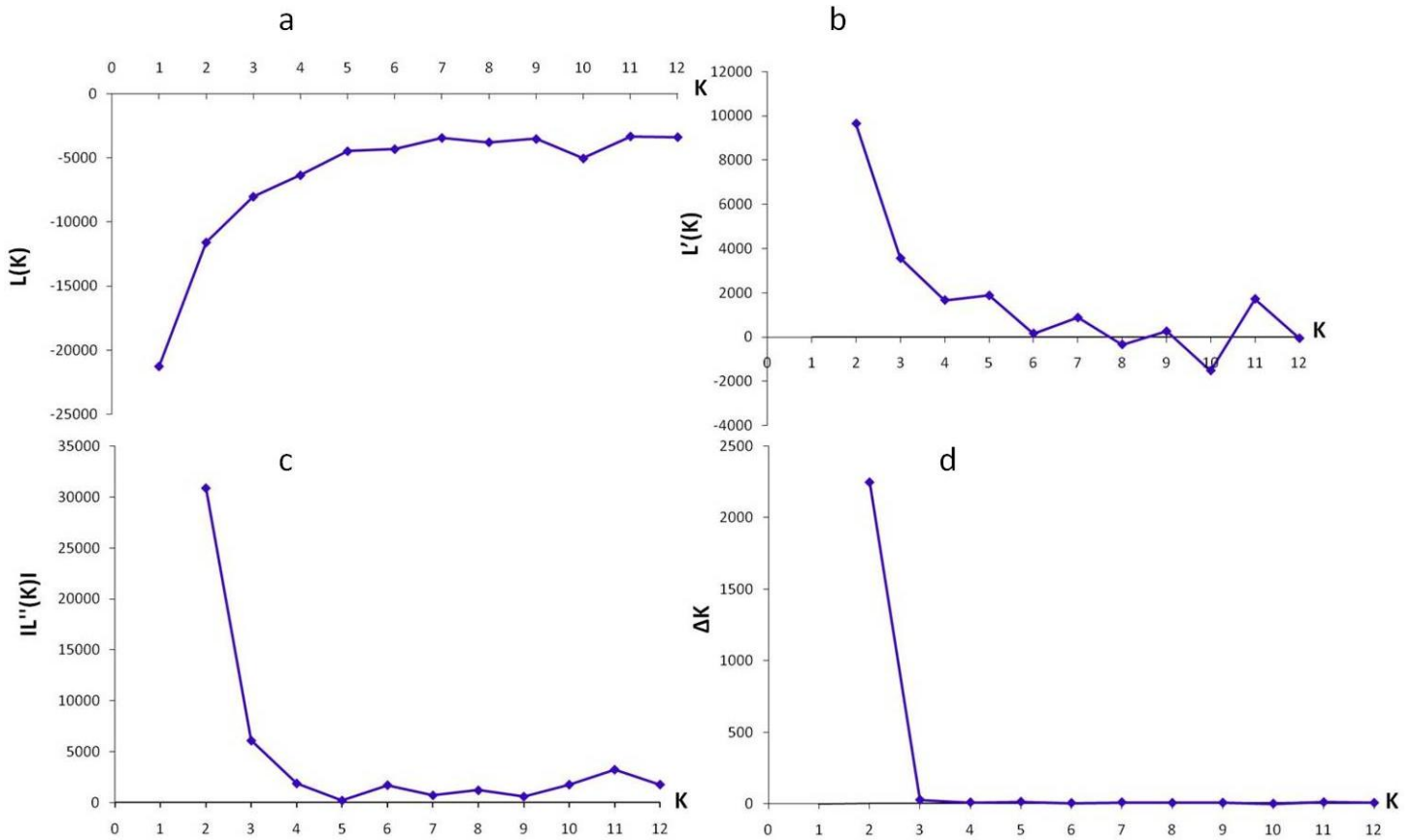


Figure 22. Détermination du nombre de groupes génétiquement distincts (K) selon la méthode décrite par Evanno *et al.* (2005). Cette méthode graphique consiste à calculer le taux de changement de second ordre du logarithme de la vraisemblance entre des K successifs (ΔK). La valeur la plus élevée de ΔK indique le nombre de clusters (K) le plus vraisemblable détecté par STRUCTURE. Pour cela, 4 étapes ont été effectuées : (a) $L(K)$ correspond au logarithme népérien de la vraisemblance des données en fonction du nombre de K, (b) $L'(K) = L(K) - L(K-1)$ représente la différence moyenne entre la vraisemblance de deux K successifs, (c) $|L''(K)| = |L'(K+1) - L'(K)|$ représente la valeur absolue de la différence entre deux valeurs de $L'(K)$ et (d) $\Delta K = m(|L''(K)|) / s[L(K)]$ avec $m(|L''(K)|)$ la moyenne des $|L''(k)|$ et $s[L(K)]$ l'écart type des $L(K)$ pour k de 1 à 12.

III.3.3.3.2 Inférence de structuration génétique des populations à l'aide du logiciel STRUCTURE

La détermination du nombre de populations le plus vraisemblable a été faite selon la méthode décrite par Evanno *et al.* (2005) (Figure 22). Le nombre de populations inférées à partir de cette méthode est de deux ($K = 2$). Ces deux groupes concordent parfaitement avec les deux lignées mitochondriales (I et II) identifiées précédemment. En effet, avec l'augmentation de nombre de clusters (K), les vraisemblances de données $L(K)$ augmentent, ce qui indique que nous sommes en présence d'une différenciation des populations, cependant elles commencent à se stabiliser à partir de $K = 5$.

Bien que la plupart des individus aient été fortement assignés à l'un des deux groupes avec de fortes probabilités d'appartenance ($> 0,9$), trois individus originaires de deux populations portugaises (Castanheira do Ribatejo et Aljustrel) ont été affectés au groupe I avec une forte probabilité ($> 0,98$) alors que la majorité des individus de ces populations Portugaises ont été affectés au groupe II. De plus, certains individus de ces deux populations (4 et 5 de Castanheira do Ribatejo (POR-L) et Aljustrel (POR-B), respectivement) ont été identifiés comme ayant une ascendance hybride apparente entre les deux groupes (avec une probabilité d'affectation d'environ 50% à chaque groupe, Figure 23). La faible estimation de K ($K=2$) soutenue par la méthode d'Evanno reflète le fait que cette dernière tend à détecter la structuration génétique la plus élevée.

Lorsque l'analyse STRUCTURE a été réalisée sur chaque cluster séparément, trois groupes hautement significatives ($K = 3$) ont été identifiés au sein du cluster I : Ia = BR-SO: le sud-ouest du Brésil (Uruguaiana, Alegrete et Itaqui), Ib = AF + UE: Afrique de l'Est (AF) et le sud de l'Europe (EU) et Ic = MED: le bassin méditerranéen [Andalousie (AND), Crète et Tunisie]. Dans le cluster II, les populations sont regroupées en deux groupes distincts : les populations brésiliennes (BR-Atl) et les populations introduites (POR et POR+CAT) (Tableau. 4).

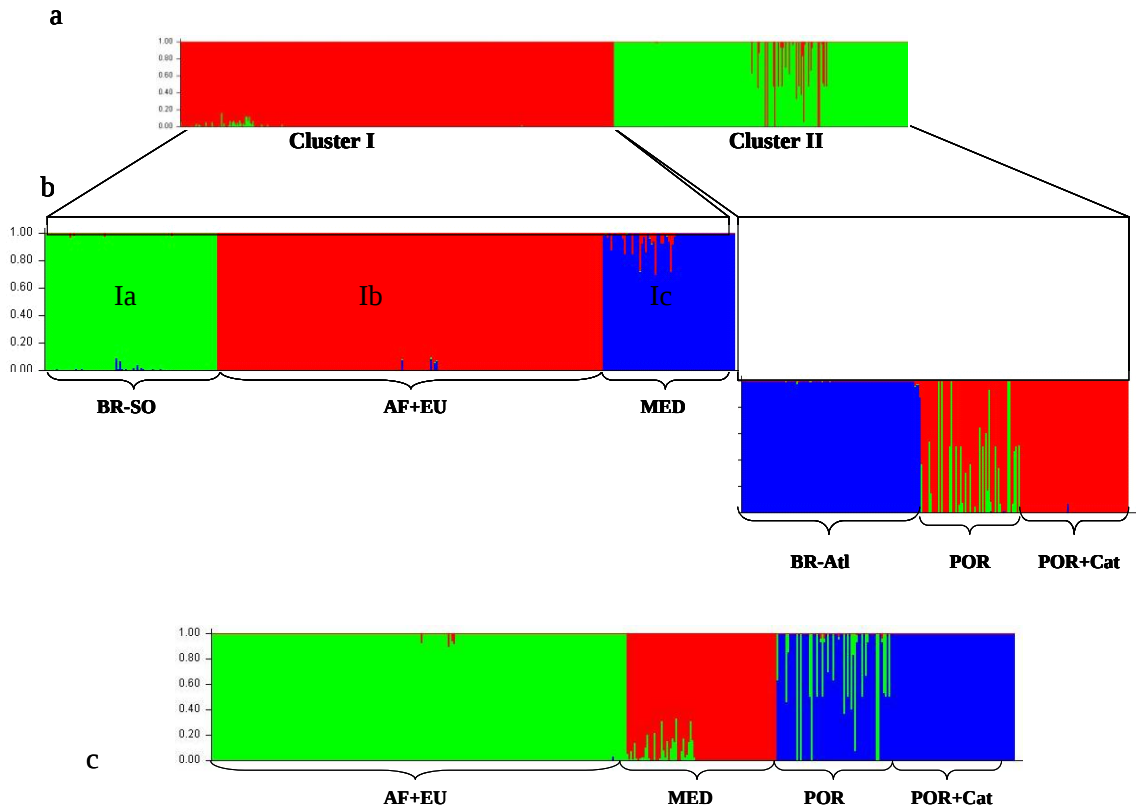


Figure 23. Représentation graphique de la probabilité d’affections des individus aux clusters identifiés à l’aide du logiciel STRUCTURE (option admixture) (a) pour l’ensemble des données, avec K=2 (b) pour chaque cluster identifié en (a) avec K= 3 lorsque l’analyse STRUCTURE a été séparément effectuée et (c) avec K= 3 lorsque l’analyse STRUCTURE a été lancée pour les populations introduites.

Chaque individu est représenté par une barre verticale. La longueur de la barre représente la probabilité d’appartenir de l’individu aux clusters. Le nome de la région géographique est indiqué (voir le Tableau 4).

III.4 Scénarios d'introduction en Europe et en Afrique

Nos données ont révélé que la lignée I, qui est la plus largement répandue, a une forte différenciation génétique au sein des populations introduites. Deux sous groupes ont été identifiées (AF+EU) et (MED) par les analyses microsatellites. Ils correspondent aux deux haplotypes H1 et H4 respectivement. Les analyses classiques de génétique des populations et la méthode de clustering utilisées ici ont permis d'identifier la région du sud-ouest du Brésil comme étant la plus proche de la source d'introduction de la lignée I. Cependant elles n'ont pas permis de retracer les routes et scénarios de colonisation de l'Afrique et l'Europe.

Une des limitations importantes de ces méthodes est qu'elles ne prennent pas suffisamment en compte la stochasticité démographique (le nombre d'individus introduits et le temps entre l'introduction et l'expansion démographique) et génétique (la dérive génétique, le goulot d'étranglement) liés aux événements historiques (Guillemaud *et al.*, 2010). Un deuxième problème de ces méthodes est qu'elles ne permettent pas d'estimer la probabilité des scénarios testés.

Le développement de nouvelles techniques, fondées sur des approches statistiques dites bayésiennes (ABC, Beaumont *et al.*, 2002), permet de comparer objectivement la vraisemblance de différents scénarios d'invasion et d'estimer des paramètres démographiques et historiques (Lombaert *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2005; Pascual *et al.*, 2007).

Nous avons utilisé cette approche ABC pour comparer plusieurs scénarios d'introduction de la lignée I en Europe et en Afrique à partir de la région sud-ouest du Brésil. A l'intérieur de la lignée I, le sous groupe (AF+EU) comprend des populations qui représentent deux régions géographiques éloignées, l'Afrique de l'est et l'Europe. Nous les avons donc considérés comme deux populations (AF) et (EU). Ainsi, quatre populations ont été considérées pour le test de scénarios évolutifs:

- 1) Le sous groupe (BR-SO) qui représente la population source. La population Itaquí a été éliminée de ce sous groupe car elle contient le moins d'allèles partagés avec les populations introduites ;

- 2) Le sous groupe MED qui comprend seulement les deux populations collectées en Andalousie (AND) ;

- 3) Le sous groupe Est-Africain (AF) qui comprend les populations collectées au Kenya et Tanzanie ;

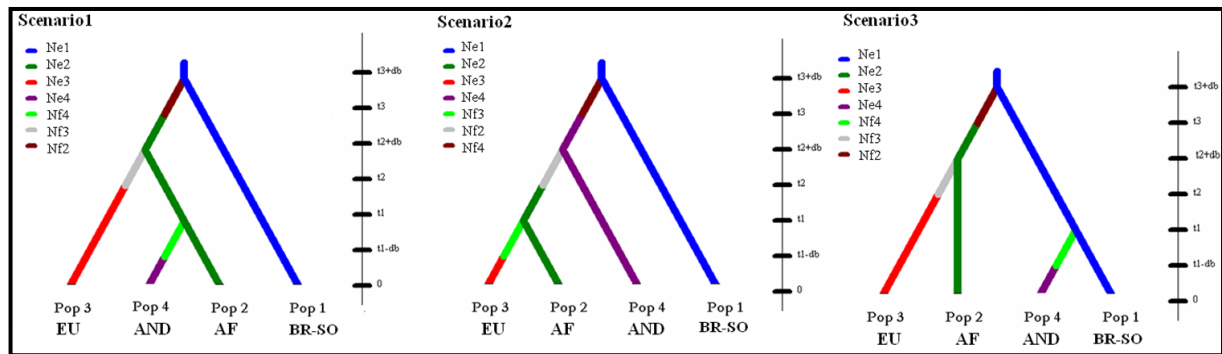


Figure 24. Schéma des trois scénarios évolutifs d'introduction reliant les populations de *Tetranychus evansi* considérées pour inférer les routes d'introduction en Afrique et en Europe.

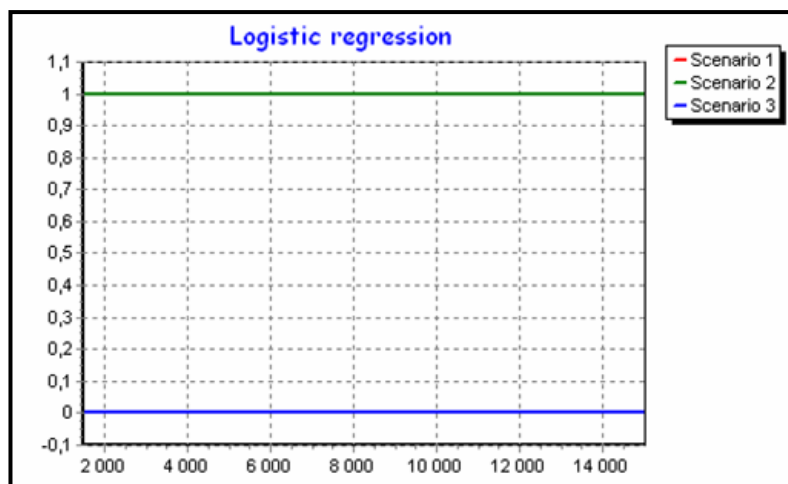


Figure 25. Probabilités *a posteriori* des scénarios obtenus par une régression logistique.

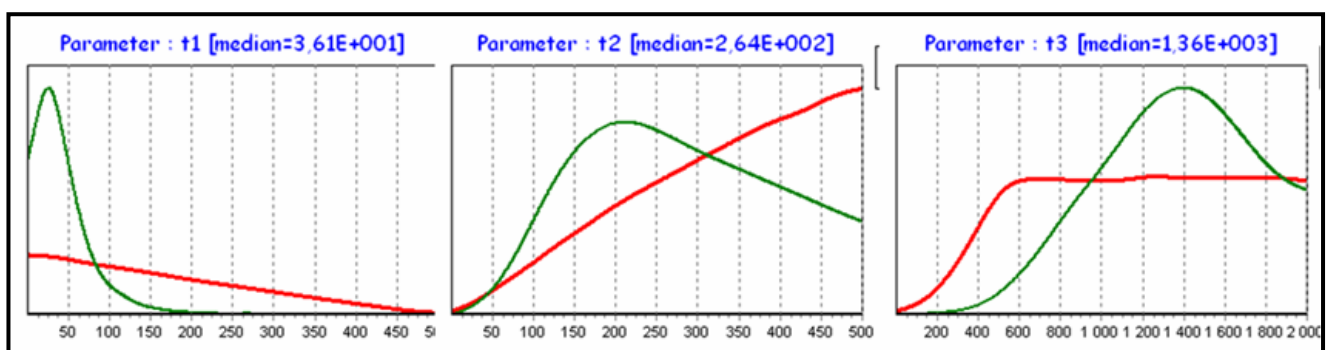


Figure 26. Distributions *a priori* (en rouge) et *a posteriori* (en vert) des paramètres (t_1 , t_2 , t_3) calculés sous le scénario 2, où t_1 : temps de divergence entre l'Afrique et l'Europe, t_2 : entre Andalousie et l'Afrique et t_3 : le temps de divergence entre Andalousie et le sud-ouest du Brésil (t_3) a été estimé à 1365 générations (soit environ 137 ans).

4) La population de l'Europe (EU) qui comprend les populations européennes collectées au sud-est du Portugal, dans l'est de l'Espagne et à Nice dans le sud-est de la France.

Trois scénarios de colonisation incluant tous un évènement de goulet d'étranglement, ont été considérés. Ils diffèrent par le sens des événements d'introduction (Figure 24).

Scénario 1 : l'Afrique de l'est (AF) a été colonisée à partir du sud-ouest du Brésil (BR-SO). Depuis l'Afrique, l'Europe (EU) et l'Andalousie (AND) ont été colonisées par deux événements d'introduction indépendants : $BR-SO \rightarrow AF \rightarrow EU$ et $AF \rightarrow AND$.

Scénario 2 : l'introduction se produit à partir du sud-ouest du Brésil (BR-SO) vers l'Andalousie (AND), l'acarien a été ensuite introduit en Afrique de l'est (AF) et puis en Europe (EU) : $BR-SO \rightarrow AND \rightarrow AF \rightarrow EU$.

Scénario 3 : les deux régions (AF) et (AND) ont été colonisées indépendamment par deux événements d'introduction du sud-ouest du Brésil (BR-SO) : $BR-SO \rightarrow AF \rightarrow EU$ et séparément $BR-SO \rightarrow AND$.

Tous les calculs des paramètres démographiques et historiques ont été effectués à l'aide du logiciel DIYABC (Cornuet *et al.*, 2008).

Parmi les trois scénarios testés, les probabilités *a posteriori* soutiennent fortement le scénario 2 (probabilité *a posteriori* = 1.00) [c'est-à-dire $BR-SO \rightarrow AND \rightarrow AF \rightarrow EU$] (Figure 25). Sous ce scénario, les différences entre les distributions *a posteriori* et les distributions *a priori* sont bien marquées, ce qui se traduit par un pic distinct pour les paramètres historiques (t_1 , t_2 , t_3) qui représentent le temps des événements d'introduction de *T. evansi* (Figure 26). Ce qui indique que nos données sont informatives pour estimer ces paramètres.

Les distributions *a posteriori* soutiennent un faible temps de divergence entre l'Afrique et les populations européennes (t_1) (médiane = 36 générations). La valeur médiane du temps d'introduction de *T. evansi* de l'Andalousie en Afrique de l'est (t_2) a été estimée à 264 générations. Cela correspond à une introduction ayant eu lieu il y a environ 26 ans, en supposant 10 générations/an dans les zones envahies. Enfin, le temps de divergence entre nos échantillons d'Andalousie et ceux du sud-ouest du Brésil (t_3) a été estimé à 1365 générations (soit environ 137 ans).

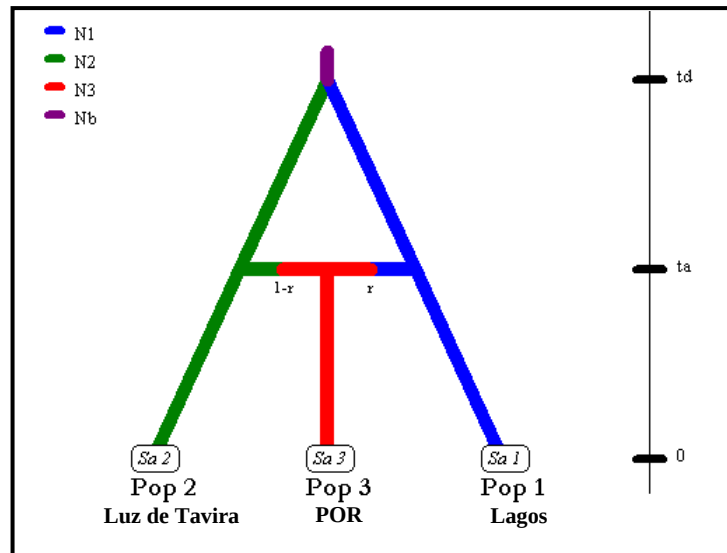


Figure 27. Schéma du scénario d'hybridation.

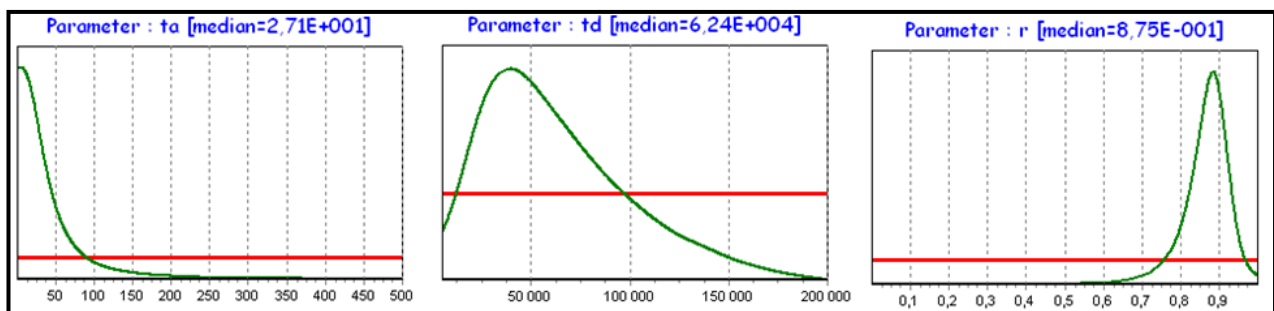


Figure 28. Distributions *a priori* (en rouge) et *a posteriori* (en vert) des paramètres (td : temps de divergence entre les deux lignées et ta : temps d'hybridation estimés par génération) et de taux d'introgression (r).

III.5 Événement d'hybridation

Nous avons mentionné que les échantillons de *T. evansi* ont été clairement séparés en deux lignées fortement divergentes, ayant été détectées ensemble en Amérique du Sud (le Brésil) et dans le sud de l'Europe (le Portugal, l'Espagne et la France). Il n'y a qu'au Portugal que des individus appartenant à ces deux lignées et ayant les haplotypes H1 et H7 coexistent dans les mêmes localités et s'hybrident. Cet événement d'hybridation a été détecté lors des analyses conduites avec STRUCTURE. De plus, une séquence ITS hétérozygote a été détectée dans l'échantillon de Castanheira do Ribatejo (Portugal).

Les analyses ABC ont été utilisées pour estimer le temps d'hybridation et de divergence entre ces deux lignées dans les aires d'introduction. Le jeu de données comprenait :

- 1) la population hybride (POR) formée de deux échantillons collectés à Castanheira do Ribatejo (POR-L) et Aljustrel (POR-B).
- 2) les populations considérées comme parentales sont celles collectées à Luz de Tavira (POR-SE) et à Lagos (POR-SO).

La description de ce scénario est présentée dans la figure 27.

Les distributions *a posteriori* révèlent des pics distincts pour les paramètres historiques (le temps de divergence t_d et le temps d'hybridation t_a) et également pour le paramètre démographique (r : le taux d'introgession des allèles de populations parentales dans la population hybride) (Figure 28).

Les résultats de nos analyses ABC suggèrent que la divergence entre les deux populations parentales est estimée à de 56188 générations (environ 5600 ans), alors que l'événement d'hybridation (t_a) se serait produit récemment à seulement 13 générations. Les taux d'introgession des lignées I et II dans la population hybride ont été estimés à 0,13 et 0,87 respectivement.

ARTICLE II.

Cros-Arteil S., Migeon A., **Boubou A.**, Navia D., Navajas M. Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium. 2009. Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources database 1 January 2009–30 April 2009. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1375–1429.

PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources database 1 January 2009–30 April 2009

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM,¹ L. G. ABERCROMBIE,² C. M. ANDERSON,³ B. G. BALDWIN,⁴ I. C. BANG,⁵ R. BELDADE,⁶ G. BERNARDI,⁶ A. BOUBOU,⁷ A. BRANCA,⁸ F. BRETAGNOLLE,⁹ M. W. BRUFORD,¹⁰ A. BUONAMICI,¹¹ R. K. BURNETT JR,¹² D. CANAL,¹³ H. CÁRDENAS,¹⁴ C. CAULLET,⁹ S. Y. CHEN,^{15,16} Y. J. CHUN,¹⁷ C. COSSU,¹⁸ C. F. CRANE,¹⁹ S. CROS-ARTEIL,⁷ R. CUDNEY-BUENO,²⁰ R. DANTI,¹⁸ J. A. DÁVILA,²¹ G. DELLA ROCCA,¹⁸ S. DOBATA,²² L. D. DUNKLE,¹⁹ S. DUPAS,⁸ N. FAURE,⁸ M. E. FERRERO,²¹ B. FUMANAL,²³ G. GIGOT,⁸ I. GONZÁLEZ,¹⁴ S. B. GOODWIN,¹⁹ D. GROTH,²⁴ B. D. HARDESTY,²⁵ E. HASEGAWA,²⁶ E. A. HOFFMAN,²⁷ M. L. HOU,²⁸ A. F. J. JAMSARI,²⁹ H. J. JI,¹⁶ D. H. JOHNSON,² L. JOSEPH,²⁵ F. JUSTY,³⁰ E. J. KANG,³¹ B. KAUFMANN,³² K. S. KIM,⁵ W. J. KIM,³³ A. V. KOEHLER,³⁴ B. LAITUNG,⁹ P. LATCH,³⁵ Y. D. LIU,²⁸ M. B. MANJEROVIC,²⁷ E. MARTEL,³² S. S. METCALFE,²⁵ J. N. MILLER,³ J. J. MIDGLEY,³⁶ A. MIGEON,⁷ A. J. MOORE,⁴ W. L. MOORE,³⁷ V. R. F. MORRIS,³⁸ M. NAVAJAS,⁷ D. NAVIA,³⁹ M. C. NEEL,^{12,40} P. J. G. DE NOVA,²¹ I. OLIVIERI,³⁰ T. OMURA,⁴¹ A. S. OTHMAN,²⁹ J. OUDOT-CANAFF,³² D. R. PANTHEE,⁴² C. L. PARKINSON,²⁷ I. PATIMAH,⁴³ C. A. PÉREZ-GALINDO,¹⁴ J. B. PETTENGILL,⁴⁰ S. PFAUTSCH,⁴⁴ F. PIOLA,³² J. POTTI,¹³ R. POULIN,³⁴ P. T. RAIMONDI,⁶ T. A. RINEHART,⁴⁵ A. RUZAINAH,⁴⁶ S. K. SARVER,³ B. E. SCHEFFLER,⁴⁷ A. R. R. SCHNEIDER,⁴⁴ J. F. SILVAIN,⁸ M. N. SITI AZIZAH,^{29,48} Y. P. SPRINGER,³⁴ C. N. STEWART,⁴² W. SUN,¹⁵ R. TIEDEMANN,⁴⁴ K. TSUJI,⁴⁹ R. N. TRIGIANO,² G. G. VENDRAMIN,¹¹ P. A. WADL,² L. WANG,¹⁵ X. WANG,⁵⁰ K. WATANABE,⁴¹ J. M. WATERMAN,²⁷ W. W. WEISSER,⁵¹ D. A. WESTCOTT,²⁵ K. R. WIESNER,⁵¹ X. F. XU,¹⁵ S. YAEHASHI⁴¹ and J. S. YUAN⁴²

¹Molecular Ecology Resources Editorial Office, 6270 University Blvd, Vancouver, BC, V6T 1Z4, Canada; ²Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996-4560, USA; ³Center for the Conservation of Biological Resources, Black Hills State University, 1200 University St. Unit 9053, Spearfish, SD 57799, USA; ⁴Department of Integrative Biology/Jepson Herbarium, 1001 VLSB, #2465, University of California, Berkeley, CA 94720-2465 USA; ⁵Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea; ⁶Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California Santa Cruz, 100 Shaffer Road, Santa Cruz, CA 95060, USA; ⁷INRA, UMR CBGP (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro) Centre de Biologie et de Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montpellier-sur-Lez Cedex, France; ⁸Institut de Recherche pour le Développement, UR072, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France, and Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France; ⁹Université de Bourgogne, UMR 1210 Biologie et Gestion des Adventices, F-21085 Dijon Cedex, France; ¹⁰Biodiversity and Ecological Processes Group, Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Cathays Park, Cardiff, CF10 3AX, UK; ¹¹Istituto di Genetica Vegetale, Consiglio Nazionale delle Ricerche, IGV-CNR. Via Madonna del Piano 10, I-50019, Sesto F.no, (Firenze) Italy; ¹²Department of Plant Science and Landscape Architecture and Department of Entomology, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA; ¹³Estación Biológica de Doñana – CSIC, Department of Evolutionary Ecology, Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain; ¹⁴Basic and Environmental Sciences and Technological Development Research Center (CICBA) - Universidad Santiago de Cali, Calle 5 Cra 62 Cali, Colombia.; ¹⁵Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; ¹⁶Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007, China; ¹⁷INRA, UMR 1210 Biologie et Gestion des Adventices, 17 rue de Sully, F-21085 Dijon Cedex, France; ¹⁸Istituto per la Protezione delle Pianta. Consiglio Nazionale delle Ricerche, IPP-CNR. Via Madonna del Piano 10, I-50019, Sesto F.no, (Firenze) Italy; ¹⁹Crop Production and Pest Control Research Unit, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2054, USA; ²⁰School of Natural Resources University of Arizona Biological Sciences East, Room 325 Tucson, AZ 85721, USA; ²¹Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ronda de Toledo s/n 13005 Ciudad Real, Spain; ²²Department of General Systems Studies, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan; ²³Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, F-63177 Aubiere Cedex, France; ²⁴Curtin University, School of Biomedical Sciences, Perth, WA 6845, USA; ²⁵CSIRO Sustainable Ecosystems, Atherton, Qld 4883, Australia; ²⁶Laboratory of Animal Ecology, Department of Ecology and Systematics, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan; ²⁷Department of Biology, University of Central Florida, 4000 Central Florida Blvd., Orlando, FL 32816, USA; ²⁸State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences,

Beijing 100193, China;²⁹School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11800 Minden, Pulau Pinang, Malaysia;³⁰Institut des Sciences de l'Évolution, Université Montpellier, Montpellier, France;³¹Southern Regional Inland Fisheries Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Jinhae 645-806, Korea;³²UMR CNRS 5023 Ecology of Fluvial Hydrosystems, University Lyon 1, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France;³³Biotechnology Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea;³⁴Zoology Department, University of Otago, PO Box 56, Dunedin 9054, New Zealand;³⁵Queensland Parks and Wildlife Service, Atherton, Qld 4883, Australia;³⁶Botany Department, University of Cape Town, Cape Town, South Africa;³⁷David Eccles School of Business, 1645 E. Campus Center Dr. #101, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, USA;³⁸Department of Environmental Science, Policy, and Management, 4099A VLSB, University of California, Berkeley, CA 94720, USA;³⁹EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, final W5 Norte, Cx. Postal 02372, 70.770-900, Brasília, DF, Brazil;⁴⁰Behavior, Ecology, Evolution, and Systematics Graduate Program, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA;⁴¹Department of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University, Japan.;⁴²Plant Sciences, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996-4561 USA;⁴³Department of Biomedicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor;⁴⁴Unit of Evolutionary Biology/Systematic Zoology, Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Karl-Liebknecht-Strasse 24-25, Haus 26, D-14476 Potsdam, Germany;⁴⁵USDA-ARS Southern Horticultural Laboratory, 810 Highway 26 West, Poplarville, MS 39470, USA;⁴⁶Department of Biosystem and Bioprocess Engineering Technology, UniKL-MICET, Vendor City, Taboh Naning, Alor Gajah 78000 Melaka, Malaysia;⁴⁷USDA-ARS-CGRU MSA Genomics Laboratory, 141 Experiment Station Rd. Stoneville, MS 38776, USA;⁴⁸Centre for Marine and Coastal Studies, Universiti Sains Malaysia, Muka Head, Pulau Pinang, Malaysia;⁴⁹Department of Environmental Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan;⁵⁰Texas AgriLife Research and Extension Center, Texas A&M University System, Dallas, TX 75252, USA;⁵¹Unit of Multitrophic Interactions, Institute of Ecology, University of Jena, Dornburger Str. 159, D-07743 Jena, Germany

Abstract

This article documents the addition of 283 microsatellite marker loci to the Molecular Ecology Resources Database. Loci were developed for the following species: *Agalinis acuta*; *Ambrosia artemisiifolia*; *Berula erecta*; *Casuarium casuarium*; *Cercospora zeae-maydis*; *Chorthippus parallelus*; *Conyza canadensis*; *Cotesia sesamiae*; *Epinephelus acanthistius*; *Ficedula hypoleuca*; *Grindelia hirsutula*; *Guadua angustifolia*; *Leucadendron rubrum*; *Maritrema novaezealandensis*; *Meretrix meretrix*; *Nilaparvata lugens*; *Oxyeleotris marmoratus*; *Phoxinus neogaeus*; *Pristomyrmex punctatus*; *Pseudobagrus brevicarpus*; *Seiridium cardinale*; *Stenopsyche marmorata*; *Tetranychus evansi* and *Xerus inauris*. These loci were cross-tested on the following species: *Agalinis decemloba*; *Agalinis tenella*; *Agalinis obtusifolia*; *Agalinis setacea*; *Agalinis skimmeriana*; *Cercospora zeina*; *Cercospora kikuchii*; *Cercospora sorghi*; *Mycosphaerella graminicola*; *Setosphaeria turcica*; *Magnaporthe oryzae*; *Cotesia flavipes*; *Cotesia marginiventris*; *Grindelia xpaludosa*; *Grindelia chiloensis*; *Grindelia fastigiata*; *Grindelia lanceolata*; *Grindelia squarrosa*; *Leucadendron coniferum*; *Leucadendron salicifolium*; *Leucadendron tinctum*; *Leucadendron meridianum*; *Laodelphax striatellus*; *Sogatella furcifera*; *Phoxinus eos*; *Phoxinus rigidus*; *Phoxinus brevispinosus*; *Phoxinus bicolor*; *Tetranychus urticae*; *Tetranychus turkestanii*; *Tetranychus ludeni*; *Tetranychus neocaledonicus*; *Tetranychus amicus*; *Amphitetranynchus viennensis*; *Eotetranychus rubiphilus*; *Eotetranychus tiliarium*; *Oligonychus perseae*; *Panonychus citri*; *Bryobia rubrioculus*; *Schizonobia bundi*; *Petrobia harti*; *Xerus princeps*; *Spermophilus tridecemlineatus* and *Sciurus carolinensis*.

This article documents the addition of 283 microsatellite marker loci in the Molecular Ecology Resources Database. Table 1 contains information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci

were tested in and the accession numbers for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and GenBank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column. A full description of the development protocol for the loci presented here can be found on the Molecular Ecology Resources Database (<http://tomato.biol.trinity.edu/>).

Correspondence: Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, E-mail: editorial.office@molecolres.com

Table 1 Information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci were tested in and the accession numbers for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and GenBank. The authors responsible for each set of loci are given in the final column

Species	No. primers developed	Other species tested	MER database numbers	GenBank accession numbers	Authors
<i>Agalinis acuta</i>	21	<i>A. decemloba</i> <i>A. tenella</i> <i>A. obtusifolia</i> <i>A. setacea</i> <i>A. skinneriana</i>	36808–36828	FJ754646–FJ754666	J. B. Pettengill R. K. Burnett Jr. M. C. Neel
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	8	n/a	36829–36836	FJ595149–FJ595156	Y. J. Chun B. Fumanal B. Laitung C. Caultet F. Bretagnolle E. Martel J. Oudot-Canaff, B. Kaufmann F. Piola B. D. Hardesty D. Groth S.S. Metcalfe L. Joseph P. Latch D. A. Westcott L. D. Dunkle C. F. Crane S. B. Goodwin
<i>Berula erecta</i>	23	n/a	36691–36713	FJ645574–FJ645596	
<i>Casuarius casuarius</i>	9	n/a	36714–36722	FJ798203–FJ798211	
<i>Cercospora zeae-maydis</i>	10	<i>C. zeina</i> <i>C. kikuchii</i> <i>C. sorghi</i> <i>Mycosphaerella graminicola</i> <i>Setosphaeria turcica</i> <i>Magnaporthe oryzae</i>	36550–36559	FG243475.1 FG245483.1 FG246783.1 FG246813.1 FG246828.1 FG246933.1 FG247810.1 FG248153.1 FG253922.1 FG254140.1	
<i>Chorthippus parallelus</i>	9	n/a	37151–37159	FJ938197–FJ938205	S. Pfautsch A. R. R. Schneider K. R. Wiesner W. W. Weisser R. Tiedemann X. W. Wang L. G. Abercrombie P. A. Wadl D. H. Johnson D. R. Panthee B. E. Scheffler T. A. Rinehart N. R. Stewart J. S. Yuan C. N. Stewart R. N. Trigiano N. Faure A. Branca G. Gigot S. Dupas J. F. Silvain
<i>Conyza canadensis</i>	8	n/a	37416–37423	EU512230–EU512233 EU512236 EU652945–EU652947	
<i>Cotesia sesamiae</i>	9	<i>C. flavipes</i> <i>C. marginiventris</i>	37054–37062	FJ233144–FJ233169	

Table 1 (Continued)

Species	No. primers developed	Other species tested	MER database numbers	GenBank accession numbers	Authors
<i>Epinephelus acanthistius</i>	13	n/a	36862–36874	FJ178389 FJ178391–FJ178393 FJ178395–FJ178397 FJ711585–FJ711590	R. Beldade R. Cudney-Bueno P. T. Raimondi G. Bernardi
<i>Ficedula hypoleuca</i>	9	n/a	35888–35896	FJ389732–FJ389740	D. Canal J. A. Dávila P. J. G. de Nova M. E. Ferrero J. Potti
<i>Grindelia hirsutula</i>	11	<i>G. xpaludosa</i> <i>G. chilensis</i> <i>G. fastigiata</i> <i>G. lanceolata</i> <i>G. squarrosa</i>	37209–37233	FJ660688–FJ660701	A. J. Moore W. L. Moore V. R. F. Morris B. G. Baldwin
<i>Guadua angustifolia</i>	9	n/a	37200–37208	FJ444929–FJ444932 FJ444934–FJ444936 FJ476075–FJ476076	C.A. Pérez-Galindo I. González H. Cárdenas
<i>Leucadendron rubrum</i>	10	<i>L. coniferum</i> <i>L. salicifolium</i> <i>L. tinctum</i> <i>L. meridianum</i> ,	36651–36674	FJ589765–FJ589773	F. Justy J. J. Midgley I. Olivieri
<i>Maritrema novaezealandensis</i>	27	n/a	36943–36970	FJ766537–FJ766563	Y. P. Springer A. V. Koehler R. Poulin
<i>Meretrix meretrix</i>	11	n/a	37450–37460	FJ232978–FJ232989	S. Y. Chen L. Wang W. Sun H. J. Ji X. F. Xu
<i>Nilaparvata lugens</i>	14	<i>Laodelphax striatellus</i> <i>Sogatella furcifera</i>	36764 – 36777	DB828715 DB825677 DB843573 DB852116 DB838689 DB823258 DB839311 DB821134 DB837858 DB822071 DB843409 DB843364 DB845638 DB853707	Y. D. Liu M. L. Hou
<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	8	n/a	37191–37199	EU860240–EU860247	A. Ruzainah M. N. Siti Azizah I. Patimah A. S. Othman A. F. J. Jamsari
<i>Phoxinus neogaeus</i>	12	<i>Phoxinus eos</i>	36875–36880 36882–36888	FJ8027688–FJ8027699	J. N. Miller S. K. Sarver C. M. Anderson
<i>Pristomyrmex punctatus</i>	11	<i>P. rigidus</i> <i>P. brevispinosus</i> <i>P. bicolor</i>	36752–36762	AB479990–AB480000	S. Dobata E. Hasegawa K. Tsuji

Table 1 (Continued)

Species	No. primers developed	Other species tested	MER database numbers	GenBank accession numbers	Authors
<i>Pseudobagrus brevicorpus</i>	8	n/a	37085–37092	FJ592090 FJ592094 FJ592096 FJ592102 FJ592104 FJ592106 FJ592115 FJ592130	K. S. Kim E. J. Kang W. J. Kim I. C. Bang
<i>Seiridium cardinale</i>	8	n/a	37489–37496	FJ493457–FJ493464	G. Della Rocca A. Buonamici C. Cossu G. G. Vendramin R. Danti
<i>Stenopsyche marmorata</i>	10	n/a	37461–37470	AB472379 AB472381–AB472389	S. Yaegashi K. Watanabe T. Omura
<i>Tetranychus evansi</i>	16	<i>T. urticae</i> <i>T. turkestanii</i> <i>T. ludeni</i> <i>T. neocaledonicus</i> <i>T. amicus</i> <i>Amphitettranychus viennensis</i> <i>Eotetranychus rubiphilus</i> <i>Eotetranychus tiliarium</i> <i>Oligonychus perseae</i> <i>Panonychus citri</i> <i>Bryobia rubrioculus</i> <i>Schizonobia bundi</i> <i>Petrobia harti</i>	37471–37483 37485–37487	FJ426370–FJ426385	A. Boubou, S. Cros-Arteil A. Migeon M. Navajas D. Navia
<i>Xerus inauris</i>	9	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i> <i>Sciurus carolinensis</i> <i>X. princeps</i>	37440–37447 37497	FJ823123–FJ823131	M. B. Manjerovic J. M. Waterman E. A. Hoffman C. L. Parkinson

doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02746.x

© 2009 Blackwell Publishing Ltd

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES

Isolation, characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite markers for an invasive mite, *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae)

Journal:	<i>Molecular Ecology Resources</i>
Manuscript ID:	MER-08-0758.R1
Manuscript Type:	Permanent Genetic Resources Note
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cros-Arteil, Sandrine; INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro) Migeon, Alain; INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro) Boubou, Angham; INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro) Navia, Denise; EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia NAVAJAS, Maria; INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro)
Keywords:	Agriculture, Invasive Species, Invertebrates, Population Genetics - Empirical

**Isolation, characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite markers
for an invasive mite,
Tetranychus evansi (Acari: Tetranychidae)**

Sandrine CROS-ARTEIL¹, Alain MIGEON¹, Angham BOUBOU¹, Denise NAVIA²
and Maria NAVAJAS¹

¹INRA, UMR CBGP (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro) *Centre de Biologie et de
Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34988
Montferrier-sur-Lez Cedex, France*

²EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, *Parque Estação Biológica, final W5 Norte,
Cx. Postal 02372, 70.770-900, Brasília, DF, Brasil*

Keywords: *Tetranychus evansi*, microsatellites, invasive species, agricultural pest, multiplex
PCR, cross-species amplification

Running headline: Microsatellites in *Tetranychus evansi*

Corresponding author:
Maria NAVAJAS
CBGP - INRA
Campus International de Baillarguet
CS 30016
34988 Montferrier sur Lez Cedex, France
Phone: +33 (0)4 99 62 33 34
E-mail: navajas@supagro.inra.fr

Abstract

Sixteen polymorphic microsatellite loci were isolated and characterized from the invasive spider mite *Tetranychus evansi*, a serious pest of Solanaceae plants. Experimental conditions for PCR multiplexing and loci genotyping are described. Number of alleles per locus ranged from 2 to 5. Expected and observed heterozygosities ranged from 0.032 to 0.511 and 0.177 to 0.478, respectively. These markers should be useful to study dispersal and invasion genetics of the agricultural pest *T. evansi*. Results of cross-species amplification tests are reported for five other species of the genus *Tetranychus*, five species of the subfamily Tetranychinae and three species of the subfamily Bryobiinae.

Text

Tetranychus evansi Baker & Pritchard (tomato red spider mite) is an invasive pest belonging to the family Tetranychidae [ca. 1,250 species (Migeon & Dorkeld 2007)]. *Tetranychus evansi* is supposed to have a neotropical origin. However in the past half-century the mite has expanded its distribution area. It has been reported from The Americas, Africa, the Mediterranean region, Hawaii, Taiwan and the Indian Ocean Islands (Migeon & Dorkeld 2007). This phytophagous mite is found mainly on Solanaceae (Moraes *et al.* 1987; Bolland *et al.* 1998), including numerous cultivated plants such as tobacco, tomato, potato and eggplant (Jeppson *et al.* 1975). In the last 10 years, it has become a serious pest in Africa (Saunyama & Knapp 2003) and causes important outbreaks in Spain. Despite the agricultural importance of the mite, genetic markers and information on its population structure are lacking. Some ribosomal ITS sequences, mostly useful for species discrimination, are the only genetic resources available yet (Knapp *et al.*, 2003; Hurtado Ruiz *et al.*, 2008). Gene flow estimates

between populations in both, its native region in South America and in the newly invaded areas, together with an understanding of the mite's colonization routes, are needed to control the progression of the invasion. Here we developed 16 polymorphic microsatellite markers from *T. evansi*, useful to address these issues.

Total DNA was extracted from a pool of *T. evansi* females (about 150) collected from Sainte-Marie-de-la-Mer, (France) on *Datura stramonium* (Solanaceae), using a standard CTAB-based protocol (Doyle & Doyle 1987). Approximately 5 µg of genomic DNA were digested to completion with *RsaI* (Promega), and the 500-900 pb fraction was purified and ligated to self-complementary linkers Rsa21 (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') and phosphorylated Rsa25 (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'). An amplification using the Rsa21 primer was performed and the product was purified. The enrichment procedure described in Kijas *et al.* (1994) based on streptavidin-coated magnetic particles (MagneSphere, Promega) was used. 5' biotinylated (TC)₁₀, (TG)₁₀, CT(ATCT)₆ or TG(TGTA)₆ oligonucleotides were used as probes. The enriched microsatellite fragments were purified and ligated into the pGEM-T Easy vector (Promega), and used to transform JM109 *Escherichia coli* competent cells, following supplier's instructions (Promega). Recombinant clones (1,920 in total) were screened by PCR for repeated motifs (Waldbieser 1995). Positive clones (376) were sequenced with the T7 primer. Unique sequences (38) containing exploitable flanking regions and clear repeated motifs were chosen for designing primers using PRIMER DESIGNER V2.0 (Scientific & Educational Software). The selected loci were first optimized by single locus PCR. Sixteen (16) of them provided good quality amplification products and were retained for multiplex PCRs. Either the forward or reverse primer for each locus was 5' end labelled with a fluorescent dye (FAM, NED, PET or VIC). The 16

microsatellite loci were distributed in 2 multiplex sets on the basis of size limitation and amplification specificity (Table 1). Loci evaTC1-G11, evaTG1-D9, evaTG2-A7 and evaTC1-G12 were single amplified and mixed to multiplex PCR sets prior to genotyping. For microsatellite loci analysis, total DNA was extracted from single mite female using the DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen) following the spin-column protocol from Cultured Animal Cells slightly adapted for mites dividing volumes by two with an incubation at 70 °C for 3 hours and a final elution in 50 µL of DNase-free water. Amplifications were performed using the QIAGEN[®] Multiplex PCR Kit. Multiplex PCRs were conducted in 10 µL reaction volume containing 1X QIAGEN[®] Multiplex PCR Master Mix (including HotSartTaq DNA Polymerase, dNTPs and 3 mM of MgCl₂ as final concentration), 0.1 or 0.2 µM of each primer, about 10 ng of total DNA and DNase-free water. Multiplex PCRs consisted of an initial denaturation at 95 °C for 15 min, 40 cycles at 94 °C for 30 sec, annealing at 57 °C for 90 sec, extension at 72 °C for 60 sec and a final extension of 60 °C for 30 min. PCR products were detected using an ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems), 1 µL of the PCR product diluted at 1/300 was mixed with 18.9 µL of Hi-Di[™] formamide (Applied Biosystems) and 0.1 µL of GeneScan[™]-500 LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems). Alleles were scored using GeneMapper[®] V4.0 (Applied Biosystems). The level of polymorphism and allelic distribution were estimated using GENEPOP V3.4 (Raymond & Rousset 1995).

Table 1 summarizes the characteristics of the 16 microsatellite loci. Allelic variation was assessed in 31 females collected from each of the three populations from Southern France and 22 females collected in Uruguaiana (Rio Grande do Sul, Brazil). The number of alleles per locus ranged from 2 to 5. Several loci, although polymorphic, displayed a single allele per population. The arhenotokous mode of reproduction of *Tetranychus* species and their frequent

sibling matings (Hussey & Parr 1963) might account for a low polymorphism (Navajas *et al.* 2002). In addition, a bottleneck experienced during the invasion and reflected in the French populations, is consistent with the polymorphism detected in Brazil which is the supposed native area of *T. evansi*. Expected and observed heterozygosities ranged from 0.032 to 0.511 and 0.177 to 0.478, respectively (Table 1). No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was detected, except for 3 loci that showed significant homozygotes excess. After Bonferroni correction, there was indication of linkage disequilibrium among loci for evaTG1-D9, evaTC1-A8 and evaTC5-D2 together in the French populations.

Primer sequence conservation and level of microsatellite polymorphism were also examined in five other species of the genus *Tetranychus* which might be found together on the same plants in the field. In addition, eight other species were tested, five of the subfamily Tetranychinae and three of the subfamily Bryobiinae. Extractions and PCR amplifications were performed as described above. Results reported in Table 2 show that most loci will be useful for other species of the genus *Tetranychus*.

References

- Doyle JJ, Doyle JL (1997) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11-15.
- Hurtado Ruiz M, Ansaloni T, Cros-Arteil S, Jacas Miret JA, Navajas M (2008) 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. *Annals of Applied Biology* **153**, 167-174.

- 127 Jeppson LR, Keifer HH, Baker EW (1975) *Mites injurious to economic plants*. University of
128 California Press, Berkeley.
- 129 Kijas J, Fowler J, Garbett C, Thomas M (1994) Enrichment of microsatellites from citrus
130 genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated
131 magnetic particules. *Biotechniques*, **16**, 657-662.
- 132 Knapp M, Wagener B, Navajas M (2003) Molecular discrimination between the spider mites
133 *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern
134 Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae).
135 *African Entomology* **11**, 300-304.
- 136 Migeon A, Dorkeld F (2007) Spider Mites Web: a comprehensive database for the
137 Tetranychidae. <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/>.
- 138 Moraes GJ de, McMurtry JA, Baker EW (1987) Redescription and distribution of the spider
139 mites *Tetranychus evansi* and *T. marianae*. *Acarologia*, **28**, 333-343.
- 140 Hussey NW, Parr WJ (1963) Dispersal of the glasshouse red spider mite *Tetranychus urticae*
141 Koch (Acarina, Tetranychidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **6**, 207-214.
- 142 Navajas M, Perrot-Minnot MJ, Lagnel J, Migeon A, Bourse T, Cornuet JM (2002) Genetic
143 structure of the greenhouse population of the spider mite *Tetranychus urticae*: spatio-
144 temporal analysis with microsatellite markers. *Insect Molecular Biology*, **11**, 157-165.
- 145 Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP V3.4: population genetics software for exact tests
146 and ecumenism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- 147 Saunyama IGM, Knapp M (2003) Effects of pruning and trellising of tomatoes on red spider
148 mite incidence and crop yield in Zimbabwe. *African Crop Science Journal*, **11**, 269-
149 277.

150 Walbieser GC (1995) PCR-based identification of AT-rich tri- and tetranucleotide repeat loci
151 in an enriched plasmid library. *Bioetchniques*, **19**, 742-744.

152

153

154 **Acknowledgments**

155 We thank C Moreau for help in cloning procedures, JF Martin in calculating loci
156 polymorphism and JV Carus Guedes for collaboration in mite sampling in Brazil (IBAMA
157 Importation permit n° 07BR000808/DF). Genotyping data were produced using technical
158 facilities of the IFR119 "Montpellier Environnement Biodiversité"

159 **Table 1.** Microsatellite loci developed for *Tetranychus evansi*. The observed size allele range, total number of alleles (Total N_a), frequency of
160 the most common allele (f), and observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities were estimated from mites collected in natural populations.
161 Thirty one mites studied in each of the three populations from Southern France: Toreilles and Sainte-Marie (66: Pyrénées-Orientales, near
162 Perpignan), Saint-Jeannet (06: Alpes-Maritimes, near Nice), and 22 mites for one population from Brazil: Uruguaiana (RS: Rio Grande do Sul).
163

9

Locus	Core repeat (cloned allele)	Size of cloned allele (bp)	Size range (bp)	Total N_a	Torreilles (66)		Sainte-Marie (66)		Saint-Jeannet (06)		Uruguaiana (RS)		H_W	Primer (μ M)	Primer sequence (5'-3')	GenBank Accession no.
					f	H_e/H_o	f	H_e/H_o	f	H_e/H_o	f	H_e/H_o	test			
PCR multiplex set 1																
<i>evaTG1-D9^{SA}</i>	(AC) ₉	247	250-263	5	0.900*	0.177/0.000	0.968*	0.063/0	1.000	-/-	0.675*	0.478/0.25	*	0.2	F:PET-GCCAATTGAAGGGTTACAGG R:CATTACAAGCAATGTTATTACCAG	FJ426370
<i>evaTC2-A2</i>	(GA) ₁₂	174	172-176	4	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	0.500	0.511/0.478		0.2	F:PET-CAATTGATGGTTTCTGTTTGG R:CATTATCGCTTCACTCATCGTC	FJ426371
<i>evaATCT2-G11</i>	(GAT) ₁₃ (GAA) ₂	144	128-147	2	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-		0.1	F:GGTTGACCGTGAAGAGAG R:VIC-CAGAATGACAGTTACAATTGC	FJ426372
<i>evaTC1-G11^{SA}</i>	(GA) ₆ N ₂ (GA) ₁₄	313	299-318	3	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	0.591	0.495/0.364		0.1	F:CTGAAGCTCTTCAATGGCAC R:VIC-CAATCTTTTGCCTTTTGTCTC	FJ426373
<i>evaTC5-D2</i>	(GA) ₈	227	227-229	2	0.903*	0.177/0.000	0.968*	0.063/0.000	1.000	-/-	1.000	-/-	*	0.1	F:VIC-CATGTTTCTCAGACTATTATGATGC R:GAGGAACTTAATAGCTTTGTCTC	FJ426374
<i>evaTC5-E3</i>	(GA) ₁₀	301	305-316	2	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	0.870	0.232/0.087		0.2	F:CAAAACGGATCAACACAAGATG R:FAM-CAGAAAATAACAGGAAGCTGAAG	FJ426375
<i>evaTC3-D3</i>	(TC) ₁₄	126	118-124	3	0.984	0.032/0.032	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-		0.1	F:FAM-GTCGTCCGGGATTTTTTCTG R:GTTGCTTGTTTAATTGTTGTCACTG	FJ426376
<i>evaTC1-A8</i>	(CT) ₁₁ N ₆ (CAT) ₅	244	240-246	5	0.889*	0.175/0.000	0.968*	0.063/0.000	1.000	-/-	0.630*	0.476/0.391	*	0.1	F:GTTGAATTTACGGTAAACATGA	FJ426377
PCR multiplex set 2																
<i>evaTC2-A8</i>	(GA) ₉	284	282-284	4	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	0.929	0.136/0.143		0.2	F:NED-GTATTTACACCTTTGCAGAG R:GTTTGATTGAAAAGACAAAAGCC	FJ426378
<i>evaTC2-G2</i>	(GA) ₁₃	183	182-196	5	1.000	-/-	0.935	0.122/0.129	1.000	-/-	0.891	0.198/0.217		0.2	F:NED-CCGGATGAATGCTGAAGAG R:GATCAACAATCAACCTTAAAGTC	FJ426379
<i>evaTC1-G12^{SA}</i>	(AG) ₁₁	276	283-317	2	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	ND	-/-		0.2	F:GCTTGGCTTGAGACAGAATTGC R:PET-CCAGACTCATTGACCGATAGATTG	FJ426380
<i>evaTC1-H4</i>	(TC) ₈	170	173-175	2	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	0.783	0.348/0.348		0.2	F:PET-CGATATAATTGTCAATGGTG R:GTATCAAGTATATTCCTATATGATG	FJ426381
<i>evaATCT1-H4</i>	(GAC) ₆	188	170-188	2	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-		0.1	F:GCACAGTTGAGAACGGGCTAAG R:VIC-CCTGTTTCTTTACTCATCTGTCCC	FJ426382
<i>evaTG2-A7^{SA}</i>	(GAT) ₅ N ₈ (GT) ₆	303	283-285	2	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	0.789*	0.341/0.105	*	0.2	F:FAM-GTTTCATCTTTACCCTGTATTACTTC R:CTGACCTTGAGCCGCACC	FJ426383
<i>evaTC1-A12</i>	(GA) ₃ (TA) ₂ (GA) ₉	217	220-230	4	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	0.565	0.502/0.347		0.2	F:AGCATTTTAATGTTTCCTTTG R:FAM-GTTTCACTTGTAATGGCTATG	FJ426384
<i>evaTC1-F5</i>	(TC) ₁₁	127	118-126	2	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-	1.000	-/-		0.2	F:FAM-CTTTCAGGTCAGGTATCATAAGTC R:CTCTCGACCTCTTGATTCTCC	FJ426385

10

165 Notes: ^{SA}: Single amplified, *HW* test: Hardy-Weinberg exact test (Raymond & Rousset 1995); ND: No data; *: Loci with significant deviations
166 ($P < 0.05$) from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction; Primer: concentration for both forward and reverse primers.

167

For Review Only

11

168 **Table 2.** Cross-species amplification results for microsatellite loci developed for *Tetranychus evans*, in five species of *Tetranychus*, six species
169 of the Tetranychinae subfamily and three species of the Bryobiinae subfamily.

170

For Review Only

12

171

Species	Orig	evaTG1-D9	evaTC2-A2	evaATCT2-G11	evaTC1-G11	evaTC5-D2	evaTC5-E3	evaTC3-D3	evaTC1-A8	evaTC2-A8	evaTC2-G2	evaTC1-G12	evaTC1-H4	evaATCT1-H4	evaTG2-A7	evaTC1-A12	evaTC1-F5
Genus <i>Tetranychus</i>																	
<i>T. urticae</i>	F	230(1) N=2	170(1) N=2	118(1) N=2	—	220(1) N=2	—	—	245-250(2) N=2	—	—	259-271(2) N=2	—	197-203(2) N=2	—	—	135-137(2) N=2
<i>T. turkestanii</i>	F	230(1) N=2	166-170(2) N=2	122-124(2) N=2	—	223-225(2) N=2	—	—	247-258(3) N=2	—	—	261-271(3) N=2	—	200-216(3) N=2	—	—	139-144(2) N=2
<i>T. ludeni</i>	F	250(1) N=2	164(1) N=2	125(1) N=2	276(1) N=2	—	283(1) N=2	—	216(1) N=2	—	173(1) N=2	272(1) N=1	157(1) N=2	204(1) N=2	—	197(1) N=2	124(1) N=1
<i>T. neocaledonicus</i>	R	230(1) N=1	180(1) N=1	125(1) N=2	—	222(1) N=1	—	—	258(1) N=1	—	—	259(1) N=1	—	200(1) N=1	—	—	137(1) N=1
<i>T. amicus</i>	R	250(1) N=2	—	128 (1) N=1	—	—	—	—	249(1) N=1	—	167(1) N=1	280(1) N=1	—	216(1) N=1	—	—	126(1) N=1
Subfamily Tetranychinae																	
<i>Amphitetranychus viennensis</i>	F	—	156(1) N=2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Eotetranychus rubiphilus</i>	F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Eotetranychus tiliarium</i>	P	230(1) N=1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Oligonychus perseae</i>	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Panonychus citri</i>	F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Subfamily Bryobiinae																	
<i>Bryobia rubrioculus</i>	F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Schizonobia bundi</i>	F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Petrobia harti</i>	F	—	—	108(1) N=1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

172

13

173 The allelic size range (base pair) and the number of alleles in parenthesis are based on N individuals successfully genotyped per locus.

174 Amplification failure is indicate by a dash. 'Orig' indicate sample's origin: F (France), R (La Réunion), P (Poland), S (Spain).

175

For Review Only

Chapitre IV

IV Routes de colonisation de *Tetranychus evansi*

IV.1 Introduction

A la lumière des résultats des analyses décrites dans le chapitre précédent, des données connues sur la biologie de *T. evansi* et de l'histoire de l'invasion, nous avons essayé de répondre aux questions suivantes :

1. L'Amérique du Sud est-elle l'aire d'origine de *T. evansi* ?
2. Combien d'événements d'introduction ont-eu lieu dans les aires envahies ?
3. Une fois des introductions multiples détectées, peut-on détecter des signatures d'hybridation ?
4. Quel scénario évolutif explique le mieux la colonisation de l'Europe et de l'Afrique ?
5. Les données historiques et génétiques sont-elles compatibles ?

Les travaux portant sur la colonisation par *T. evansi* ont fait l'objet de deux articles qui se trouvent à la fin de ce chapitre.

IV.2 L'Amérique du sud est-elle l'aire d'origine de *Tetranychus evansi* ?

Quand j'ai débuté ce travail, *T. evansi* n'avait fait l'objet d'aucune étude visant à comprendre ou même décrire l'histoire de son expansion vers de nouvelles zones géographiques. Nous disposions uniquement de données historiques sur les signalements de l'espèce, souvent associés à des dégâts sur les cultures. Sur la seule base de signalements l'espèce a toujours été considérée comme étant native de l'Amérique du Sud (Encadré I). Nos résultats obtenus à l'aide des outils d'analyse moléculaire soutiennent cette hypothèse. En effet, l'aire native d'une espèce possède les populations les plus anciennes et les plus diverses (Navia *et al.*, 2005; Roderick, 2004; Roderick, Navajas, 2003; Scheffer, Grissell, 2003). Or, d'après nos résultats, c'est dans les populations d'Amérique du Sud que l'on trouve la diversité génétique la plus élevée.

Un autre argument en faveur d'une origine sud américaine de ce ravageur est la présence d'ennemis naturels efficaces dans cette partie du Monde. C'est dans les zones

Encadré I Historique de signalements de *Tetranychus evansi*

A partir d'une étude bibliographique basée sur des documents peu diffusés, Gutierrez et Etienne (1986) ont suggéré que cette espèce pourrait être originaire d'Amérique du Sud, où elle a été découverte pour la première fois, en 1952, dans le nord est brésilien (Silva, 1954). Jusqu'au début des années 1960, cette espèce a été trouvée à l'île Maurice, au Texas, en Floride et en Californie (voir II. 1.1). Gutierrez et Etienne (1986) ont également émis l'hypothèse qu'à partir de l'Amérique du Sud, cet acarien serait arrivé à l'île Maurice et de cette dernière il aurait été introduit à la Réunion fin 1976 ou début 1977 et aurait colonisé l'ensemble des Mascareignes. *Tetranychus evansi* a ensuite été signalé par la suite en Afrique continentale au Zimbabwe en 1979 (Blair, 1983), puis en Afrique du Sud vers 1985 (Meyer, 1996). En 1988, il a été signalé en Afrique du Nord au Maroc (El-Jaouani, 1988) et plus tard en Tunisie (Bolland *et al.*, 1998). Il a été également reporté à l'est du continent africain, en Somalie en 2003 (Seif *et al.*, 2003), mais aussi à l'ouest au Sénégal en 2004 (Duverney *et al.*, 2005). Depuis une dizaine d'années cette espèce a aussi été détectée dans plusieurs états du Pacifique (Hawaï, Taiwan et la côte orientale de la Chine méridionale). Les premières observations en Europe datent de 1992 au Portugal (Ferreira, Carmona, 1995) et de la fin de 1995 en Espagne (Ferragut, Escudero, 1999). Elle a par la suite été signalée dans le pourtour méditerranéen espagnol ainsi qu'aux Îles Canaries et à l'Île de Madère (Migeon *et al.*, 2009). Le premier signalement en France date de 2004 sur la morelle noire, près de la frontière espagnole, dans les Pyrénées-Orientales (Migeon, 2005). A la fin 2005, *T. evansi* a été trouvé au nord de l'Italie sur la tomate et la morelle noire (Castagnoli *et al.*, 2006) et à l'automne 2006, des prospections effectuées dans la Côte d'Azur ont permis de le découvrir à Menton et à Nice (Migeon, 2007). Il a été signalé dans le secteur méditerranéen oriental en 2005, en Israël sur *Solanum spp* (Ben-David *et al.*, 2007) et en Crète sur la morelle noire (Tsagkarakou *et al.*, 2007). En Amérique du Sud, de nouveaux signalements ont été rapportés au nord-ouest de l'Argentine (Furtado *et al.*, 2006). Le signalement le plus récent de cet acarien dans le bassin méditerranéen provient du nord-ouest de l'Algérie, dans la région de Mostaganem, où des infestations spectaculaires sur la pomme de terre et la tomate par *T. evansi* ont été constatées au courant de l'été 2008 (Guenauoui, 2010).

natives où les prédateurs ont été depuis longtemps en contact avec leurs proies qu'une coévolution proie/ prédateur a pu avoir lieu. Depuis plus de 60 années, *T. evansi* a été signalé au Brésil. Dès cette époque des dégâts importants ont été rapportés de Bahia (Silva, 1954) sur les tomates, mais aussi en Argentine (Rossi Simons, 1961). Ensuite, c'est à la fin des années 70 et début 80 que d'importants dégâts ont été signalés dans le pays. Ces pullulations ont eu lieu sur des cultures de tomates à Petrolina au nord-est du Brésil. Il s'agissait alors d'un changement des pratiques agricoles dans cette région avec l'introduction d'une nouvelle culture puisque la tomate n'y avait jamais été cultivée auparavant. L'absence de prédateurs efficaces de *T. evansi* dans cette région avait été suggérée comme étant la cause de son expansion. Par la suite, la production de tomate y a été abandonnée en raison des problèmes causés par *T. evansi* (De Moraes *et al.*, 1986). Les explosions démographiques sont courantes chez plusieurs espèces de *Tetranychus*. Néanmoins, dans le cas de *T. evansi*, il est important de signaler que depuis il n'a jamais été considéré comme un important ravageur de la tomate au Brésil (Furtado *et al.*, 2007). La présence d'ennemis naturels (prédateurs et pathogènes) de *T. evansi* sur les solanacées (Fiaboe *et al.*, 2007b; Furtado *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2005) pourrait expliquer le maintien des populations sous le seuil de nuisibilité économique. Parmi ces prédateurs, l'acarien *Phytoseiulus longipes* qui a été trouvé en association avec *T. evansi* sur la tomate et d'autres solanacées (Furtado *et al.*, 2007), s'est avéré être efficace et prometteur pour contrôler *T. evansi* (Ferrero, 2009). De même, le champignon pathogène *Neozygites floridana*, découvert au Brésil, a été signalé comme étant un agent de contrôle du ravageur et la cause du déclin des populations de *T. evansi* au Brésil (Humber *et al.*, 1981).

Un autre argument en faveur d'une origine sud américaine de *T. evansi* est le spectre de plantes hôtes qu'il exploite. Bien que signalé sur 94 plantes hôtes appartenant à 30 familles différentes (Migeon, Dorkeld, 2006), cet acarien montre une forte préférence pour la famille des solanacées aussi bien cultivées que sauvages. Or, on sait que la famille des solanacées est très diversifiée en Amérique du Sud. *Tetranychus evansi* est une des espèces les plus fréquemment rencontrées sur les solanacées sauvages natives et abondantes au Brésil (Rosa *et al.*, 2005). Cet ensemble d'arguments basés sur la biologie et l'écologie de *T. evansi* complète les informations tirées de notre analyse génétique et soutient l'hypothèse d'une origine sud américaine de l'espèce.

IV.3 Événement d'introduction dans les aires envahies

IV.3.1 Multiples introductions dans le bassin Méditerranéen

Les résultats obtenus sur la base des données mitochondriales et nucléaires sont cohérents. Ils séparent clairement les échantillons étudiés de *T. evansi* en deux principales lignées (I et II), qui coexistent en Amérique du Sud et dans le sud de l'Europe uniquement. Les populations introduites de la lignée II montrent une forte homogénéité génétique. Ceci supporte l'hypothèse d'un seul événement d'introduction en Europe pour cette lignée et ensuite une dissémination dans les autres régions depuis le point d'introduction. Si on se base sur les données mitochondriales et microsatellites, nos échantillons du nord-est du Brésil sont les plus proches de la source la plus probable de cette introduction. En revanche, la lignée I a montré une forte différenciation génétique dans les aires d'introduction et deux sous groupes (AF+EU) et (MED) ont été identifiés. Les résultats des analyses ABC suggèrent clairement que les acariens de la lignée I ont été d'abord introduits dans le sud de l'Espagne, en Andalousie, d'une population dont nos échantillons les plus proches sont ceux du sud-ouest du Brésil. Le temps de divergence estimé entre ces échantillons d'Andalousie et du Brésil est d'environ 140 ans. Par la suite, l'Andalousie semble avoir servi de source de colonisation pour des nouvelles zones. La forte homogénéité génétique révélée par nos données moléculaires au sein des populations du sous groupe MED suggère que le reste des pays méditerranéens (la Tunisie, la Grèce, l'Algérie et Israël) a été récemment colonisé depuis l'Andalousie. Selon les scénarios que nous avons testés, la colonisation du reste de l'Europe par la lignée I a eu lieu récemment depuis l'Afrique de l'est. Cependant, le scénario alternatif expliquant la colonisation de l'Afrique par des individus en provenance d'Europe eux-mêmes originaires d'Andalousie ne peut pas être définitivement exclu. A priori, il pourrait même être plus probable du fait de la proximité géographique entre l'Andalousie et les autres régions européennes. Nous avons donc réalisé une série d'analyses ABC pour tenter de résoudre l'ordre des événements d'introduction en Europe et en Afrique. Ces analyses soutiennent légèrement (probabilité a posteriori = 0,74) l'hypothèse de la colonisation de l'Europe depuis l'Afrique de l'est.

Ainsi, l'invasion de l'Europe par *T. evansi* semble s'être déroulée en deux étapes principales. La première étape correspond à l'introduction de l'acarien depuis son aire

d'origine, au Brésil, vers le sud de l'Europe. La deuxième étape s'est déroulée au sein des aires d'introduction, où l'expansion dans de nouvelles zones a eu lieu probablement à partir de ces points d'introduction.

En conclusion, deux événements d'introductions indépendants, originaires de deux régions distinctes du Brésil, semblent avoir eu lieu en Europe. Une fois introduits, ces acariens ont pu se disséminer dans de nouvelles régions à l'aide des activités humaines particulièrement par les échanges commerciaux des produits végétaux à une échelle géographique large. La dispersion à des échelles locales sera assurée naturellement (voir II.2.1.5).

IV.3.2 Événements d'introductions en Afrique et en Asie

Nos résultats ont révélé que l'Afrique et l'est de l'Asie sont colonisés par la lignée I et partagent les deux haplotypes majoritaires H1 et H4 observés dans le sud de l'Europe. Tous les échantillons du sud-est de l'Afrique correspondent à l'haplotype (H1) tout comme l'Amérique du Sud et la majorité des échantillons européens. Une forte homogénéité génétique associée à une faible variabilité génétique caractérise les populations de ces pays. Ceci suggère que la colonisation serait le résultat d'un seul événement d'introduction à partir d'une petite propagule. Les analyses ABC suggèrent que l'introduction de *T. evansi* en Afrique de l'est s'est probablement produite à partir de l'Andalousie il y a environ 26 ans donc au début des années 80. Le scénario alternatif est que la colonisation de cette région a eu lieu récemment à partir de l'Europe.

Quant à l'est de l'Asie, son invasion est caractérisée par une absence totale de variabilité génétique où un seul haplotype (H4) a été détecté au sein des échantillons analysés. Les individus de l'est de l'Asie génotypés à l'aide des marqueurs microsatellites sont regroupés avec le sous groupe MED. La région méditerranéenne (MED) incluant l'Andalousie, la Grèce, Israël et les pays du Maghreb (Tunisie et Algérie), ou l'Afrique de l'ouest (Niger), pourraient avoir joué un rôle en tant que source secondaire dans la colonisation de l'est de l'Asie par *T. evansi*.

IV.4 Événement d'hybridation

Nous avons mis en évidence que les échantillons de *T. evansi* peuvent être clairement séparés en deux lignées fortement divergentes. Les deux lignées ayant été détectées en Amérique du Sud et dans le sud de l'Europe ceci offre l'opportunité de trouver des zones de contact entre ces deux lignées. Nous les avons trouvées au Portugal uniquement. Les haplotypes H1 et H7 coexistent dans les mêmes localités et ils s'hybrident. Les résultats de nos analyses ABC suggèrent que l'événement d'hybridation s'est produit récemment depuis seulement 13 générations. Malgré la forte divergence génétique entre ces deux lignées et leur temps de divergence ancien, des croisements entre elles existent donc dans la nature. Cet événement d'hybridation confirme les résultats de croisements obtenus en laboratoire entre ces deux lignées et exclut la présence de taxons distincts au sein de cette espèce (Article I). Un autre événement d'introgession a été détecté dans une localité de l'est de l'Espagne où des individus de l'haplotype H4 ont des génotypes multilocus microsatellites caractéristiques du sous groupe AF+EU. D'autres allèles propres au sous groupe méditerranéen ont été détectés chez des individus qui appartiennent au sous groupe AF+EU à l'est de l'Espagne et aux Canaries. Ceci suggère qu'un flux de gènes existe, ce qui est vraisemblable en raison de la proximité géographique.

IV.5 Confrontation des données génétiques et historiques

Les données historiques constituent souvent une source importante d'informations pour reconstruire les routes d'invasion. Les premières phases de l'invasion (introduction et établissement) sont généralement caractérisées par un petit nombre d'individus fondateurs et une faible densité de population sans impact facilement reconnaissable. Pour la majorité des invasions, des incertitudes importantes réduisent donc la fiabilité de ces données pour reconstruire les routes de colonisation. Ces incertitudes deviennent plus grandes dans le cas d'organismes de petite taille, difficiles à détecter ou à identifier et présentant des similarités morphologiques avec d'autres espèces résidentes ou des envahisseurs précédents comme dans le cas des Tetranychidae. Dans le cas de *T. evansi*, la majorité des signalements a eu lieu lorsqu'il a atteint de fortes densités à l'origine d'importants dégâts sur les cultures de

solanacées. D'autre part, dans beaucoup de cas, *T. evansi* a été confondu avec d'autres tétranyques (voir II.1.1).

Les résultats de cette thèse ont permis de dégager certaines informations sur l'histoire de l'invasion de *T. evansi*. Les analyses génétiques révèlent la présence de deux lignées (I et II) génétiquement divergentes en Amérique du Sud qui semblent avoir envahi le sud de l'Europe bien avant le premier signalement. Les analyses ABC contredisent donc partiellement le scénario d'invasion établi initialement à partir des données historiques. Historiquement, *T. evansi* a d'abord colonisé l'Afrique australe. Il est signalé à l'île Maurice en 1954, à la Réunion en 1976, au Zimbabwe en 1979, en Afrique du Sud en 1985 et au Kenya en 2001 (Encadré I). Les premiers signalements de *T. evansi* en Europe remontent à 1991 au Portugal, 1995 en Espagne, 2004 en France, 2005 en Italie et 2006 en Grèce. Les résultats de nos analyses ABC suggèrent clairement que *T. evansi* serait d'abord arrivé en Europe dans le sud de l'Espagne (en Andalousie) depuis environ 140 ans, et plus récemment (il y a 30 ans), il aurait été introduit en Afrique de l'est. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir d'échantillons exploitables de l'île Maurice, ni de la Réunion. Toutefois, tous les acariens échantillonnés en Afrique orientale (Kenya et Tanzanie) et Australe (Afrique du Sud) ont montré une forte homogénéité génétique. Ce qui pourrait suggérer que les acariens de l'île Maurice appartiennent également à la lignée I. Les séquences mitochondriales obtenues sur les quelques individus de la Réunion que j'ai pu séquencer appartenaient toutes au groupe I (Figure 18 et 20). La date d'introduction de *T. evansi* en Europe (en Andalousie) suggérée par les analyses ABC est antérieure aux signalements historiques et correspond plutôt à la fin du XIX^e siècle (environ 1870). Cette période coïncide avec la révolution industrielle, caractérisée par la croissance du commerce international grâce au développement des transports et conduisant à une augmentation de la vitesse d'introduction de nouvelles espèces en Europe, et en particulier en provenance des Amériques (Hulme, 2009). En conséquence, de nombreuses espèces non indigènes introduites en Europe depuis plus de 200 ans, se sont établies dans de vastes régions du continent (Hulme, 2007; Hulme, 2009). Cependant, il ne faut pas perdre de vue que nous n'avons pas collecté une population que nous aurions pu identifier comme la source, mais des populations qui apparaissent comme les plus apparentées à cette source. Dans le cas de l'Afrique orientale, notre analyse suggère que l'introduction de *T. evansi* s'est probablement produite à partir de l'Andalousie vers 1981. Cette date correspond à la période où des fortes infestations causées par les tétranyques ont été signalées sur les cultures de tabac au Zimbabwe (Blair, 1983) et de tomates au Kenya (Knapp *et al.*, 2003). Dans le cas de *T. evansi*, le calendrier établi à partir des analyses ABC peut refléter

l'histoire du développement des activités humaines entre les régions concernées. L'introduction probablement récente de *T. evansi* dans les autres régions de l'Europe depuis l'Afrique de l'est peut refléter la modification récente des routes de commerce mondial. Le Kenya constitue un des importants exportateurs des produits végétaux (tomates, aubergine) vers l'Europe. Il est probable que *T. evansi* ait été introduit en Europe avec des produits agricoles. Les différentes interceptions de plants d'aubergine Kenyans infestés par *T. evansi* qui ont été observées en Grande-Bretagne à l'aéroport de Manchester en 2005 semblent aller dans ce sens. Le long temps de latence estimé entre l'introduction de *T. evansi* en Andalousie et sa diffusion vers de nouvelles aires pourrait être expliqué, entre autres, par les processus démographiques et génétiques décrits précédemment pendant la phase de la naturalisation (voir section I.4.1). En outre, il pourrait aussi correspondre au temps nécessaire à la sélection de nouveaux caractères mieux adaptés au nouvel environnement (Sakai *et al.*, 2001).

ARTICLE III

Boubou A., Migeon A., Roderick G., Navajas M. 2010. Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. *Biological Invasions*. doi: 10.1007/s10530-010-9791-y.

Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions

Recent emergence and multiple cryptic invasions of *Tetranychus evansi*

Angham Boubou · Alain Migeon ·
George K. Roderick · Maria Navajas

Received: 6 November 2009 / Accepted: 18 May 2010
© The Author(s) 2010. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Plant biosecurity is increasingly challenged by emerging crop pests. The spider mite *Tetranychus evansi* has recently emerged as a new threat to solanaceous crops in Africa and the Mediterranean basin, with invasions characterized by a high reproductive output and an ability to withstand a wide range of temperatures. Mitochondrial (868 bp of *COI*) and nuclear (1,137 bp of ITS) loci were analyzed in *T. evansi* samples spanning the current geographical distribution to study the earliest stages of the invasive process. The two sets of markers separate the samples into two main clades that are only present together in South America and Southern Europe. The highest *COI* diversity was found in South America, consistent with the hypothesis of a South American origin of *T. evansi*. Among the invaded areas, the Mediterranean region

displayed a high level of genetic diversity similar to that present in South America, that is likely the result of multiple colonization events. The invasions of Africa and Asia by *T. evansi* are characterized by a low genetic variation associated with distinct introductions. Genetic data demonstrate two different patterns of invasions: (1) populations in the Mediterranean basin that are a result of multiple cryptic introductions and (2) emerging invasions of Africa and Asia, each likely the result of propagules from one or limited sources. The recent invasions of *T. evansi* illustrate not only the importance of human activities in the spread of agricultural pests, but also the limits of international quarantine procedures, particularly for cryptic invasions.

Keywords *Tetranychus evansi* · Mitochondrial DNA · Emerging pest · Multiple introductions · Cryptic invasions

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:[10.1007/s10530-010-9791-y](https://doi.org/10.1007/s10530-010-9791-y)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Boubou · A. Migeon · M. Navajas (✉)
INRA, UMR CBGP (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro), INRA, Campus International de Baillarguet,
CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez Cedex, France
e-mail: navajas@supagro.inra.fr

G. K. Roderick
Environmental Science Policy and Management (ESPM),
University of California, 137 Mulford Hall MC 3114,
Berkeley, CA 94720, USA

Introduction

The increase in movement of both people and commodities internationally favours the spread of organisms outside their indigenous ranges. In the newly colonized areas, exotic species often become pests with dramatic consequences for biodiversity, agriculture, and human health. A recent survey of the causes of new plant disease emergence worldwide concluded that 56% of recent outbreaks result from

introductions associated with trade of plants and plant products and the movement of people (Anderson et al. 2004). In the case of invasive arthropods, annual damages caused by exotic insects and mites in the United States alone have been estimated to be at least \$16 billion (Pimentel et al. 2005). Climate change is likely to complicate further the impact of invasive plant pests. For example, a lengthening of the growing season in mid- and high latitudes of the northern hemisphere has been reported as a clear indicator of the responses by insect pests to a warmer climate (Menzel et al. 2008). As a result of both increased trade and climate change, emerging crop pests are likely to present new concerns for plant biosecurity, motivating research and new technologies to detect, identify and monitor pests and infectious diseases, and to modify strategies for plant crop protection (Rodoni 2009; Waage and Mumford 2008).

The red tomato spider mite *Tetranychus evansi* likely originated in South America and has emerged in only the last 10 years as a new destructive pest of solanaceous crops in many parts of the world. First reported from North-East Brazil in 1952 (Silva 1954), the mite was not considered a harmful pest in South America, except for a few outbreaks discovered in limited areas of Brazil (Humber et al. 1981). In the past half century the mite has since been collected from other continents including North America, many countries in sub-Saharan Africa, some Indian and Atlantic Ocean Islands, the Mediterranean basin, as well as from several parts in the Pacific Ocean (Hawaii, Taiwan, Japan and the south-eastern coast of China; see Migeon and Dorkeld 2006; Migeon et al. 2009 for a complete and chronological list). In the past decade, the pest status of *T. evansi* has changed and it is now regarded as a harmful invasive species in several parts in Africa and in the Mediterranean basin. In Africa *T. evansi* has become one of the most important dry season pests of tomatoes, causing yield losses of up to 90% in South-East Africa (Sibanda et al. 2000) and West Africa (Duverney and Nguaye-Ndiaye 2005). In the Mediterranean region, where several solanaceous field and glasshouse crops are economically important (tomato, potato, eggplant, etc.), the high invasive potential of *T. evansi* has prompted the recent addition of the species to the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) alert list (EPPO 2007).

Invasion of new areas by *T. evansi* is favored by its high intrinsic rate of increase within a broad range of temperatures (Bonato 1999). With an arrhenotokous mode of reproduction (females being diploid and haploid males developing from unfertilized eggs), a small number of founding individuals or even a single female can initiate new mite colonies that can build up rapidly as a result of several typical 'r-selected' traits including short generation time (Sabelis 1985) and high dispersal ability (Kennedy and Smitley 1985). In addition, because of its small size (0.3–0.5 mm depending on the development stage), *T. evansi* can be difficult to detect on plant shipments and may remain undetected in new localities until its presence is revealed by outbreaks and plant damage. These factors, often compounded by the fact that historical records for the species are incomplete, inaccurate or nonexistent, make it difficult to reconstruct reliably the invasion history. Information on population histories gained by genetic approaches is particularly valuable for species such as *T. evansi*, that are small or inconspicuous (Navia et al. 2005; Scheffer and Grissell 2003) and that resemble morphologically resident species or previous invaders (Müller 2001; Reitzel et al. 2008; Stepien and Tumeo 2006). Such undetected cryptic invasions are not uncommon for spider mites, eventually leading to considerable economic consequences (e.g. Knapp et al. 2003; Navajas et al. 2001).

This paper presents a genetic analysis of the emerging pest *T. evansi*, using two DNA sequence based markers, a fragment of the Cytochrome Oxidase subunit I (*COI*) of mitochondrial DNA (mtDNA) and the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA (rDNA). We include samples from the known geographical distribution of the species in South America, Africa, Asia and Southern Europe. Special effort in sampling the Mediterranean basin was made to understand the invasion process in this area, where *T. evansi* is currently rising as a significant pest. As a result of the coupling of: (a) information about the complex patterns of movement and historical demography obtained by genetic analysis, (b) knowledge of biological features associated with rapid population growth, and (c) the existence of reference collections that allow the predictions of potential distributions in the face of climate change (see Migeon et al. 2009), studies of *T. evansi* can be a model for understanding invasions of cryptic emerging invasive species.

Materials and methods

Sample collection

This study includes specimens of *T. evansi* from most parts of the world where it is currently known, including South America (Brazil and Argentina)—the assumed native area of the species—invaded areas on three continents (Africa, Europe and East Asia), where *T. evansi* has previously been reported, as well as additional new records (supplementary Table 1). Mites were collected between 2004 and 2008 from plants in the family Solanaceae and stored in 95% ethanol at -20°C for DNA analysis. Some individuals from each sample were preserved in 70% ethanol for further morphological verification of species identity involving observations of the shape of the male aedeagus under microscope preparations.

DNA extraction, amplification and sequencing

Total genomic DNA was isolated from individual adult females using the DNeasy tissue Kit (Qiagen, USA), following the protocol described in (Tsagkarakou et al. 2007a). Two target DNA fragments were PCR-amplified and sequenced: a fragment of the *COI*

mitochondrial gene (*COI*) and the internal transcribed spacer region (ITS: ITS1-5.8sRNA-ITS2). Several mites (1–9) per locality were sequenced for the *COI* (supplementary Table 1). Given the striking lack of variation of the ITS sequences with only two majority types detected worldwide (see results below), only 1–2 mites per locality were sequenced for this fragment. PCR conditions were as described previously (Tsagkarakou et al. 2007a) with modifications of annealing temperatures and primers used to amplify and sequence the ITS 1,137 base pairs (bp) and the *COI* 868 (bp) as described by Gotoh et al. (2009). PCR amplifications were carried out in an Eppendorf Mastercycler. PCR products were commercially sequenced (either by Cogenics, Meylan, France or Macrogen, Seoul, South Korea). GenBank accession numbers are included in Table 1.

DNA sequences alignment and analyses

Sequences were edited in the Seqscape package (SeqScape Software v.2.5, Applied Biosystems SeqScape® Software), and aligned using the default parameters of CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) and refined by eye. There were no insertions/

Table 1 Variable nucleotide sites in mitochondrial *COI* (a) and ITS ribosomal (b) sequences resulting in ten *COI* haplotypes (H1–H10) and three ITS types (T1–T3) and separated in two major clades, I and II (see Fig. 2)

a		Variable sites	Nucleotide divergence %										Genbank accession numbers
Clade	<i>COI</i> haplotypes												
		1111122 2223344455 566777778 1160001611 7993713625 833015574 0372398027 7055920939 147353784											
			H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	
I	H1	CTCAATGCAT TAACGCTCTG AGGTAGCAT	–										FJ440678
I	H2	T.....	0.12	–									GU145106
I	H3	A..C.....	0.23	0.35	–								GU145107
I	H4	C.....	0.12	0.23	0.35	–							FJ440677
I	H5	T.....	0.12	0.23	0.35	0.23	–						GU145108
I	H6	G.....	0.12	0.23	0.35	0.23	0.23	–					GU145109
II	H7	TCTGGAATG. CCG.A..TCA .AACTATGC	2.84	2.96	3.08	2.96	2.71	2.96	–				FJ440676
II	H8	TCTGGA.TG. CCG.A...CA .AACTA..C	2.35	2.47	2.59	2.47	2.47	2.47	0.46	–			FJ440675
II	H9	TCTGGAATG. CCG.A.C.CA .AACTA..C	2.59	2.71	2.59	2.71	2.71	2.71	0.46	0.23	–		GU145110
II	H10	TCTGGAATG. CCG.A..TCA .AACTA.GC	2.71	2.84	2.95	2.84	2.84	2.84	0.12	0.35	0.35	–	GU145111
b		ITS types											
		11 2700 8244 7358	T1	T3	T1/T3	T2							
I	T1	GAAA	–										FJ440674
I	T3	...G	0	–									GU145105
I	T1/T3	R..R	0	0	–								
II	T2	.GG.	0.18	0.18	0.18	–							FJ440673
II	T1/T2	.RR.											

Pairwise percent divergence for *COI* haplotypes and ITS types belonging to the two major clades were calculated (interclade divergences in bold). Positions of variable sites listed vertically above each site correspond to sequences deposited in Genbank. Dots indicate sequence matches to the first sequence

deletions in either *COI* or ITS regions. The boundaries of genes in the ITS regions were delimited by comparison to the ITS sequences in Hurtado et al. (2008), GenBank accession no. AM408033. Pairwise nucleotide divergence of *COI* and ITS sequences using the Kimura 2-parameter (K2P) model were calculated using the program Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA v.4, Tamura et al. 2007) and phylogenetic trees were constructed using the neighbour joining method (Saitou and Nei 1987). For comparison, we also generated a maximum likelihood tree [implemented in PhyML v.2. 4.4 (Guindon and Gascuel 2003)] employing the GTR + I model, as determined by Modeltest v.3.7 (Posada and Crandall 1998). The *COI* sequence of the closely related *Tetranychus urticae* (obtained in this study) was used as outgroup. Samples were pooled by country to calculate haplotype frequencies (supplementary Tables 1 and 2). When haplotype diversity within a country was high (i.e., presence of two haplotype clades, see below), samples were divided into regions (i.e., within Brazil, France, Spain and Portugal). In some cases, localities of several countries were pooled by geographical affinities based on sample size and sequence homogeneity (i.e., Kenya and Tanzania were pooled in the East Africa sample and the Argentinean sample from Corrientes was included in the Brazil-South West sample).

Indices of sequence diversity, including number of mtDNA haplotypes (N_h), haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π) and average number of pairwise nucleotide differences (K), were estimated using DnaSP v.4.20.2 (Rozas et al. 2003). These parameters were calculated for samples grouped into four geographical regions: (1) South America; (2) Mediterranean region (including Portugal, the Canary and the Madeira Islands); (3) Africa (including also Reunion Island), and (4) Asia; as well as for the two detected clades. Molecular analysis of variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992) as implemented in Arlequin v.3.1 (Excoffier et al. 2006) was used to assess the genetic differentiation among the four geographical regions (South American, Mediterranean region, Africa and Asia). Genealogical relationships among haplotypes of *COI* were reconstructed by a haplotype network analysis obtained by statistical parsimony method (default parsimony connection limit of 95%) implemented in the TCS v.1.21 software (Clement et al. 2000).

Results

Mitochondrial *COI* haplotypes

Analysis of 868 (bp) of mitochondrial *COI* DNA sequence data from 298 individuals revealed ten unique haplotypes. Among the sequences analysed, 29 segregating (polymorphic) sites were detected (Table 1a), 27 of which were parsimony-informative and two were singleton sites. Ten different haplotypes were identified representing 0.697 ± 0.021 and 0.0123 ± 0.0053 (mean $\pm$ SD) haplotype and nucleotide diversity, respectively.

The distribution of the *T. evansi* mtDNA haplotypes across the sampled continents is presented in Fig. 1. Several haplotypes were found in a single locality (H2, H3, H5, H6, H8, H9 and H10) while others were widely distributed (H1, H4 and H7). The most widely distributed haplotype (H1) was found with a global frequency of 48.7% in Africa, Europe and South America (Brazil-South West) (supplementary Table 2; Fig. 1). The two other most frequent haplotypes were H4 and H7 with global frequencies of 16.1 and 17.1%, respectively. Whereas H4 occurred widely (Africa, Asia and Europe), H7 was found in only three localities in Europe (France-South, Spain-North East, and Portugal). In most localities a single haplotype was detected, but in others either two (Brazil-South West, Portugal Center, and Reunion Is.) or three (Spain-East) haplotypes were found (supplementary Tables 1 and 2).

The highest *COI* diversity was found in South America with six out of ten haplotypes present ($h = 0.685 \pm 0.031$, $\pi = 0.0137 \pm 0.0004$, $K = 11.8$) (Table 2). Among the invaded areas, the Mediterranean region where four haplotypes were detected, displayed the highest genetic diversity ($h = 0.642 \pm 0.020$, $\pi = 0.0122 \pm 0.0008$, $K = 10.6$), which was similar to the level of genetic diversity in South American samples (Table 2a).

The phylogenetic reconstruction based on *COI* sequences separates the samples into two clades (99% of support through bootstrap analysis, Fig. 2a). The maximum likelihood tree (not shown) generated using GTR+I model was not different from the NJ topology shown and also supported the two major clades with high bootstrap values (Fig. 2a). Haplotypes in each clade were closely related and separated from each other by only one, and in a few

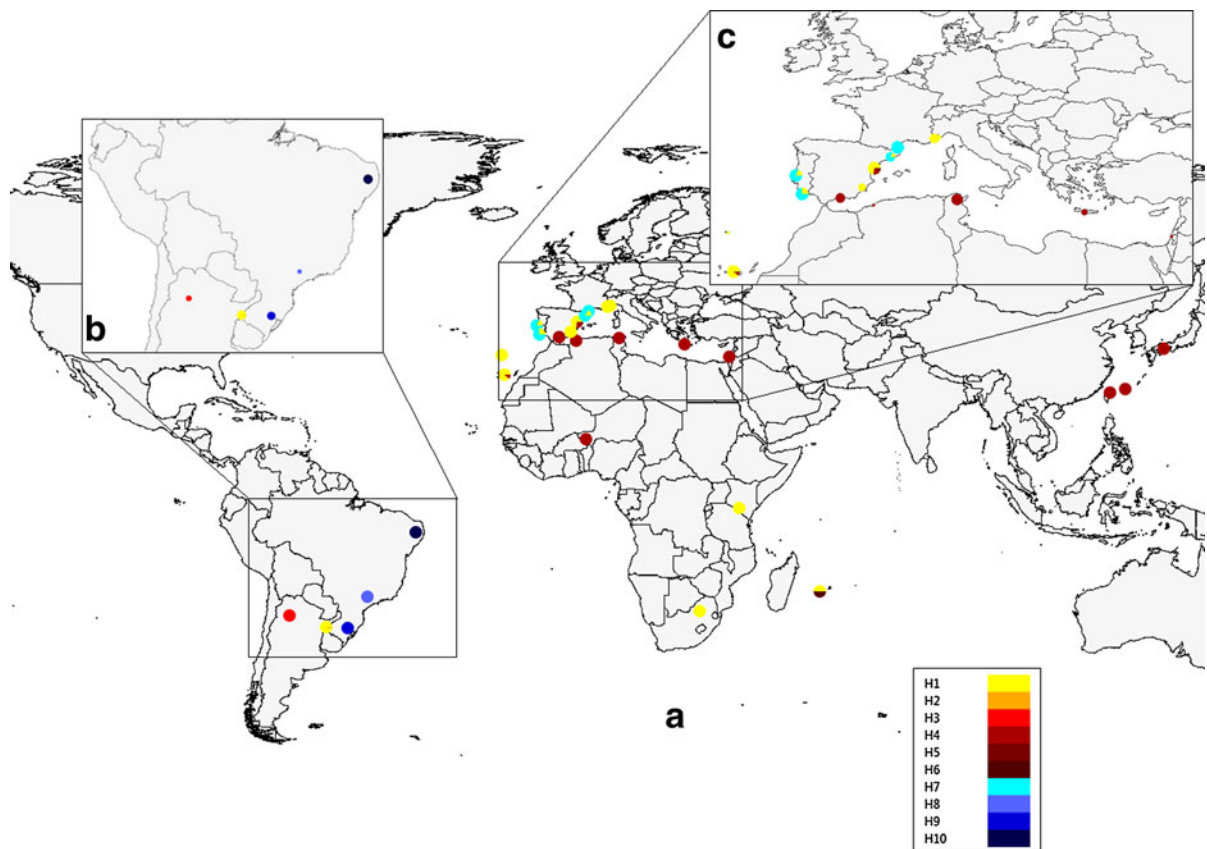


Fig. 1 **a** Distribution of mitochondrial DNA haplotypes of *Tetranychus evansi* across the geographical areas analyzed in this study. Nearby populations are pooled with the size of the

symbols proportional to the number of individuals sampled; **b** in South America and **c** in the Mediterranean Basin. Pie charts illustrate the proportion haplotypes at each sampled locality

Table 2 Number of analysed individuals (n), polymorphic sites (S), parsimony informative sites (PIS), number of haplotypes (Nh), haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π) and average number of differences (K) in mtDNA

	n	S	PIS	Nh	h	π	K
(a)							
South-America	78	26	25	6	0.6850 ± 0.0310	0.0137 ± 0.0004	11.8
Mediterranean region	166	25	25	4	0.6420 ± 0.0200	0.0122 ± 0.0008	10.6
Africa	42	2	1	3	0.2510 ± 0.0810	0.0003 ± 0.0001	0.3
Asia	12	0	0	1	0	0	0
(b)							
Clade I	203	6	4	6	0.4350 ± 0.0330	0.0006 ± 0.0001	0.5
Clade II	95	5	5	4	0.5950 ± 0.0300	0.0014 ± 0.0002	1.2

sequences computed for *Tetranychus evansi* mites collected from four geographical regions (a) and for two major clades (I and II; b)

cases two, nucleotide difference/s. Clade I showed a lower diversity ($h = 0.435 \pm 0.033$, $\pi = 0.0006 \pm 0.0001$, $K = 0.5$) than Clade II ($h = 0.595 \pm 0.030$,

$\pi = 0.0014 \pm 0.0002$, $K = 1.2$ Table 2b), included the two most common haplotypes worldwide (H1 and H4) and was represented in samples from all

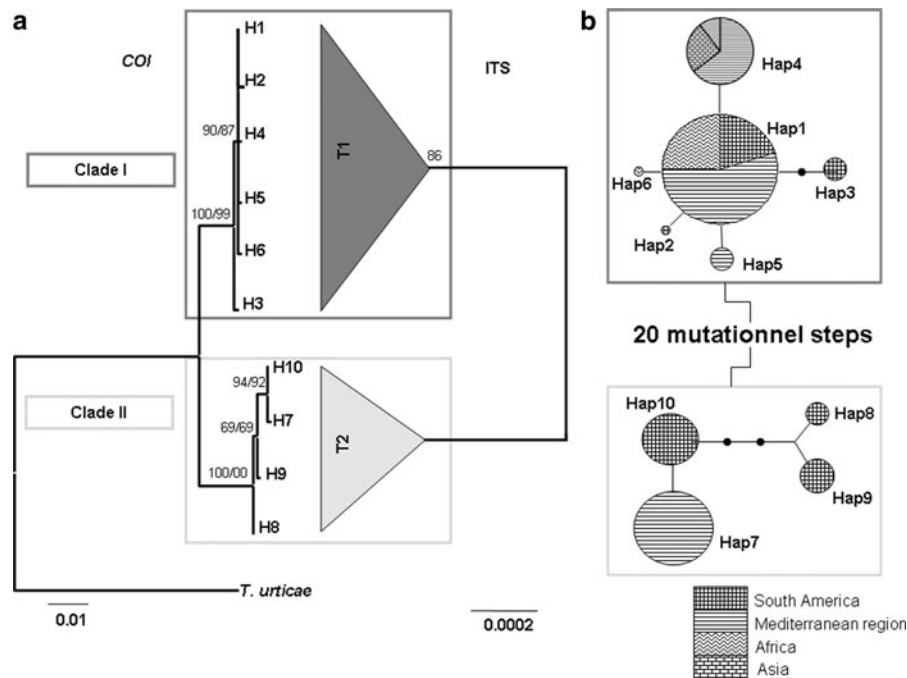


Fig. 2 **a** Phylogenetic reconstruction inferred through Neighbor-Joining based on mitochondrial *COI* (left) and ribosomal ITS sequences (right) from individual *Tetranychus evansi*. Numbers on branches indicate in the order bootstrap values for Neighbor-Joining and Maximum likelihood trees. *Tetranychus urticae* was used as outgroup. **b** A mitochondrial haplotype

network constructed from samples of *T. evansi* using statistical parsimony. The areas of the circles are proportional to the number of samples sharing each haplotype. Lines represent a single mutational step and small black circles represent an unobserved haplotype

continents. Clade II was represented in South American and Mediterranean samples only. These patterns of geographical differentiation support those from the TCS network, in which the two clades are separated from each other by 20 mutational steps (Fig. 2b). *COI* sequence divergence between the two clades averaged 2.72% in contrast to intra-clade divergences, which ranged from 0.12 to 0.35% and from 0.12 to 0.46% for clades I and II, respectively (Table 1a). Analysis by AMOVA shows that the genetic differentiation within each geographical region explains most (79%) of the total variance (Table 3), which

results from the presence of sequences of the two clades in South America and the Mediterranean region.

Internal Transcribed Spacer (rDNA ITS) variation

The complete ITS region (1,137 bp) was sequenced for a total of 96 individuals. Two major types of ITS sequences were found, named here T1 and T2, which differed from each other by two point mutations in the ITS2 region (positions 723 and 1,045). Variation among the two ITS types were consistent with the

Table 3 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) and estimators of genetic differentiation calculated for samples of *Tetranychus evansi*

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>F</i> _{st}
Among localities	3	228.327	1.26450 Va	20.97	0.20970*
Within localities	287	1368.920	4.76976 Vb	79.03	
Total	290	1597.247	6.03426		

Two sources of variation have been tested for four geographical regions (South America, Mediterranean region, Africa and Asia)

* represents $P < 0.01$, 1000 permutations

two *COI* clades revealed by the mtDNA sequence data. The single exception was ITS sequences (T3) found in the Argentina sample, which differed from T1 by a single point mutation (Table 2b). Four heterozygotes (T1/T3) were detected in this Argentinean sample of five individuals. Otherwise, ITS heterozygotes were rare: one individual from Portugal Center was a T1/T2 heterozygote. The most frequent (70.83%) and widely distributed ITS type was T1, which was found in most of the invaded areas as well as South West Brazil and Argentina (supplementary Table 2). The T2 type (22.92%) was found in some parts of the West Mediterranean region (France-South, Spain-North East and Portugal) and in the Atlantic Brazilian Coast which includes the North East, South East and South Brazil samples.

Discussion

Origins of invasive *Tetranychus evansi*

A common assumption, though not always correct, is that the geographical natal range of a species contains the oldest populations which will therefore have the greatest genetic diversity (Lozier et al. 2009; Nardi et al. 2005; Roderick 2004). In this study, patterns of genetic variation of *T. evansi* are consistent with the hypothesis of a South American origin of the species. Populations in South America were found to contain six out of the ten identified mitochondrial haplotypes and the single variant (T3) of the most common ITS sequence (T1), despite a relatively small sample size (the cumulative number of individuals analyzed in the other continents was approximately three times as great). Although the measured genetic diversity of *T. evansi* would certainly increase with a greater number of populations examined (as modeled for several invasive species, Puillandre et al. 2008), the sample from South America comprises collections from Recife (Brazil) to Tucuman (Northern Argentina), covering more than 3,800 km, spanning the distribution area of the pest. *Tetranychus evansi* is not evenly distributed in Brazil and geographical predictions based on climatic modelling pinpointed the Atlantic coast and South Brazil as the most suitable geographical areas for the species (Migeon et al. 2009). More generally, based on predictions modelled by CLIMEX by these authors, the potential

distribution of *T. evansi* worldwide appears limited by cold stress together with the impact of other climatic parameters, mainly dryness and humidity. The restricted geographical distribution of *T. evansi* in South America, which has been confirmed by several intensive surveys (Da Silva et al. 2008; Furtado et al. 2005; Furtado et al. 2006) might be explained by climatic conditions, but could also reflect other environmental or ecological factors. Low densities of *T. evansi* were generally observed in South America compared to most of the newly invaded continents where the mite undergoes heavy outbreaks, such as in Africa (Saunyama and Knapp 2003) and in Southern Europe along the Spanish Mediterranean coast (Ferragut and Escudero 1999).

Among the factors that might account for different mite densities in the native and invaded areas is competition with other tetranychid species, which are abundant on solanaceous plants in Brazil [32 and 17 tetranychid species have been reported from solanaceous plants in South America and Europe, respectively (Migeon and Dorkeld 2006)]. In addition, effective native natural enemies in South America maintain *T. evansi* populations at low densities (Furtado et al. 2005; Furtado et al. 2006; Rosa et al. 2005). For example the neotropical predatory mite *Phytoseiulus longipes* has been described as successfully developing on *T. evansi* (Maxime Ferrero, personal communication; Furtado et al. 2007), and several other mite predators of the family Phytoseiidae have been reported associated with *T. evansi* on tomato and wild solanaceous plants in Brazil (Fiaboe et al. 2006; Furtado et al. 2006; Rosa et al. 2005). A fungal pathogen was also suggested as the causative agent of the decline of *T. evansi* populations in northeastern Brazil, when in 1979 occasional outbreaks in tomato field crops were reported (Humber et al. 1981). However, outside of South America, several attempts to control *T. evansi* with different mite predators that have been used successfully on other *Tetranychus* species, have not shown promising results (Escudero and Ferragut 2005; De Moraes and McMurtry 1985). These findings are consistent with the enemy release hypothesis, which predicts less predatory pressure in introduced populations (Keane and Crawley 2002). Knowledge of a South American origin of *T. evansi* should help to target regions for additional exploration of biocontrol candidates (see Roderick and Navajas 2003).

Species-wide genetic homogeneity and invasion events

Assuming a South American origin of *T. evansi*, the invasion of new areas by this mite sampled in this study, except Mediterranean region, was characterized either by a very low genetic diversity (e.g., Africa) or no genetic variation (e.g., East Asia). A paradox often encountered in genetic studies of invasive species, is a colonization success of the introduced populations despite a strong reduction of genetic diversity (Frankham 2005; see also reviews by Dlugosch and Parker 2008 and Roman and Darling 2007). Several studies to date have shown that founder effects and bottlenecks are not an obstacle for invasion success (Ahern et al. 2009; Puillandre et al. 2008; Solignac et al. 2005), whereas plasticity in life history traits seems to be important for the successful expansion of an invasive species (Chen et al. 2006; Valiente et al. 2010; Wang et al. 2005). Mites belonging to clade I have been found across a wide range of habitats and regions beyond the predicted geographical distribution as modeled based on climatic suitability *T. evansi* (Migeon et al. 2009). Although well established in the Mediterranean basin where climatic conditions are favorable to the species, haplotype H4 also occurs beyond the modeled climatic borders for the species, such as near the Southern Sahelian border, where according to modeling predictions (Migeon et al. 2009) dryness should limit the distribution. Likewise, in Asia the same haplotype was detected in areas predicted to experience stress through humidity (in Taiwan) or cold (in Japan). With an unexpected wide range of climatic conditions being tolerated by one of the *T. evansi* haplotypes, its increasing distribution is not likely to be well predicted by existing climate-based modeling, and special attention should be given to its expansion worldwide.

Colonization from multiple sources may mitigate the loss of genetic diversity needed to face novel selective challenges as encountered in the new invaded areas (Facon et al. 2006; Kolbe et al. 2004; Roman 2006). The genetic variability of mites from the western Mediterranean region was the highest among the colonized areas. Given that records of *T. evansi* in the colonized areas date from less than 50 years ago, and considering a mutation rate of mitochondrial genes typically estimated at 1.4–2.3% per million years in

Arthropods (Xu et al. 2006), it seems unlikely that the haplotype diversity originated in the new region, but rather represents the combined effects of ancestral diversity and multiple introduction events. Although the level of divergence (ranging from 2.35 to 3.08%), between the two mtDNA clades detected might suggest the presence of two distinct taxa within a species complex, evidence of a single species exists. First, a comparable amount of intraspecific genetic diversity of *COI* sequences has been found within other Tetranychidae mite species (ranging from 1 to 6%) (Navajas and Boursot 2003; Navajas et al. 1994; Navajas et al. 1999; Navajas et al. 1998). Second, we have detected ITS sequence hybrids (each of the ITS types corresponds to one of the two *COI* clades) in the same sample (from Portugal), thus showing that crosses between mites stemming from the two clades are not only possible, but exist in nature. Additional evidence of conspecificity for individuals of the two clades comes from cross breeding experiments, which demonstrated fertile F1 females, although with some incompatibility (Gotoh et al. 2009).

Invasion pathways

In Africa, where the oldest records of *T. evansi* outside the Americas have been reported [in 1952 from the Mauritius Is. (Moutia 1958) and in 1979 from Zimbabwe (Blair 1983)], the colonization of wide areas by *T. evansi* results from unique introductions (for example, a single haplotype, H1, was detected in 13 samples from Kenya, Tanzania and South Africa). With H1 also encountered in Southwest Brazil, this region might be a potential source of the invasion of the African continent. Haplotype H4 from clade I, found in the Maghreb countries and Niger, is largely distributed in the Mediterranean basin and is the only one found in Japan and Taiwan. The virtual lack of genetic diversity in Asian samples supports a single and recent introduction event. The first documented record in Asia is from Taiwan in 2001 (Ho et al. 2004), although older reports of misidentified *T. evansi* from Taiwan exist back to 1992 (Ho and Wang 2007) with subsequent reports from Japan in 2002. All current mite records of *T. evansi* in Asian continent were from regions surrounding port cities such as Kagoshima, Tokyo, Osaka, Kyoto, Fukuoka and Okinawa in Japan (T. Gotoh, unpublished data) and from Taitung in Taiwan, suggesting the central role of human

commodities in the invasion of Asia by *T. evansi*. It remains however, unclear whether a single introduction event or several from the same source are responsible for colonization of this region. It cannot be ruled out that the Mediterranean region or the Western Africa, where mites bear the same haplotype, might have played a role as a secondary source in the colonization of *T. evansi* of the Asian continent.

Emerging pest: lessons learned by *Tetranychus evansi*

Among the different haplotypes present in the Mediterranean region, H1 and H4, both from clade I, are the most widely spread, whereas a single haplotype of clade II (H7) was found in a restricted area of the Mediterranean region. Worth noting is that H1 and H4 are in areas where heavy mite outbreaks have been reported, e.g. in South-East Africa (Saunyama and Knapp 2003; Sibanda et al. 2000), West Africa (Duverney and Ngueye-Ndiaye 2005), Spain (Ferragut and Escudero 1999), and where we have also observed the mite in the field on tomato and eggplant greenhouses in France and in the Canary Is. and on pepper and potatoes in Algeria (Yamina Guenaoui, personal communication). By contrast, high mite densities in regions where H7 and other haplotypes belonging to the clade II are present have never been reported and mite populations have been observed associated with wild solanaceous plants such as nightshade, *Solanum nigrum*. In addition to differences in host associations, the two clades also appear to differ in invasive potential, with mites from clade I having a higher invasive potential having colonized the entire Mediterranean basin, together with Africa and East Asia. Demographic parameters and adaptive performance underlying the differential invasive success of mites of clade I and II, are currently under investigation. The existence of two biologically distinct clades that differ in invasive potential is similar to what is known about the recent invasive biology of the tropical whitefly with *Bemisia tabaci*, which there exist at least two worldwide invasive biotypes, B and Q, (Boykin et al. 2007). Biotype Q is dominant in the Mediterranean basin and shows performance differences related to extreme temperature (Bonato et al. 2007) and to insecticide tolerance (Horowitz et al. 2005; Tsagkarakou et al. 2007b).

The threat that *T. evansi* represents for local agriculture in the Mediterranean basin is increased by the sympatric presence of distantly related mites. In the case of multiple introductions which might have unequal potential for becoming invasive (Allendorf and Lundquist 2003; Jousson et al. 2000; Sakai et al. 2001), crosses among individuals from distant populations might generate novel genetic combinations leading to new traits which eventually results in increased invasiveness (Allendorf and Lundquist 2003; Ellstrand and Schierenbeck 2000; Facon et al. 2006; Lee 2002). Hybrid vigour has been invoked to explain why some introduced populations may overcome their parents' fitness in new environments (Facon et al. 2005) and the reproductive compatibility between mites from the two clades has recently been demonstrated (Gotoh et al. 2009).

Tetranychus evansi is regarded as an important agricultural pest in Southern Europe but also in South East Africa and the detection of different lineages with different invasive potential is crucial to help in designing pest management strategies involving quarantine measures and the search for biocontrol candidates. The assumption that a local adaptation between biological control agents and the invasive genotypes of a pest exists (see Hufbauer and Roderick 2005), implies a targeted search of natural enemies in the area of provenance of the particular invasive genotypes. Among several mite predators reported associated with *T. evansi* in Brazil, only Brazilian (Furtado et al. 2007) and Argentine (Maxime Ferrero, personal communication) *P. longipes* populations were the most promising to control *T. evansi* populations in introduced areas. By contrast, the Chilean (Maxime Ferrero, personal communication) and South African populations (De Moraes and McMurtry 1985) of this mite predator are inefficient to control *T. evansi*.

This study illustrates the extent to which molecular markers can aid in the study of an emerging pest in the earliest stages of the invasion process and thus help to address questions related to management and biosecurity. Unfortunately, regulation generally does not take into account the fact that some genotypes of an invasive species may differ in invasive potential (Allendorf and Lundquist 2003). Human activities have played a significant role in explaining the present distribution of *T. evansi*, and thus monitoring pathways will be critical for its control. The spread of

T. evansi throughout the world is testimony of the limits of international quarantine measures, particularly important in the case of inconspicuous pests, which are prone to cryptic invasions. Integrating international cooperation will be critical to identify sources and pathways of invasion as well as build and/or maintain resilience to invasion to enhance plant biosecurity for emerging arthropod pests.

Acknowledgements We are grateful to P. Auger, R. Hufbauer, P. Jarne and G. Kargoat for helpful discussions on this work. We thank T. Gotoh, Ibaraki University, Japan, for providing unpublished data of the distribution of *T. evansi* haplotypes in Japan. We are also grateful to all the persons who have collected and contributed mites for this project: T. Ben-David (The Hebrew University of Jerusalem, Israel), P. Caplong (FDGDON, La Réunion), M. Castagnoli (CRA, Firenze), G. Daubigny (IRD-CBGP, Montpellier), G. De Moraes (Universidade de São Paulo, Brazil), F. Ferragut (Universidad Politécnica, Valencia, Spain), M. Ferrero (SupAgro, Montpellier), M. G. C. Gondim (UFR, Recife), T. Gotoh (Ibaraki University, Japan), J. V. C. Guedes (UF, Santa Maria), Y. Guenaoui (Mostaganem, Algeria), E. Hernández-Suárez (ICIA, Canary Islands), K. Hima (AGRHYMET, Niger), M. Knapp (ICIPE, Nairobi), S. Kreiter (SupAgro, Montpellier), K. Lebdi Grissa (INAT, Tunis), S. Magalhães (Instituto Gulbenkian de Ciência, Portugal), P. Martini (IRF, Sanremo), D. Navia (EMBRAPA, Brasília), J. P. Quéré (INRA-CBGP, Montpellier), S. Rapetti (IRF, Sanremo), R. Santos de Mendonça (EMBRAPA, Brasília), S. Simoni (CRA, Firenze), S. Toledo (EEAOC, Tucuman), F. J. Toroitich (ICIPE, Nairobi), A. Tsagkarakou (Heraklion, Greece). This work benefited from a France/Berkeley Fund grant on “Invasive Insects and Mites of Mediterranean Climates” to MN and GKR and an EGIDE-Picasso 2008-17080QH grant from the French Ministère des Affaires Étrangères et Européennes to MN. Financial support for field trips in Portugal was provided by the PESSOA exchange programme accorded to Sara Magalhães, University of Lisbon and Isabelle Olivieri, University of Montpellier.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Ahern R, Hawthorne D, Raupp M (2009) Founder effects and phenotypic variation in *Adelges cooleyi*, an insect pest introduced to the eastern United States. *Biol Invasions* 11:959–971
- Allendorf FW, Lundquist LL (2003) Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conserv Biol* 17:24–30
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 19:535–544
- Blair BW (1983) *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae): a new pest of tobacco in Zimbabwe. In: Corest phytopathology and agronomy study group, Bergerac
- Bonato O (1999) The effect of temperature on life history parameters of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* 23:11–19
- Bonato O, Lurette A, Vidal C, Fargues J (2007) Modelling temperature-dependent bionomics of *Bemisia tabaci* (Q-biotype). *Physiol Entomol* 32:50–55
- Boykin LM, Shatters RG Jr, Rosell RC et al (2007) Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 44:1306–1319
- Chen Y, Opp S, Berlocher S, Roderick G (2006) Are bottlenecks associated with colonization? genetic diversity and diapause variation of native and introduced *Rhagoletis completa* populations. *Oecologia* 149:656–667
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9:1657–1660
- Da Silva F, De Moraes G, Knapp M (2008) Distribution of *Tetranychus evansi* and its predator *Phytoseiulus longipes* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) in southern Brazil. *Exp Appl Acarol* 45:137–145
- De Moraes GJ, McMurtry JA (1985) Comparison of *Tetranychus evansi* and *T. urticae* (Acari: Tetranychidae) as prey for eight species of phytoseiid mites. *Entomophaga* 30:393–397
- Drugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol Ecol* 17:431–449
- Duverney C, Nguaye-Ndiaye A (2005) Essais préliminaires pour limiter les dégâts de Tetranychidae sur les cultures maraîchères dans le Sine-Saloum (Sénégal). In: Comptes rendus du deuxième colloque international sur les acariens des cultures. AFPP Paris, Montpellier
- Ellstrand NC, Schierenbeck KA (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7043–7050
- EPPO (2007) European and mediterranean plant protection organization. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. (<http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm>). Accessed 25 Sep 2009
- Escudero LA, 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). *Biol Control* 32:378–384
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006) Arlequin version 3.01: an integrated software package for population genetic data analysis. *Computational and Molecular*

- Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland
- Facon B, Jarne P, Pointier JP, David P (2005) Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoidea tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *J Evol Biol* 18:524–535
- Facon B, Genton BJ, Shykoff J, Jarne P, Estoup A, David P (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends Ecol Evol* 21:130–135
- Ferragut F, Escudero LA (1999) *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari, Tetranychidae), una nueva araña roja en los cultivos hortícolas españoles. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 25:157–164
- Fiaboe KKM, Fonseca RL, De Moraes GJ, Ogol CKPO, Knapp M (2006) Identification of priority areas in South America for exploration of natural enemies for classical biological control of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in Africa. *Biol Control* 38:373–379
- Frankham R (2005) Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity* 94:385–385
- Furtado I, Kreiter S, De Moraes GJ, Tixier MS, Flechtman C, Knapp M (2005) Plant mites (Acari) from Northeastern Brazil, with descriptions of two new species of the family Phytoseiidae (Mesostigmata). *Acarologia* 45:131–143
- Furtado PI, De Moraes JG, Kreiter S, Knapp M (2006) Search for effective natural enemies of *Tetranychus evansi* in south and southeast Brazil. *Exp Appl Acarol* 40:157–174
- Furtado IP, De Moraes GJ, Kreiter S, Tixier MS, 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). *Biol Control* 42:139–147
- Gotoh T, Araki R, Boubou A, Migeon A, Ferragut F, Navajas M (2009) Evidence of co-specificity between *Tetranychus evansi* and *T. takafujii* (Acari: Prostigmata, Tetranychidae) suggested by molecular, morphological and compatibility data: comments on taxonomical and agricultural aspects. *Int J Acarol* 35:485–501
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704
- Ho CC, Wang SC (2007) Addendum on the records of *Tetranychus evansi* in Taiwan. *Plant Prot Bull* 49:167–168
- Ho CC, Wang SC, Chien YL (2004) Field observation on two newly recorded spider mites in Taiwan. *Plant Prot Bull* 47:391–402
- Horowitz AR, Kontsedalov S, Khasdan V, Ishaaya I (2005) Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Arch Insect Biochem Physiol* 58:216–225
- Hufbauer RA, Roderick GK (2005) Microevolution in biological control: mechanisms, patterns, and process. *Biol Control* 35:227–239
- Humber R, De Moraes G, dos Santos J (1981) Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* sp (Zygomycetes: Entomophthorales) in northeastern Brazil. *Biocontrol* 26:421–425
- Hurtado MA, Ansaloni T, Cros-Arteil S, Jacas JA, Navajas M (2008) 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
- Jousson O, Pawlowski J, Zaninetti L, Zechman FW, Dini F, Di Guiseppe G, Woodfield R, Millar A, Meinesz A (2000) Invasive alga reaches California. *Nature* 408:157–158
- Keane RM, Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends Ecol Evol* 17:164–170
- Kennedy G, Smitley D (1985) Dispersal. In: Helle W, Sabelis MW (eds) Spider mites, their biology, natural enemies and control. Elsevier, Amsterdam, pp 233–242
- Knapp M, Wagener B, Navajas M (2003) Molecular discrimination between the spider mites *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Afr Entomol* 11:300–304
- Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LRG, Lara AC, Larson A, Losos JB (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* 431:177–181
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol Evol* 17:386–391
- Lozier J, Roderick G, Mills N (2009) Tracing the invasion history of mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae), in North America: a population genetics approach. *Biol Invasions* 11:299–314
- Menzel A, Estrella N, Heitland W, Susnik A, Schleip C, Dose V (2008) Bayesian analysis of the species-specific lengthening of the growing season in two European countries and the influence of an insect pest. *Int J Biometeorol* 52:209–218
- Migeon A, Dorkeld F (2006) Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/>. Last update 15 June 2009. Accessed 25 Sep 2009
- Migeon A, Ferragut F, Escudero-Colomar L, Fiaboe K, Knapp M, de Moraes G, Ueckermann E, Navajas M (2009) Modelling the potential distribution of the invasive tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* 48:199–212
- Moutia LA (1958) Contribution to the study of some phytophagous acarina and their predators in Mauritius. *Bull Entomol Res* 49:59–75
- Müller J (2001) Invasion history and genetic population structure of riverine macroinvertebrates. *Zoology* 104: 346–355
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol Ecol* 14:2729–2738
- Navajas M, Boursot P (2003) Nuclear ribosomal DNA monophyly versus mitochondrial DNA polyphyly in two closely related mite species: the influence of life history and molecular drive. *Proc R Soc Lond B* 270:124–127
- Navajas M, Gutierrez J, Bonato O, Bolland HR, Mapangou-Divassa S (1994) Intraspecific diversity of the Cassava Green Mite *Mononychellus progreivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp Appl Acarol* 18:351–360
- Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P (1998) Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with

- extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80:742–752
- Navajas M, Gutierrez J, Lagnel J, Fauvel G, Gotoh T (1999) DNA sequences and cross-breeding experiments in the hawthorn spider mite *Amphitetranychus viennensis* reveal high genetic differentiation between Japanese and French populations. *Entomol Exp Appl* 90:113–122
- Navajas M, Gutierrez J, Williams M, Gotoh T (2001) Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangeae* (Acari: Tetranychidae), shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments. *Bull Entomol Res* 91:117–123
- Navia D, De Moraes GJ, Roderick G, Navajas M (2005) The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. *Bull Entomol Res* 95:505–516
- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecolog Econ* 52: 273–288
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818
- Puillandre N, Dupas S, Dangles O, Zeddiam JL, Capdevielle-Dulac C, Barbin K, Torres-Leguizamon M, Silvain JF (2008) Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biol Invasions* 10:319–333
- Reitzel A, Darling J, Sullivan J, Finnerty J (2008) Global population genetic structure of the starlet anemone *Nematostella vectensis*: multiple introductions and implications for conservation policy. *Biol Invasions* 10:1197–1213
- Roderick GK (2004) Tracing the origin of pests and natural enemies: genetic and statistical approaches. In: Ehler LE, Sforza R, Mateille T (eds) *Genetics, evolution, and biological control*. CAB International, Wallingford, pp 97–112
- Roderick GK, Navajas M (2003) Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Rev Genet* 4:889–899
- Rodoni B (2009) The role of plant biosecurity in preventing and controlling emerging plant virus disease epidemics. *Virus Res* 141:150–157
- Roman J (2006) Diluting the founder effect: cryptic invasions expand a marine invader's range. *Proc R Soc Lond B* 273:2453–2459
- Roman J, Darling JA (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends Ecol Evol* 22: 454–464
- Rosa AA, Gondim MGC, Fiaboe KKM, De Moraes GJ, Knapp M (2005) Predatory mites associated with *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) on native solanaceous plants of coastal Pernambuco State, Brazil. *Neotrop Entomol* 34:689–692
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496–2497
- Sabelis MW (1985) Reproductive strategies. In: Helle W, Sabelis MW (eds) *Spider mites, their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam, pp 265–278
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN, Weller SG (2001) The population biology of invasive species. *Ann Rev Ecol Syst* 32:305–332
- Saunyama IGM, Knapp M (2003) Effects of pruning and trellising of tomatoes on red spider mite incidence and crop yield in Zimbabwe. *Afr Crop Sci J* 11:269–277
- Scheffer SJ, Grissell EE (2003) Tracing the geographical origin of *Megastigmus transvaalensis* (Hymenoptera: Torymidae): an African wasp feeding on a South American plant in North America. *Mol Ecol* 12:415–421
- Sibanda T, Dobson HM, Cooper JF, Manyangarirwa W, Chiimba W (2000) Pest management challenges for smallholder vegetable farmers in Zimbabwe. *Crop Prot* 19:807–815
- Silva P (1954) Um novo ácaro nocivo ao tomateiro na Bahia. *Bol Inst Biol Bahia* 1:1–20
- Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D et al (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee *Apis mellifera*, are two partly isolated clones. *Proc R Soc Lond B* 272:411–419
- Stepien CA, Tumeo MA (2006) Invasion genetics of Ponto-Caspian gobies in the Great Lakes: a cryptic species, absence of founder effects, and comparative risk analysis. *Biol Invasions* 8:61–78
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Toroitch F, Navajas M, Knapp M (2008) Molecular analysis of the genetic diversity of *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard from Kenya and Tanzania. In: VIth European Congress of Acarology, Montpellier, Poster
- Tsagkarakou A, Cros-Arteil S, Navajas M (2007a) First record of the invasive mite *Tetranychus evansi* in Greece. *Phytoparasitica* 35:519–522
- Tsagkarakou A, Tsigenopoulos CS, Gorman K, Lagnel J, Bedford ID (2007b) Biotype status and genetic polymorphism of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Greece: mitochondrial DNA and microsatellites. *Bull Entomol Res* 97:29–40
- Valiente A, Juanes F, Nuñez P, Garcia-Vazquez E (2010) Brown trout (*Salmo trutta*) invasiveness: plasticity in life-history is more important than genetic variability. *Biol Invasions* 12:451–462
- Waage JK, Mumford JD (2008) Agricultural biosecurity. *Phil Trans R Soc B* 363:863–876
- Wang B, Li W, Wang J (2005) Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China. *Aquat Bot* 81:277–283
- Xu W, Jameson D, Tang B, Higgs P (2006) The relationship between the rate of molecular evolution and the rate of genome rearrangement in animal mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 63:375–392

Supplementary Table 1. Collection records of *Tetranychus evansi* with number of analysed individuals (N) for ITS and COI and corresponding COI haplotypes and ITS types .

NI: Non identified ITS type. ** Heterozygote ITS types.

Geographical region	Country	Pooled localities in table 1	Province	Location	Host plant	Latitude	Longitude	N		COI	ITS	Collector
								COI	ITS			
South America	Argentina	Argentina	Tucuman	San Miguel de Tucuman	<i>Solanum sp.</i>	-26.843	-65.282	4	5	H3	T3, T1/T3**	F. Ferragut
South America	Argentina	South West Brazil	Corrientes	Mercedes	<i>Solanum sp.</i>	-29.470	-58.025	1	0	H1	NI	M. Ferrero
South America	Brazil	South West Brazil	Rio Grande do Sul	Alegrete	<i>Solanum americanum</i>	-29.782	-55.797	8	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America	Brazil	South West Brazil	Rio Grande do Sul	Itaqui 1	<i>S. americanum</i>	-29.135	-56.552	7	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America	Brazil	South West Brazil	Rio Grande do Sul	Itaqui 2	<i>S. americanum/Solanum lycopersicum</i>	-29.119	-56.552	3	0	H1	NI	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America	Brazil	South West Brazil	Rio Grande do Sul	Uruguaiana	<i>S. americanum</i>	-29,770	-57,050	11	1	H1, H2	T1	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America	Brazil	South Brazil	Rio Grande do Sul	Venâncio Aires	<i>S. americanum</i>	-29.658	-52.080	9	1	H9	T2	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America ^a	Brazil	South East Brazil	Sao-Paulo	Piracicaba	<i>S. lycopersicum</i>	-22.410	-47.380	3	2	H8	T2	G. de Moraes
South America	Brazil	North East Brazil	Ceará	Barbalha 1	<i>S. americanum</i>	-7.351	-39.400	9	0	H10	NI	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America	Brazil	North East Brazil	Ceará	Barbalha 2	<i>S. americanum</i>	-7.330	-39.403	3	0	H10	NI	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America	Brazil	North East Brazil	Pernambuco	Camocim de São Félix	<i>S. americanum</i>	-8.332	-35.759	9	1	H10	T2	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America	Brazil	North East Brazil	Pernambuco	Goianá	<i>S. lycopersicum</i>	-7.564	-35.012	7	1	H10	T2	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
South America	Brazil	North East Brazil	Pernambuco	Recife	<i>S. americanum</i>	-7.946	-34.912	4	1	H10	T2	A. Migeon/M. Navajas/D. Navia
Mediterranean region	Portugal	Portugal Center	Lisbona	Quinta 1	<i>Solanum nigrum</i>	39.007	-8.971	1	0	H7	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal Center	Lisbona	Quinta 2	<i>S. nigrum</i>	38.995	-8.971	1	0	H1	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal Center	Lisbona	Castanheira do Ribatejo	<i>S. nigrum</i>	38.988	-8.973	8	1	H1, H7	T1/T2**	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal Center	Lisbona	Toxofal de Baixo	<i>S. nigrum</i>	39.259	-9.295	1	0	H7	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal Center	Coimbra	Ameal	<i>S. nigrum</i>	40.193	-8.534	4	0	H7	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal Center	Leiria	Marinha Grande	<i>S. nigrum</i>	39.739	-8.934	1	0	H7	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal South	Faro	Moncarapacho	<i>S. nigrum</i>	37.125	-7.770	1	0	H1	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal South	Faro	Santo Estêvão	<i>S. nigrum</i>	37.136	-7.699	1	0	H1	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal South	Faro	Luz de Tavira	<i>S. nigrum</i>	37.094	-7.696	6	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal South	Faro	Vila do Bispo	<i>S. tuberosum</i>	37.082	-8.910	2	0	H7	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal South	Faro	Lagos	<i>S. nigrum</i>	37.107	-8.687	8	0	H7	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal South	Faro	Santa Maria	<i>S. nigrum</i>	37.101	-8.695	5	1	H7	T2	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Portugal	Portugal South	Beja	Aljustal	<i>S. nigrum/S. lycopersicum</i>	37.879	-8.155	8	0	H7	NI	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Madeir Is	Madeir Is	Madeira	Funchal	<i>S. lycopersicum</i>	32.640	-16.900	1	1	H1	T1	F. Ferragut
Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Gran Canaria	San Nicolas de Tolentino	<i>S. lycopersicum/S. nigrum</i>	27.999	-15.790	2	2	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut

Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Gran Canaria	Santa Maria de Guia	<i>Solanum tuberosum</i>	28.062	-15.645	1	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Gran Canaria	Telde	<i>S. nigrum</i>	27.949	-15.390	1	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Tenerife	Granadilla-San Isidro	<i>S. lycopersicum</i>	28.079	-16.552	2	2	H4	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Tenerife	Guia de Isora	<i>S. lycopersicum</i>	28.214	-16.790	1	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Tenerife	La Laguna	<i>S. tuberosum</i>	28.540	-16.367	1	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Tenerife	La Orotavia	<i>Physalis organifolia/S. nigrum</i>	28.389	-16.544	4	3	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Tenerife	San Miguel	<i>S. nigrum/S. tuberosum/Solanum melongena/Nicotiana glauca</i>	28.063	-16.612	5	4	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Canary Is	Canary Is	Tenerife	Abona	<i>S. lycopersicum</i>	28.120	-16.450	1	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain North East	Barcelona	Barcelona-Santa Susanna	<i>S. melongena</i>	41.647	2.697	1	1	H7	T2	A. Tsagkarakou
Mediterranean region	Spain	Spain North East	Girona	Corça	<i>S. nigrum</i>	41.987	3.016	1	1	H7	T2	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Spain	Spain North East	Girona	Girona	<i>S. nigrum</i>	41.967	2.827	1	1	H7	T2	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Spain	Spain North East	Tarragona	Altafulla 1	<i>S. nigrum</i>	41.131	1.312	1	1	H7	T2	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Spain	Spain North East	Tarragona	Altafulla 2	<i>Datura stramonium</i>	41.142	1.382	1	1	H7	T2	A. Migeon/M. Navajas
Mediterranean region	Spain	Spain North East	Tarragona	Altafulla 3	<i>S. nigrum</i>	41.267	1.388	1	1	H1	T1	A. Migeon/A. Boubou
Mediterranean region	Spain	Spain East	Tarragona	L'Hospitalet de l'Infant	<i>S. nigrum</i>	40.985	0.908	1	1	H1	T1	A. Migeon/A. Boubou
Mediterranean region	Spain	Spain East	Tarragona	L'Aldea	<i>S. nigrum</i>	40.765	0.626	2	1	H1	T1	A. Migeon/A. Boubou
Mediterranean region	Spain	Spain East	Tarragona	Alcanar	<i>S. lycopersicum/S. melongena/S. tuberosum</i>	40.524	0.515	4	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Tarragona	Deltebre	<i>S. melongena</i>	40.727	0.679	1	1	H1	T1	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Tarragona	Santa Bàrbara	<i>S. nigrum</i>	40.713	0.500	2	1	H1	T1	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Tarragona	Cambrils	<i>S. nigrum</i>	41.079	1.040	2	1	H1	T1	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Castelló	Almenara	<i>S. nigrum</i>	39.737	-0.228	2	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Castelló	Alqueras del Niño Perdido	<i>S. nigrum/Solanum chenopodioides</i>	39.902	-0.122	4	0	H4	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Castelló	Peniscola	<i>S. nigrum</i>	40.399	0.402	1	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Castelló	Benicarló	<i>S. melongena</i>	40.439	0.442	2	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Castelló	Alcossebre	<i>S. nigrum</i>	40.234	0.270	2	0	H4	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Castelló	Cabanes	<i>S. lycopersicum/S. nigrum</i>	40.169	0.166	6	1	H1	T1	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Castelló	Benicàssim	<i>S. nigrum</i>	40.055	0.054	2	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Castelló	Castelló de la Plana	<i>S. nigrum</i>	39.998	-0.070	2	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Valencia	Bétera	<i>S. nigrum/S. melongena</i>	39.600	-0.427	1	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Valencia	La Pobla de Vallbona	<i>S. nigrum</i>	39.634	-0.516	3	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Valencia	Marines	<i>S. lycopersicum/S. melongena</i>	39.677	-0.556	2	0	H1	NI	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain East	Valencia	Valencia	<i>S. nigrum</i>	39.486	-0.337	13	6	H1, H4, H7	T1	A. Migeon/M. Navajas

Mediterranean region	Spain	Spain East	Alicante	Benferri	<i>S. nigrum</i>	38.177	-0.996	4	1	H1	T1	A. Migeon/A. Boubou/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain South	Murcia	Murcia	<i>S. nigrum</i>	37.821	-1.438	1	1	H1	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain South	Granada	Granada	<i>S. nigrum</i>	36.718	-3.488	3	1	H4	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	Spain	Spain South	Malaga	Malaga	<i>S. nigrum</i>	36.760	-4.039	3	2	H4	T1	A. Migeon/M. Navajas/F. Ferragut
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Argelès sur Mer	<i>S. nigrum</i>	42.576	3.034	1	1	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Le Boulou	<i>S. nigrum</i>	42.524	2.838	1	1	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Perpignan	<i>S. nigrum</i>	42.681	2.849	1	1	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Pezilla la Rivière	<i>S. nigrum</i>	42.697	2.765	1	1	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Pia	<i>S. nigrum</i>	42.735	2.916	1	1	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Rivesaltes	<i>S. nigrum</i>	42.779	2.883	1	1	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Saint Nazaire	<i>S. nigrum</i>	42.672	2.991	1	1	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Sainte Marie	<i>S. nigrum</i>	42.712	3.024	1	1	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South	Pyrénées-Orientales	Torreilles	<i>S. nigrum</i>	42.737	2.958	2	2	H7	T2	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South East	Alpes-Maritimes	Beausoleil	<i>S. nigrum</i>	43.753	7.420	1	1	H1	T1	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South East	Alpes-Maritimes	Menton	<i>Solanum quitoense/S. nigrum</i>	43.790	7.510	2	2	H1	T1	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South East	Alpes-Maritimes	Saint Laurent du Var	<i>S. lycopersicum</i>	43.718	7.180	1	1	H1	T1	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South East	Alpes-Maritimes	Saint-Jeannet	<i>S. nigrum</i>	43.743	7.180	1	0	H1	T1	A. Migeon
Mediterranean region	France	France South East	Var	Grimaud	<i>Physalis origanifolia</i>	43.270	6.532	1	0	H1	NI	A. Migeon
Mediterranean region	Italy	Italy	Liguria	Imperia-San Lorenzo	<i>S. lycopersicum/S. nigrum</i>	43.820	7.750	2	2	H1	T1	A. Migeon/P. Auger
Mediterranean region	Greece	Greece	Kreta	Timpakion	<i>S. nigrum</i>	35.071	24.768	3	2	H4	T1	A. Tsagkarakou
Mediterranean region	Israel	Israel	HaMerkaz	Kefar Hess	<i>S. nigrum</i>	32.250	34.933	1	1	H4	T1	T. Ben-David
Mediterranean region	Tunisia	Tunisia	Ben Arous	Kledia	<i>S. nigrum</i>	36.660	10.202	1	0	H4	NI	K. Lebdi Grissa/M. Navajas
Mediterranean region	Tunisia	Tunisia	Le Kef	Zaafrane1	<i>S. nigrum</i>	36.186	8.860	2	0	H4	NI	K. Lebdi Grissa/M. Navajas
Mediterranean region	Tunisia	Tunisia	Nabeul	Mraissa	<i>S. nigrum/S. tubersum</i>	36.750	10.550	3	3	H4	T1	K. Lebdi Grissa
Mediterranean region	Tunisia	Tunisia	Tunis	INAT	<i>Solanum sp.</i>	36.829	10.181	2	2	H4	T1	K. Lebdi Grissa
Mediterranean region	Algeria	Algeria	Mostaghanem	Mostganem	<i>S. lycopersicum</i>	35.934	0.087	1	0	H4	NI	Y. Guenaoui
Asia ^a	Taiwan	Taiwan	Taitung	Wufeng	<i>S. nigrum</i>	24.067	121.700	2	2	H4	T1	C. C. Ho
Asia ^b	Japan	Japan	Okinawa	Miyakojima	<i>Solanum photeinocarpum</i>	24.833	125.200	2	0	H4	NI	A. Miyagi et al.
Asia ^a	Japan	Japan	Tokyo	Honshu	<i>S. nigrum</i>	35.583	139.600	2	2	H4	T1	T. Gotoh/Y. Kitashima
Asia ^a	Japan	Japan	Osaka	Takatsuki	<i>S. nigrum</i>	34.850	135.600	1	1	H4	T1	K. Ohashi
Asia ^b	Japan	Japan	Kyoto	Sakyo	<i>S. nigrum</i>	35.300	136.530	1	0	H4	NI	T. Gotoh
Asia ^b	Japan	Japan	Fukuoka	Fukuoka	<i>S. nigrum</i>	33.617	130.417	1	0	H4	NI	M. Maruyama
Asia ^b	Japan	Japan	Fukuoka	Tsukushino	<i>S. melongena/S. lycopersicum</i>	33.470	130.517	2	0	H4	NI	H. Takemoto
Asia ^b	Japan	Japan	Kagoshima	Kagoshima	<i>S. lycopersicum</i>	31.950	130.900	1	0	H4	NI	Y. Sakamaki
Africa	France	Reunion Is	La Réunion	Saint Pierre	<i>S. nigrum/ S. lycopersicum</i>	-21.317	55.433	2	1	H1, H6	T1	P. Caplong

Africa	South Africa	South Africa	Pretoria	Rietondale	<i>Solanum panduraeforme</i>	-25.730	28.190	1	1	H1	T1	E. Ueckermann
Africa	Kenya	East Africa	Neivasha	Muthaiga	<i>Phaselous vulgaris</i>	-1.250	36.830	2	1	H1	T1	M. Knapp
Africa	Kenya	East Africa	Central	Mwea Tebere	<i>S. lycopersicum</i>	-0.683	37.383	2	2	H1	T1	M. Knapp
Africa ^c	Kenya	East Africa	Machakos	Athi River	<i>S. lycopersicum</i>	-1.419	37.016	1	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Kenya	East Africa	Machakos	Athi River	<i>S. nigrum/S. melongena</i>	-1.391	37.043	3	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Kenya	East Africa	Taita-Taveta	Wundanyi	<i>S. lycopersicum</i>	-3.421	38.342	2	2	H1	T1	F.J. Toroitich
Africa ^c	Kenya	East Africa	Taita	Chawia	<i>S. nigrum/S. lycopersicum</i>	-3.470	38.351	4	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Kenya	East Africa	Migori	Muhuru-Bay	<i>S. lycopersicum</i>	-1.022	34.056	2	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Kenya	East Africa	Makueni	Kibwezi	<i>S. lycopersicum</i>	-2.373	38.086	2	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Kenya	East Africa	Suba	Sindo	<i>S. lycopersicum</i>	-0.516	34.165	1	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Tanzania	East Africa	Kwale	Shimba Hills	<i>S. lycopersicum</i>	-4.347	39.313	2	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Tanzania	East Africa	Arusha	AVRDC	<i>S. nigrum/</i> <i>Solanum aethiopicum/</i> <i>S. lycopersicum/D. stramonium</i>	-3.373	36.804	9	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Tanzania	East Africa	Lushoto	Lushoto	<i>S. tuberosum</i>	-4.753	38.342	2	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa ^c	Tanzania	East Africa	Mukuyuni	Morogoro	<i>S. aethiopicum</i>	-6.552	37.301	2	0	H1	NI	F.J. Toroitich
Africa	Niger	Niger	Niamey	Campus AgrHyMet	<i>S. melongena</i>	13.498	2.102	2	3	H4	T1	J.P. Quéré
Africa	Niger	Niger	Niamey	Niamey West	<i>S. lycopersicum</i>	13.533	3.086	1	0	H4	NI	K. Hima
Africa	Niger	Niger	Niamey	Niamey North West	<i>S. lycopersicum</i>	13.319	2.116	2	0	H4	NI	K. Hima
Total								298	96			

^aIn Gotoh et al. (2009)

^bUnpublished data from T. Gotoh (Personnel communication)

^cIn Toroitich et al. (2008)

Supplementary Table 2. Sample groups pooled from *Tetranychus evansi* samples. Number of localities, number of analysed individuals (N) per sample group for *COI* and ITS, corresponding *COI* haplotypes and ITS types are indicated.

Geographical region	Sample groups	Number of localities	N		COI Haplotypes										ITS Types			
			COI	ITS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	T1	T2	T3	T**
South America	Brazil-North East	5	32	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	32	0	3	0	0
	Brazil-South East	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	Brazil-South	1	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	1	0	0
	Brazil-South West* ^a	4	30	3	29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	Argentina-North West	1	4	5	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	T1/T3**
Mediterranean region	Italy	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
	France-South East	4	6	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
	France-South	9	10	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0
	Spain-North East	3	6	6	1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1	5	0	0
	Spain-East*	18	52	12	38	0	0	10	4	0	0	0	0	0	13	0	0	0
	Spain-South East	2	5	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
	Spain-South	2	6	3	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	Spain, Canary Is	11	18	16	16	0	0	2	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0
	Portugal-South	6	31	2	8	0	0	0	0	0	23	0	0	0	1	1	0	0
	Portugal-Center *	6	16	1	3	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	T1/T2**
	Portugal, Madeira Is	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Tunisia	4	8	5	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
	Algeria	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NI	NI	NI	NI
	Greece	1	3	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
	Israel	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Asia																0	0	0
	Taiwan	1	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Africa	Japan	7	10	3	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
																0	0	0
	Niger	3	5	3	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	South Africa	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Reunion Is	1	2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	East Africa (Kenya and Tanzania)	13	34	5	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
	Total	108	298	96	145	1	4	48	4	1	51	3	9	32	68	22	1	5
	Haplotypes frequency				48.66	0.34	1.34	16.11	1.34	0.34	17.11	1.01	3.02	10.74	70.83	22.92	1.04	5.21

* Intralocality mitochondrial sequences polymorphism found in Uruguaiana (Brazil-South West); Valencia (Spain-East); Castanheira do Ribatejo (Portugal-Center) and Saint Pierre (Africa). (see Supplementary table 1).

** Heterozygotes: San Miguel de Tucuman in Argentina (4 individuals) and Castanheira do Ribatejo in Portugal-Center (1 individual).

^a Brazil-South West's locality includes Argentine sample from Corrientes.

ARTICLE IV

Boubou A., Migeon A., Roderick G., Auger P., Cornuet J.M. and M. Navajas. Test of colonisation scenarios challenges historical data in reconstructing the invasion history of the red tomato spider mite *Tetranychus evansi*. **En preparation.**

Test of colonisation scenarios challenges historical data in reconstructing the invasion history of the red tomato spider mite *Tetranychus evansi*

A. Boubou, A. Migeon, G. Roderick, P. Auger, JM Cornuet and M. Navajas

ABSTRACT

The red tomato spider mite *Tetranychus evansi* is an emerging pest of solanaceous crops world-wide. Like many other emerging pests in agricultural, urban, and natural systems, its small size, confusing taxonomy, complex history of associations with humans, and propensity to exist at small population numbers, make the study of its invasion biology difficult. Here, we test the ability of recent developments in approximate Bayesian computation (ABC) and variation in multi-locus genetic markers to reconstruct the historical demography of a cryptic invasive pest, including multiple pathways of introduction and timing of colonization. The results confirm that the current worldwide invasions of *T. evansi* result from the expansion of two independent lineages, which moved out of the native range in South America, long before historical records were available from museum collections. Each lineage has maintained its own colonization trajectory until recently, one from north east Brazil and the other, from south west Brazil. The timing of expansion was found to be concurrent with episodes of movement of people globally during the industrial revolution of the mid-late 1800's, indicating a long period of persistence, or lag-time, prior to detection as agricultural pests in association with outbreaks on tomato. Further, the historical reconstruction illustrates that more recent admixture between the two distinct lineages occurs in Europe, a phenomenon that results in additional genetic variation in invasive populations characterized by founder events. This study illustrates that ABC methods can provide insights into even complex invasion scenarios, revealing information concerning multiple pathways, lag-times, and recent admixture, that are critical not only to understanding invasion biology, but also in refining management strategies for invasive species.

INTRODUCTION

Historical occurrence records are the first and frequently the only source of information on the geographical distribution of a species. However, geographical range does not form a static attribute of the species. Particularly in the case of invasive species, rapid range expansion occurs when individuals move from native to new geographical areas. Such introduction events may occur at large temporal and spatial scales (Sax *et al.*, 2007; Simberloff, Rejmanek, 2011), and this generally makes the reconstruction of colonization pathways of accidentally introduced populations difficult to elucidate. In addition, introductions are characterized, at least initially, by small population sizes with no immediately recognizable impacts, a phenomenon that also obscures true species ranges. In the case of minute arthropod pests including spider mites detection is even more challenging. Little is usually known about these high-impact invaders before major agricultural damage appears. Most spider mites are cryptic (adult females are < 0.5 mm in size) and easily transported hidden within commodities (Navajas *et al.*, 2010). Yet, a single mated female may initiate a successful invasion as a result of the arrhenotokous mode of reproduction (diploids females and haploid males). Further, scarce and typically partial available relevant historical records often cause the invasion history to be incomplete and misleading. A convincing demonstration of patterns of invasion requires appropriate methods to reconstruct the invasions routes and hence formally test alternative scenarios. Moreover, in the case of pests, the routes and modalities of introduction are crucial for managers in preventing spread through quarantine or in controlling pathways, as well as to refine control efforts.

The red tomato spider mite *Tetranychus evansi* is most likely native to South America. In the past half century it has expanded its range to North America, Africa and the Mediterranean basin, as well as Far-East Asia and many tropical islands worldwide [see (Migeon, Dorkeld, 2006; Migeon *et al.*, 2009) for a complete and chronological list]. While the first records outside its native range in the neotropical region are from Mauritius (Moutia, 1958), the mite likely was already present, but undetected, in other locations. For example, when serious outbreaks occurred on tomato in Kenya late 1990s, *T. evansi* was misidentified and confused with the closely related species *T. urticae*, until molecular markers were first applied to distinguish between the two species (Knapp *et al.*, 2003). In fact, misidentification of spider mites and other small arthropod pests is a frequent problem that constantly impedes research and control (Mendonça *et al.*, 2010).

Within the numerous studies of bioinvasions in the recent scientific literature, genetic data are now widely used to understand invasion pathways. Recently, increased computer power has

facilitated the development of an approach based on Approximate Bayesian Computation (ABC) to test alternative invasion scenarios (Beaumont *et al.*, 2002; Bertorelle *et al.*, 2010; Guillemaud *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2005; Pascual *et al.*, 2007; Verdu *et al.*, 2009).

In a previous study of *T. evansi* based on mitochondrial (mt) *COI* and nuclear ribosomal ITS sequences (Boubou *et al.* 2010) we showed that multiple cryptic introduction events occurred in the Mediterranean basin resulting from at least two main distinct lineages (I and II) originating from distant geographical regions in South America. Lineage I is more widely distributed and has colonized the entire Mediterranean basin, together with Africa and East Asia, causing serious outbreaks on solanaceous crops in South East Africa and the Mediterranean. Multiple introductions have the potential to obscure invasion history, but also may provide additional genetic variation necessary for invasion success (Kolbe *et al.*, 2004). In addition, new invasions frequently derive from other invasive populations elsewhere, rather than directly from the native origins of the species (Downie, 2002; Kolbe *et al.*, 2008; Lombaert *et al.*, 2010). In the case of *T. evansi* the routes and modalities of colonization remain unresolved. Like many cryptic invaders, the colonization of new continents by *T. evansi* could be the result of several alternative invasive scenarios that require formal testing to provide an adequate spatial and temporal picture of the global invasion.

The development for *T. evansi* of new category of genetic markers (e.g., microsatellites), and application of novel Approximate Bayesian Computation (ABC) methods have made it possible to set more detailed estimates of demographic and historical parameters and to perform quantitative comparisons of alternative invasion scenarios. Here, we address the following questions: 1) how well do historical data capture the invasion history of inconspicuous cryptic pests, such as the *T. evansi* mite? 2) which evolutionary scenario based on genetic data and historical modeling best explains the colonization of Europe and Africa? 3) how many colonization events occurred in these regions and what was their timing? and 4) do the two distinct mite lineages now in Europe coexist separately or does the current population reflect an admixture event following colonization? The ability to obtain answers to these questions is not only necessary to understand the invasion history of these and other inconspicuous species, but also will be critical in defining strategies for quarantine, control, and management. Their cryptic nature, massive pest potential, and previous historical and multi-locus genetic data, make the *T. evansi* system a suitable model for testing the limits of historical inference in invasion biology.

MATERIAL AND METHODS

Population samples and markers

Individual mites were collected from a total of 33 localities representing both native (Brazil) and introduced (Africa and Europe) areas (Fig. 1, Table. 1). A total of 649 individuals were genotyped for 16 microsatellite loci (GenBank accession nos FJ426370–FJ426385) previously isolated and characterized as described in Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium (2009), except locus *evaTC1-G12*, which was replaced by locus *evaTC5-E6*. DNA extraction of single mite females and amplification protocols are provided in Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium (2009), except primer concentration which was 0.1 μM to amplify *evaTC1-F5*, *evaTC1-A8*, *evaTC5-D2*, *evaTG2-A7*, *evaTC3-D3*, and 0.05 μM for *evaATCT1-H4* and *evaATCT2-G11*. Allele size was determined using GENE Mapper® version 4.0 (Applied Biosystems). Sequences of the ITS region (1137 bp) and a portion of the mitochondrial (mt) *COI* gene (868 bp) previously obtained for most of the genotyped mite individuals was used to assign samples to either lineage I or II as described by Boubou et al (2010).

Population structure

Indices of genetic diversity (Tab. 1) were calculated using FSTAT Version 2.9.3 (Goudet, 2001): number of alleles (N_A), number of private alleles and allelic richness: number of alleles independent of sample size. Observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity were computed using the GENETIX software version 4.03 (Belkhir *et al.*, 2000). The GENEPOP package version 4.0.10 (Raymond, Rousset, 1995) was used for computing the exact test for genotypic linkage disequilibrium (LD) and deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), with significance estimated using Markov chain exact tests (default parameters except for an increase to 10000 iterations per batch) and Bonferroni corrections for multiple tests (Rice, 1989). The probability test of Guo and Thompson (1992) was performed, using GENEPOP, to test deviation from HWE across loci in each population. Pairwise genetic differentiation between populations was estimated by F_{ST} values (Weir, Cockerham, 1984) as implemented in GENEPOP.

The partitioning of genetic variance was investigated by using molecular analysis of variance (AMOVA) as implemented in ARLEQUIN v.3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). Two sets of groups were compared: 1) populations within two clusters (I and II; detected by STRUCTURE as described below); and 2) populations within native and introduced areas.

Permutations to determine significance were set at 10.000 and the distance method used to determine variation in the dataset was the number of different alleles present in each group.

The program STRUCTURE version 2.3.3 (Falush *et al.*, 2003; Pritchard *et al.*, 2000), which implements a model-based clustering method, was used to infer the number of genetic clusters (K = number of clusters of individuals characterized by allele frequencies at each locus) present in the data set, and to assign individuals to these clusters. We used the admixture model with correlated allele frequencies and did not include any *a priori* information about collection sites. In all simulations performed in STRUCTURE, we used a “burn-in” period of 5×10^4 followed by a run length of 5×10^5 MCMC generations, which were sufficient to give a stable α and estimate of the log probability of the data. We first ran separate models including the whole data with K ranging from 1 to 12. We selected the upper K value as 12, based on the number of groups of populations identified by F_{ST} values (data not shown). Because two main clusters were identified (I and II), these were submitted separately to a second run of analyses, using $K=1-5$ and $K=1-7$, respectively. Finally, a third analysis was performed on all introduced populations ($K=1-5$) from Europe and Africa. For each value of K , 10 independent runs were computed. To estimate the most likely K value, we used the ΔK statistics of Evanno *et al.* (2005).

Because some of the assumptions of STRUCTURE, e.g. as Hardy–Weinberg (HW) equilibrium within populations and linkage equilibrium, might be violated, in particular HW for arrhenotokous species, as spider mites (Bailly *et al.*, 2004), population structure was also examined by an individual based Principal Component Analysis (PCA) implemented in the program PCAGEN version 1.2 (Goudet, 1999).

Inferring colonization scenarios using approximate Bayesian computation

Approximate Bayesian Computation (ABC, Beaumont *et al.*, 2002) analysis was performed using samples in the cluster I identified by STRUCTURE. Three introduction scenarios, assuming bottlenecks, were considered, with each differing in the order of the introduction events (Fig. 3). In Scenario 1, East Africa (AF) was colonized from South West Brazil (BR-SW) and from there mites reached Southern Europe (EU), including Andalusia (AND) [i.e., BR-SW $\rightarrow$ AF $\rightarrow$ EU and AF $\rightarrow$ AND]. In Scenario 2, four steps of colonization were assumed [i.e., BR-SW $\rightarrow$ AND $\rightarrow$ AF $\rightarrow$ EU]. In Scenario 3, both East Africa (AF) and Andalusia (AND) were colonized independently by a source population from South West Brazil (BR-SW) [i.e., BR-SW $\rightarrow$ AF $\rightarrow$ EU and separately BR-SW $\rightarrow$ AND]. The prior distributions used for inferences in each scenario are given Table 3. The localities included in the group of samples and abbreviations used are indicated in Table 1. We compiled a

reference table containing 1.5×10^6 simulated data sets (5×10^5 for each scenario) to compare this three scenarios and estimated parameter posterior distributions for the best supported scenario taking the 5,000 (1%) simulated datasets closest to the observed dataset for the local linear regression after applying a *logit* transformation to parameter values. All ABC computations were performed using the program DIYABC (Cornuet *et al.*, 2008). For all the posterior density estimation from the adjusted sample of parameter values we used the *locfit* function (Loader 1996) implemented in the package R version 2. 12 (Ihaka, Gentleman 1996; <http://cran.r-project.org>). Median and quantile values were estimated using the *median* and *quantile* functions in R.

Test of admixture event

The occurrence of an admixture event in Portugal, suggested by microsatellite genetic data and also by the presence of heterozygote ITS sequences in mites collected from this region, was tested using ABC methods (Figure 4). One admixed population, formed from pooling the two Portuguese populations (Castanheira do Ribatejo and Aljustrel) and two parental populations (Luz de Tavira and Lagos), was created based on information obtained from the structure analysis (see Results section and Fig. 2c). The proportion of alleles of the parental populations in the admixed population and the time of the divergence and the admixture events were estimated (Figure 4). Prior distributions are shown in Table 3. As above, a reference table was compiled containing 1.5×10^6 simulated data sets and estimated parameter posterior distributions using the 15,000 (1%) simulated datasets closest to the observed dataset for the local linear regression, after application of a *logit* transformation to parameter values. DIYABC was used to estimate all ABC computations.

RESULTS

Population genetic structure

When the whole dataset was used, the Bayesian clustering analysis as inferred by STRUCTURE supported the presence of two genetic clusters, I and II (Fig. 2a,), perfectly matching the mt lineages I and II identified previously (Boubou *et al.*, 2010). The total likelihood increased with increasing K, although it began to plateau after $K = 5$. ΔK for $K = 1-11$ revealed a single distinct peak at $K = 2$ and this result was found in the 10 runs. Although most of the individuals were unambiguously assigned to either of the two clusters ($> 90\%$ PP), a few individuals originating from two Portuguese populations (3 and 2 individuals from Castanheira do Ribatejo and Aljustrel respectively) were assigned to cluster I with a high posterior probability ($> 98\%$ PP) while the majority of Portuguese mites fell cluster II. In

addition, some individuals from these two populations (4 and 5 in Castanheira do Ribatejo and Aljustrel respectively) were identified as possessing apparent hybrid ancestry between the two clusters (approximately 50% PP assignment to each cluster, Figure 2c). The genetic structure in two major clusters is also supported by AMOVA where 59% of the genetic variation was explained by the genetic differentiation between cluster I and II (Table 2a). When AMOVA was used to test a geographic structuring of the genetic variability in native and introduced areas, differences between populations within each of the geographical ranges contributed to 62% of total variance, while only 27% was attributed to the variation between the ranges (Table 2b). The occurrence of individuals associated with clusters I and II in both native and introduced (Europe) areas accounts for this pattern.

When STRUCTURE was run with populations from cluster I only, three highly significant clusters ($K=3$) were identified (named Ia, Ib and Ic) which each comprised samples from the following localities: Ia = BR-SW: Southern Brazil (Uruguaiana, Alegrete and Itaqui), Ib = AF+EU: East Africa (AF) and Southern Europe (EU); and Ic = MED: Mediterranean Basin [Andalusia (AND) including Granada and Malaga, and Greece and Tunisia] (Fig. 2, Tab. 1). The same general pattern of genetic structure obtained with STRUCTURE was also supported by PCA analysis (data not shown). While most of the introduced populations in cluster II displayed low genetic polymorphism (Table 1) and a weak or insignificant genetic differentiation (mean pairwise $F_{ST} = 0.13$), when finer genetic structuring was explored by STRUCTURE, an additional cluster pattern emerged (Fig. 2, Tab. 1), essentially distinguishing admixed individuals from Portugal.

Inference of introduction scenarios and estimation of historical parameters

Among the three scenarios tested, posterior probabilities strongly supported Scenario 2 (posterior probability= 1.00) [i.e., BR-SW $\rightarrow$ AND $\rightarrow$ AF $\rightarrow$ EU]. Differences between the posterior and prior density curves for time of introduction events ($t1$, $t2$, $t3$) were well marked, with clearly peaked posteriors (Figure 5I), indicating that the genetic data are informative for these historical parameters. The posterior distributions support a small divergence time ($t1$) between East African and European populations (median = 36 generations). The median value of the introduction time of *T. evansi* from Andalusia into East Africa ($t2$) was estimated at 264 generations. This corresponds to an introduction having been occurred about 26 years ago, assuming 10 generations *T. evansi* per year in invaded areas (Migeon *et al.*, 2009). Finally, the divergence time between populations from Brazil and Andalusia ($t3$) was estimated at 1365 generations (i.e., approximately 137 years ago).

Test of an admixture scenario and timing estimates of the event

The hypothesis of a hybrid origin of the Portuguese population was clearly supported by the ABC analysis. Demographic parameters calculated under this scenario are presented in Figure 5II. Peaked posteriors were marked for time events (t_d and t_a : divergence and admixture times, respectively) and the admixture rate (r). The divergence between the two parental populations was dated at a median of 56,188 generations (approximately 5,600 years ago), whereas admixture time (t_a) was estimated at only 13 generations. The admixed Portuguese population results from mites from Lagos and Luz de Tavira in estimated proportions of 0.87 and 0.13 respectively.

DISCUSSION

Multiple introductions and admixture events

Genetic signatures clearly assigned invasive populations of *T. evansi* to two well-supported clusters. Despite the high level of divergence between these two lineages (2.84% based on *COI* sequences (Boubou *et al.*, 2010) and the old divergence time between them (estimated at about 5,000 years), it is clear from the admixture event detected in Portugal that crosses between the two clades do exist in nature. Additional evidence of conspecificity is provided by previous cross breeding experiments in the laboratory (Gotoh *et al.*, 2009). The admixture event detected in Portugal demonstrates that individuals from different native-range sources do not merely coexist but interbreeding between them has occurred within invasive populations.

The oldest historical records of *T. evansi* are from Brazil and date back to 1952. As predicted by the hypothesis of South America being the native area for this mite, higher genetic diversity was found in Brazil compared to the introduced range. However, a precise source of the invasion could not be assigned. This lack of resolution is likely a result of under-sampling source regions that can lead to missing native diversity (Muirhead *et al.*, 2008). *Tetranychus evansi* persists at very low densities in Brazil making it difficult to sample in the field. Further evidence of a neotropical origin of the species is provided by the observation that natural enemies control the mite densities in these regions (Ferrero, personal communication; Furtado *et al.*, 2007).

Genetic inference challenges historical data in evaluating invasion pathways

Although the species is a major invader outside its native area, historical data on the occurrence of *T. evansi* are surprisingly scarce. As for many spider mites, records of *T. evansi* typically correspond to agricultural outbreaks. Otherwise, the mite is difficult to find in the field and in addition proper identification requires the expertise of taxonomists. In introduced areas, *T. evansi* was first reported in Africa, with records from Mauritius in mid-1950's, La Réunion, 1970, Zimbabwe, 1979, South Africa, 1985, Kenya, 2001 and Tanzania, 2003 (see Migeon *et al.*, 2009, for the known world distribution). In all cases, these records are associated with outbreaks of the mite. The connection of historical records and pest outbreaks also pertains Mediterranean area, with occurrences recorded from 1991 in Portugal, 1995 in Spain, 2004 in France, and 2006 in Greece.

Historical documentation is compatible with the majority of results from this study. However, some features of the genetic data are difficult to reconcile with historical records. First, while *T. evansi* was first reported outside of South America in Africa, ABC results clearly suggest that *T. evansi* first arrived in Southern Spain (Andalusia, AND). According to the time estimates for the 2 introductions by ABC methods, an important time lag occurred. While the mite arrived approximately 140 year ago in Andalusia, it was introduced much more recently (about 30 years ago) in East Africa. Unfortunately, no individuals from Mauritius (from first reports dating to 1954) were amenable to microsatellite genotyping. However, mites from Mauritius belonged to the same mitochondrial lineage II as the samples later genotyped with microsatellites from East Africa (Kenya and Tanzania). Second, genetic data suggests the arrival of *T. evansi* occurred in the Mediterranean region long before historical records, corresponding instead to the end of the nineteenth century (approximately 1870). This period coincides with the Industrial Revolution, characterized by increased international trade as a result of the development of transportation and leading to an increase in the rate at which species were introduced into Europe, and in particular from the Americas. As a result, numerous non-native species, many introduced into Europe little more than 200 years ago, have become successfully established in large areas of the continent (Hulme, 2007; Hulme, 2009). In the case of East Africa, our analysis suggests the introduction of *T. evansi* likely occurred from Andalusia and as little as 26 years ago (i.e., approximately 1981). This date corresponds to the period in which heavy outbreaks caused by spider mites have been reported on tomato crops from Kenya and other Southern African countries (Knapp *et al.*, 2003).

Setting aside precise dates of the introductions, contemporary genetic data strongly support the invasion scenario of introduction from SW Brazil to Southern Spain (AND) and this populations as the source of both the East African (AF) and other European populations (EU), which are clearly a part from Andalusia (cluster Ic). Whether AF is the potential source of EU, both of which are included in the same STRUCTURE cluster (Ib), or whether the opposite scenario holds, were both tested i.e. [Andalusia $\rightarrow$ AF $\rightarrow$ EU] or [Andalusia $\rightarrow$ EU $\rightarrow$ AF]. However, the analysis was not able to resolve the direction of invasion in this case. This lack of resolution could be explained either by simultaneous colonization of these two regions by the same source population (AND), or by an invasion of individuals from one of the regions by the other so recently that they have not yet differentiated. Historical data indicates that both regions, EU and AF, were invaded recently. While data do not allow us to distinguish statistically between these two hypotheses, the proximity of Andalusia to the Spanish Mediterranean region (EU) suggests that this invasion occurred first.

This study confirms that recent advances in approximate ABC approaches to reconstructing historical demography can be extremely informative for the study of invasive species. The methods employed here were able to reconstruct two independent and complex pathways of recent invasions, in spite of the incomplete nature of historical collections, difficult taxonomy, and low levels of genetic variation at multiple nuclear loci. The method also provided more precise estimates of pre-detection lag-times, a phenomenon that has been problematic for invasion biologists and managers (Sax *et al.*, 2007). While ABC methods could only partially resolve the most recent events for which minimal genetic variation exists, it is likely that this limitation will be short-lived however as “next-generation sequencing” approaches provide the promise of nearly unlimited numbers of loci for population studies (Pool *et al.*, 2010). With the recent availability of the whole genome sequence of the spider mite *Tetranychus urticae* (Grbic *et al.*, 2007), a new flood of genome-wide markers (e.g. single nucleotide polymorphism) and/or fully sequenced population samples of genomes will become accessible for these group of mite pests. The results also suggest that ABC methods will be useful in regular programs of biosecurity and pest management because of the ability (1) to distinguish among alternative scenarios of invasion pathways and (2) estimate temporal components of invasions, including pre-detection lag-times.

Genetic variation and invasiveness

The introduction of species in new environments is often associated with a founder event resulting in low genetic variability and consequently low evolutionary potential. Nevertheless, numerous invasions have occurred despite genetic bottlenecks associated with colonization

(Dlugosch, Parker, 2008b; Golani *et al.*, 2007; Puillandre *et al.*, 2008; Solignac *et al.*, 2005; Tsutsui *et al.*, 2000) and recent reviews have suggested that many successful invading populations have not experienced significant loss of genetic diversity relative to native populations (Roman, Darling, 2007; Sax *et al.*, 2007). One common hypothesis is used to explain lack of importance of the loss of genetic variability during invasive events, is that the invasive populations may stem from multiple introductions (Dlugosch, Parker, 2008a; Roman, Darling, 2007). The colonization of new regions by individuals from genetically disparate native sources has the potential to increase genetic variation by interbreeding and offset genetic bottlenecks (Ellstrand, Schierenbeck, 2000; Facon *et al.*, 2005).

In the case of *T. evansi*, introduced populations were found to exhibit low genetic polymorphism and in some cases they were totally monomorphic, raising the apparent paradox of how they become successful invaders despite experiencing significant genetic bottlenecks during colonization (Roderick, Navajas, 2003). Nevertheless, in the Mediterranean region two genetically divergent genotypes of *T. evansi* are known to occur and the two genotypes are genetically compatible. It remains to be tested if new recombinant invasive genotypes via intraspecific hybridization resulting from admixture of the two lineages possess novel phenotypes that could facilitate invasion success. Such genetic changes can be substantial and might have unexpected behavioural or physiological consequences (Kolbe *et al.*, 2004). Our data show that the invasion success of *T. evansi* results from the occurrence of a particularly successful invasive population which had served as the source of colonists for remote areas. Based on the geographical distribution of the invading genotypes, different invasive potentials seem to exist for the two observed mite lineages. The occurrence of two invasion biologies in *T. evansi* thus provides an excellent opportunity to evaluate what biological traits differ among invasive populations. As recent research has revealed that adaptive evolution plays a crucial role in many invasions (Lee, 2002), examining biological traits that are crucial for the success of the invasion of *T. evansi* in more temperate climates will be necessary, particularly considering that the species is thought to be limited by its ability to diapause in colder climates (Migeon *et al.*, 2009) and by its ability to exploit novel host plants. For an agricultural pest such as *T. evansi*, dissecting biological traits favoring the invasion potential not only helps to understand the invasion process itself, but ultimately will also inform management strategies in the face of global change.

References

- Bailly X, Migeon A, Navajas M (2004) Analysis of microsatellite variation in the spider mite pest *Tetranychus turkestani* (Acari: Tetranychidae) reveals population genetic structure and raises questions about related ecological factors. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 69-78.
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian Computation in Population Genetics. *Genetics* **162**, 2025-2035.
- Belkhir k, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2000) GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bertorelle G, Benazzo A, Mona S (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular Ecology* **19**, 2609-2625.
- Boubou A, Migeon A, Roderick G, Navajas M (2010) Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. *Biological Invasions* <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-010-9791-y>
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* **24**, 2713-2719.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008a) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**, 431-449.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008b) Invading populations of an ornamental shrub show rapid life history evolution despite genetic bottlenecks. *Ecology Letters* **11**, 701-709.
- Downie DA (2002) Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology* **11**, 2013-2026.
- Ellstrand NC, Schierenbeck KA (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7043-7050.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006) Arlequin ver 3.01: an integrated software package for population genetic data analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland.
- Facon B, Jarne P, Pointier JP, David P (2005) Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 524-535.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.
- Furtado IP, De Moraes GJ, Kreiter S, Tixier MS, 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.
- Golani D, Azzurro E, Corsini-Foka M, Falautano M, Andaloro F, Bernardi G (2007) Genetic bottlenecks and successful biological invasions: the case of a recent Lessepsian migrant. *Biology Letters* **3**, 541-545.
- 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**, 485-501.
- Goudet J (1999) PCA-GEN for Windows. Ver. 1.2., University of Lausanne, Switzerland.

- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Grbic M, Khila A, Lee KZ, Bjelica A, Grbic V, Whistlecraft J, Verdon L, Navajas M, Nagy L (2007) Mity model: *Tetranychus urticae*, a candidate for chelicerate model organism. *BioEssays* **29**, 489-496.
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, Cornuet JM, Estoup A (2009) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity* **104**, 88-99.
- Hulme PE (2007) Biological Invasions in Europe: Drivers, Pressures, States, Impacts and Responses. In: *Biodiversity Under Threat* (eds. R. Hester, Harrison RM), pp. 56-80. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* **46**, 10-18.
- Knapp M, Wagener B, Navajas M (2003) Molecular discrimination between the spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *African Entomology* **11**, 300-304.
- Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LRG, Lara AC, Larson A, Losos JB (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* **431**, 177-181.
- Kolbe JJ, Larson A, Losos JB, de Queiroz K (2008) Admixture determines genetic diversity and population differentiation in the biological invasion of a lizard species. *Biology Letters* **4**, 434-437.
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299-314.
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 386-391.
- Loader CR (1996) Local likelihood density estimation. *Annals of Statistics*. **24**, 1602-1618.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet J-M, Malausa T, Facon Bt, Estoup A (2010) Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE* **5**, e9743.
- Mendonça R, Navia D, Diniz IR, Auger P, Navajas M (2010) A critical review on some closely related species of *Tetranychus sensu stricto* Tuttle & Baker (1968) (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences databases. *submitted*.
- Migeon A, Dorkeld F (2006) Spider Mites Web. Available at <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>.
- Migeon A, Ferragut F, Escudero-Colomar L, Fiaboe K, Knapp M, de Moraes G, Ueckermann E, Navajas M (2009) Modelling the potential distribution of the invasive tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*
- Miller N, Estoup A, Toepfer S, Bourguet D, Lapchin L, Derridj S, Kim KS, Reynaud P, Furlan L, Guillemaud T (2005) Multiple Transatlantic Introductions of the Western Corn Rootworm. *Science* **310**, 992.
- Moutia LA (1958) Contribution to the Study of some Phytophagous Acarina and their Predators in Mauritius. *Bulletin of Entomological Research* **49**, 59-75.
- Muirhead JR, Gray DK, Kelly DW, Ellis SM, Heath DD, Macisaac HJ (2008) Identifying the source of species invasions: sampling intensity vs. genetic diversity. *Molecular Ecology* **17**, 1020-1035.
- Navajas M, Migeon A, Estrada-Peña A, Mailleux A-C, Servigne P, Petanović R (2010) Mites and ticks. *BioRisk* **4(1)**, 149-192.

- Pascual M, Chapuis MP, Mestres F, BalanyÀ J, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L, Estoup A (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* **16**, 3069-3083.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- Pool JE, Hellmann I., Jensen, J.D., Nielsen R (2010) ritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Population genetic inference from genomic sequence variation. *Genome Research* **20**, 291-300.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- Puillandre N, Dupas S, Dangles O, Zeddarn JL, Capdevielle-Dulac C, Barbin K, Torres-Leguizamon M, Silvain JF (2008) Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions* **10**, 319-333.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity* **86**, 248-249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Roderick GK, Navajas M (2003) Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews Genetics* **4**, 889-899.
- Roman J, Darling JA (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 454-464.
- Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, Bruno JF, Dawson MN, Gaines SD, Grosberg RK, Hastings A, Holt RD, Mayfield MM, O'Connor MI, Rice WR (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 465-471.
- Simberloff D, Rejmanek M (2011) *Encyclopedia of Biological Invasions* University of California Press.
- Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D, Le Conte Y, Anderson D, Evans J, Cros-Arteil S, Navajas M (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee *Apis mellifera*, are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 411-419.
- Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 5948-5953.
- Verdu P, Austerlitz F, Estoup A, Vitalis R, Georges M, Théry S, Froment A, Le Bomin S, Gessain A, Hombert J-M, Van der Veen L, Quintana-Murci L, Bahuchet S, Heyer E (2009) Origins and Genetic Diversity of Pygmy Hunter-Gatherers from Western Central Africa. *Current Biology* **19**, 312-318.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.

Table 1. Sampling locations, geographical coordinates, host plants, and number of individuals genotyped (N) by 16 microsatellites loci of invasive spider mite *Tetranychus evansi* (native and invaded areas are indicated). Samples are grouped by geographical regions according clustering results obtained by STRUCTURE analysis (Figure 2). The appartenance of samples to each of the two lineages (I and II) identified using mtDNA sequences is indicated. N_A : total number of alleles in each population, A_A : allelic richness. Average expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosities across loci for each population. A_p , number of private alleles per population. Inbreeding coefficient (F_{IS}) and departures from Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) are indicated. Bonferroni’s correction to estimate significance was used for multiple tests. Significant departures from HWE are given in bold
 ** P < 0.01. N_G : number of multilocus genotypes.

	Country	Locality	Abbreviation	Host plant (<i>Solanum</i> spp.)	Latitude	Longitude	N	N _A	A _A	H _E	H _O	F _{IS}	A _P	N _G	Genetic cluster	Lineage
Native area	Brazil	Uruguaiana	BR-U	<i>S. americanum</i>	29.77S	57.05W	34	26	1,55	0.222	0.179	0.208	3	34	BR-SW	I
	Brazil	Alegrete	BR-A	<i>S. americanum</i>	29.78S	55.79W	28	25	1,48	0.189	0.153	0.209	1	28		I
	Brazil	Itaqui	BR-I	<i>S. americanum</i> / <i>S. esculentum</i>	29.13S	56.55W	28	30	1,54	0.162	0.143	0.136	8	28		I
	Brazil	Camocim de São Félix	BR-C	<i>S. americanum</i>	8.33S	35.76W	34	19	1,10	0.026	0.013	0.418**	0	6	BR-Atl	II
	Brazil	Goianá	BR-G	<i>S. esculentum</i>	7.56S	35.01W	20	17	1,02	0.003	0.003	0	0	2		II
	Brazil	Barbalha	BR-B	<i>S. americanum</i>	7.35S	39.40W	32	21	1,27	0.108	0.061	0.442**	1	15		II
	Brazil	Venâncio Aires	BR-V	<i>S. americanum</i>	29.66S	52.08W	28	16	1	0	0	-	3	1	II	
Invaded area	Kenya	Shimba Hills	KenES	<i>S. esculentum</i>	4.35S	39.31E	12	17	1,03	0.005	0.005	-0.0000	1	2		I
	Kenya	Sindo	KenW	<i>S. esculentum</i>	0.52S	34.16E	10	17	1,07	0.013	0.013	0.0000	1	3		I
	Kenya	Athi-River 3	Ken-A3	<i>S. melongena</i>	1.39S	37.04E	20	16	1,00	0	0	-	0	1		I
	Kenya	Athi-River 4	Ken-A4	<i>S. esculentum</i>	1.39S	37.04E	16	17	1,05	0.016	0.010	0.442**	0	3		I
	Kenya	Athi-River 5	Ken-A5	<i>S. nigrum</i>	1.39S	37.04E	17	17	1,04	0.010	0.004	0.652**	0	2		I
	Tanzania	Tengeru	TZ	<i>S. nigrum</i>	3.37S	36.80E	21	17	1,01	0.003	0.003	0.0000	0	3		I
	Tanzania	Mukuyuni	TZE	<i>S. aethiopicum</i>	6.55S	37.30E	19	16	1,00	0	0	-	0	1		I
	Canary Is	Pooled localities	CRY	<i>S. nigrum</i> / <i>S. melongena</i> / <i>S. tuberosum</i> / <i>Physalis</i> <i>origanifolia</i>	28 N	16 W	12	17	1,03	0.005	0.005	-0.0000	0	2	AF+EU	I
	Portugal	Luz de Tavira	POR-SE	<i>S. nigrum</i>	37.09N	7.69W	12	19	1,10	0.024	0.016	0.377**	0	4		I
	Spain	Cabanes	SP-C2	<i>S. esculentum</i> / <i>S. nigrum</i>	40.17N	0.17E	5	16	1	0	0	-	0	1		I
	Spain	Alcanar	SP-T	<i>S. esculentum</i> / <i>S. melongena</i> / <i>S. tuberosum</i>	40.52N	0.52E	4	16	1	0	0	-	0	1		I
	Spain	Alqueras del Niño Perdido	SP-C1	<i>S. nigrum</i> / <i>S. chenopodioides</i>	39.90N	0.12W	7	16	1	0	0	-	0	1		I
	Spain	Valencia	SP-Vv	<i>S. nigrum</i>	39.49N	0.34W	18	16	1	0	0	-	0	1		I
	Spain	Benferi	SP-Va	<i>S. nigrum</i>	38.18N	0.99W	6	17	1,01	0.003	0.003	0	0	2		I
	Spain	La Pobla de Vallbona	SP-V	<i>S. nigrum</i>	39.63N	0.52W	8	18	1,11	0.033	0.039	-0.129	0	3	I	
	Spain	Ahama de Murcia	SP-M	<i>S. nigrum</i>	37.82N	1.44W	15	18	1,06	0.013	0.005	0.657**	1	3	I	
	France	Saint-Jeannet	FRSJ	<i>S. esculentum</i>	43.74N	7.18E	28	16	1	0	0	-	0	1	I	
	Tunisia	Zaafrane	TU-L	<i>S. nigrum</i>	36.19N	8.86E	14	16	1	0	0	-	0	1	MED	I
	Tunisia	Kledia	TU-B	<i>S. nigrum</i>	36.66N	10.20E	14	16	1	0	0	-	0	1		I
	Greece	Timpakion	GR	<i>S. nigrum</i>	35.07N	24.77E	16	16	1	0	0	-	0	1		I
	Spain	Granada ¹	SP-Ag	<i>S. nigrum</i>	36.72N	3.49W	16	23	1,34	0.122	0.071	0.446	0	15		I
	Spain	Malaga ¹	SP-Am	<i>S. nigrum</i>	36.76N	4.04W	23	24	1,40	0.138	0.087	0.389**	0	17		I
	Portugal	Castanheira do Ribatejo ²	POR-L	<i>S. nigrum</i>	38.99N	8.97W	26	32	1,92	0.321	0.191	0.422**	1	9		II
	Portugal	Aljustrel ²	POR-B	<i>S. nigrum</i> / <i>S. esculentum</i>	37.88N	8.16W	27	32	1,95	0.375	0.288	0.249	0	15		POR
	Portugal	Ameal	POR-C	<i>S. nigrum</i>	40.19N	8.53W	10	27	1,58	0.142	0.123	0.196	1	5	II	
	Portugal	Lagos	POR-SW	<i>S. nigrum</i>	37.11N	8.69W	11	16	1	0	0	-	0	1	II	
	France	Torreilles	FR-TO	<i>S. nigrum</i>	42.74N	2.96W	27	17	1,01	0.002	0.002	-0.0000	0	2	POR+Cat	
	France	Sainte-Marie	FR-SM	<i>S. nigrum</i>	42.71N	3.02W	31	17	1,04	0.009	0.006	0.362**	1	3	II	
Total							649									

1: Samples grouped as Andalusia (AND) in the text
 2: Samples in which individuals belonging to the two main divergent lineages (I and II) have been founded with some hybrid individuals between these two lineages.

Table 2. Analysis of molecular variance (AMOVA) showing the distribution of genetic variation among a) among two major divergent lineages (I and II) b) native and introduced areas.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Pourcentage of variation
a) Lineage I and II				
Among groups	1	878.168	1.28990 a	27.27
Among populations within groups	31	3518.810	2.92206 b	61.79
Within populations	1265	654.468	0.51737 c	10.94
b) Native and introduced areas				
Among groups	1	2179.052	3.41809 a	59.28
Among populations within groups	31	2217.926	1.83045 b	31.75
Within populations	1265	654.468	0.51737 c	8.97

Table 3. Prior distribution of demographical and historical parameters describing: a) the three introduction scenarios of *T. evansi* in the Europe and Africa and b) in the admixture model in Portugal. Prior distributions for marker parameters were the same in the two ABC analyses.

	Parameters	Distribution
Demographical parameters		
a		
	Ne1	Uniform[10-500]
	Ne2	Uniform[10-500]
	Ne3	Uniform[10-500]
	Ne4	Uniform[10-500]
	Nf2	Uniform[1-500]
	Nf3	Uniform[1-500]
	Nf4	Uniform[1-500]
	t1	Uniform[1-500]
	t2	Uniform[1-500]
	t3	Uniform[1-2000]
	<i>db</i>	Uniform[1-10]
b		
	Ne1	Uniform[10-500]
	Ne2	Uniform[10-500]
	Ne3	Uniform[10-500]
	ta	Uniform[1-500]
	r	Uniform[0.001- 0.999]
	td	Uniform[5000 -200000]
	NeS	Uniform[1,500]
Marker parameters		
	mean μ	Uniform[10 ⁻⁴ - 10 ⁻³]
	gam μ	Gamma[10 ⁻⁵ - 10 ⁻²]
	mean <i>P</i>	Uniform[0.1 - 0.3]
	gam <i>P</i>	Gamma[0.01-0.90]

Nei is the effective population size, Nfi, the effective number of founders, ti, the time of introduction events translated into numbers of generations, the duration of the initial bottleneck (*db*) in generations. Note the result of setting condition t2 > t1, t3>t1 and t3>t2 on the prior distributions of these parameters.

For microsatellite marker parameters, each locus was assumed to follow a generalized stepwise mutation model (GSM) with a possible range of 40 contiguous allelic states. The mean mutation rate (mean μ) was drawn in a uniform distribution and mutation rates for each locus were drawn independently from a Gamma distribution (mean= μ and shape=2). The mean parameter of the geometric distribution (mean *p*) of the length in number of repeats of mutation events was drawn in a uniform distribution and the parameters for individual loci were drawn from a Gamma distribution (mean = *p* and shape = 2).

For several *T. evansi* microsatellite loci, uneven insertion/deletion events were suspected based on observed allele sizes (i.e., some allele lengths in bp were not multiple of the motif length implying that there has been indel mutations) were also simulated using Gamma distribution for drawing rates of single nucleotide uneven insertion/deletion events at each individual loci (mean =mean μ SNI and shape= 2) (Reference).

Figure Legends

Figure 1. Sampled localities of *Tetranychus evansi* in: a) South America (Brazil); b) the Mediterranean basin, Portugal and Canary Islands; and c) East Africa (Kenya and Tanzania). 6 genetic clusters identified by structure analyses were also indicated (see Table 1).

Figure 2. Individual membership coefficients calculated for several *Tetranychus evansi* samples for (a) entire dataset, (b) for cluster I and II determined [analyses conducted separately for each cluster identified] and (c) for introduced populations from STRUCTURE simulations using 16 microsatellites loci. For both STRUCTURE analyses (b and c), the associated geographical region is indicated (see Table 1 for abbreviation). Individuals are represented by vertical lines divided into parts proportional to their proposed ancestry in each STRUCTURE -defined genetic cluster.

Figure 3. Schematic representation of the three Introduction scenarios considered for the inference of the introduction routes in Africa and Europe. Four wild populations i (native and introduced) were considered in this analysis and identified by clustering STRUCTURE analysis (see Fig. 2b and Table 1). The native cluster Ia or (BR-SW) gathered three Southern Brazilian samples from Uruguaiana, Alegrete and Itaqui, however, the last population from Itaqui was eliminated from ABC analyses because it had the highest proportion of private alleles at high frequency and shared only 29% of their alleles with introduced populations (data not shown). Although East African (AF) and South European (EU) samples showed a high genetic homogeneity and were gathered in Ib cluster, we separated them into two populations: East African (AF) and South Europe (EU) in ABC analysis. From Ic cluster or MED, only Andalusia (AND), including Granada and Malaga samples, was considered because the two Tunisian and Greek populations were monomorphic at all loci and their shared single multilocus genotype was present in Andalusia samples. Notes: Pop1 is the native population (BR-SW) and pop2, pop3 and, pop4 are the introduced populations and correspond to East African (AF), South European (EU) and Andalusia (AND) populations respectively. Ne_i and Nf_i correspond to effective population sizes and number of founder individuals and were assumed to be different in all considered populations; the time of events (t_i), in number of generation, corresponds to the time at which an introduced population had diverged from its source population; the duration of the initial bottleneck (db) was assumed to be the same in all the introduced populations. We also assumed that all populations evolved as isolated demes

and no exchange of migrants occurred after the introduction. All parameters with associated prior distributions are described in Table 3.

Figure 4. Schematic representation of the admixture scenario tested in ABC analysis. Two parental populations (1 and 2 corresponding to Lagos and Luz de Tavira in AF+EU and POR-Cat clusters respectively) with constant effective population sizes N_{e1} and N_{e2} have diverged at time (t_d) from an ancestral population of size N_{eS} . At time t_a , there has been an admixture event between individuals from the pop1 and from the pop2 giving birth to an admixed population (pop3) with effective size N_3 and with an admixture rate r relative to population 1 and $1-r$ to population 2. All parameters with associated prior distributions are described in Table 3.

Figure 5. Prior and posterior distributions density curves for: I) three different times of *Tetranychus evansi* introduction events, calculated under scenario 2, a) t_1 : the divergence time between East African (AF) and European (EU) populations, b) t_2 : between the Andalusia (AND) and East Africa (AF), and c) t_3 corresponds to the divergence time between populations from Brazil (BR-SW) and Andalusia (AND) and II) calculated under the admixture scenario for a') t_a : the admixture time in the hydride population (POR), b') t_d : the divergence time between the two parental populations pop1 and pop2 belonging to the two main mt lineages (I and II), and c) r : the genetic admixture in POR population. The solid line corresponds to the posterior density curves. Y-axis: probability density of estimated parameters. The best estimates of estimated parameters occur where the posterior probability density function peaks.



Figure 1

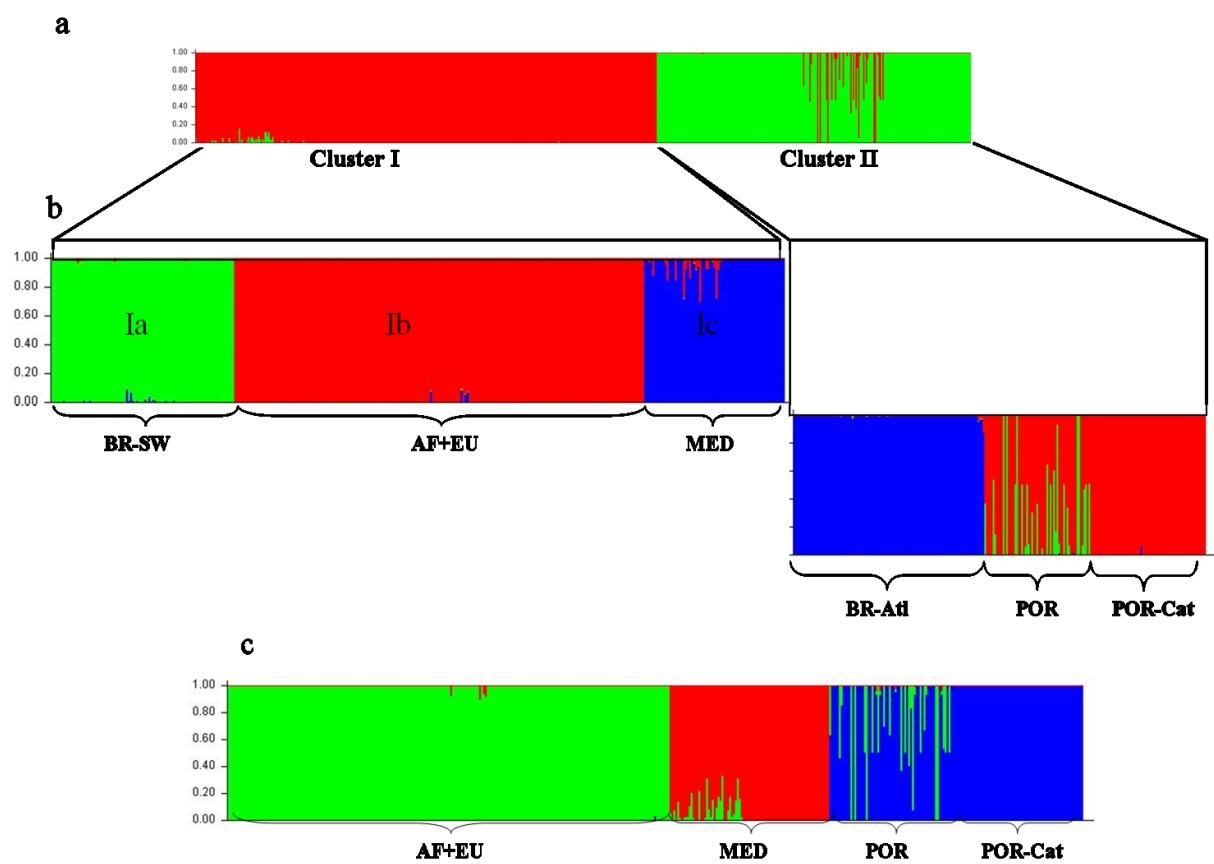


Figure 2

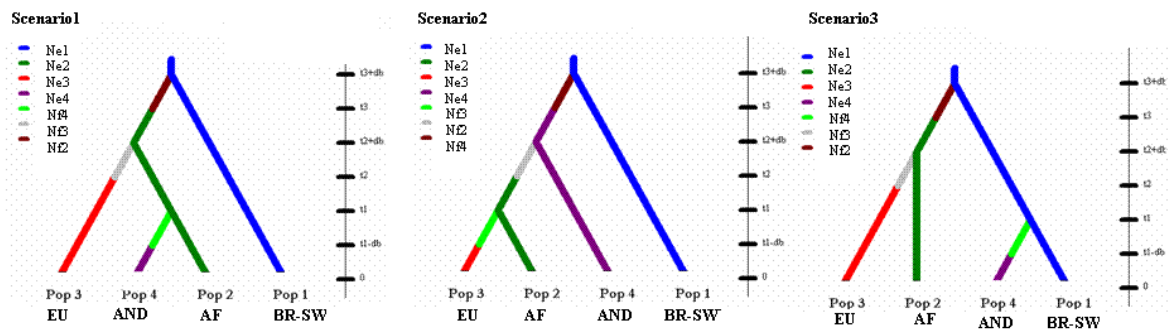


Figure 3

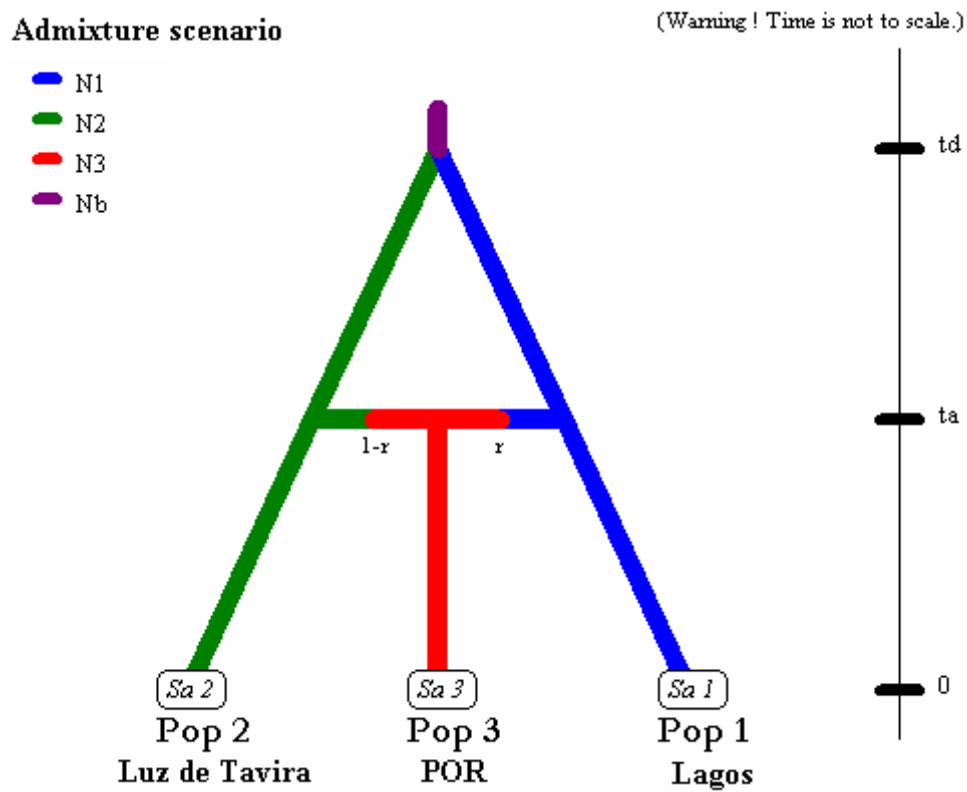


Figure 4

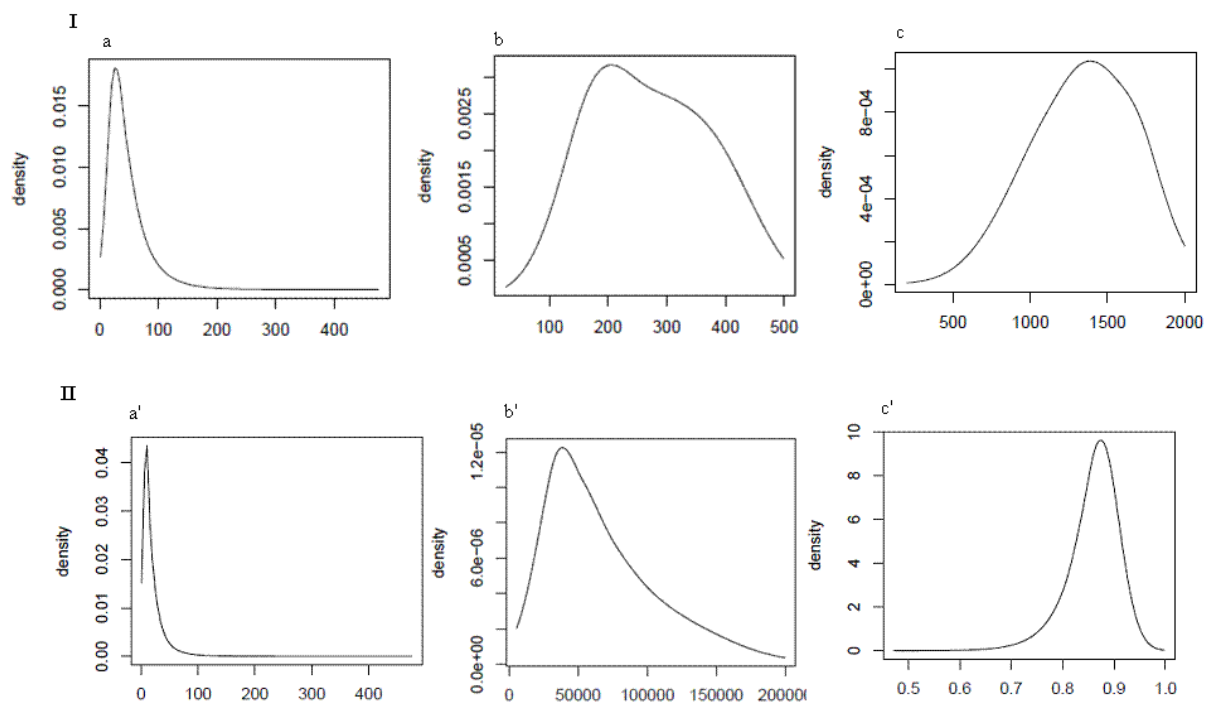


Figure 5

Chapitre V

V Conclusion générale et perspectives

V.1 Succès de l'invasion de *Tetranychus evansi*

Lors de la colonisation de nouveaux environnements, la population introduite subit un goulot d'étranglement, qui réduit la petite taille efficace de la population. La perte de variabilité génétique que cela entraîne tend à réduire le potentiel d'adaptation (voir section I.4) (Allendorf, Lundquist, 2003; Dlugosch, Parker, 2008a; Nei *et al.*, 1975; Sakai *et al.*, 2001). Pourtant, de nombreuses invasions ont eu lieu malgré d'importantes réductions de variabilité génétique associée à la colonisation (Dlugosch, Parker, 2008b; Golani *et al.*, 2007; Lindholm *et al.*, 2005; Puillandre *et al.*, 2008; Solignac *et al.*, 2005; Tsutsui *et al.*, 2000; Zayed *et al.*, 2007).

Dans notre étude, l'invasion de *T. evansi*, à l'exception du sud de l'Europe, est caractérisée par une très faible diversité génétique (mitochondriale et nucléaire) à une grande échelle géographique. La plupart des localités n'ont montré aucune variabilité génétique. Une explication qui a été proposée pour interpréter ce paradoxe évolutif est que la variance génétique additive, plutôt que la diversité génétique mesurée à l'aide des marqueurs neutres, qui répond à la sélection naturelle (Lee, 2002; Prentis *et al.*, 2008). Dans leur étude, Reed, Frankham (2001) n'ont pas trouvé de corrélation significative et claire entre l'héritabilité, qui correspond à la part de la variance génétique additive de la variance génétique totale des caractères, et la diversité génétique neutre à travers les taxons qu'ils ont analysés. Ainsi, la diversité génétique neutre ne semble pas être un bon indicateur de la variance génétique additive pour certains traits d'histoire de vie qui peuvent favoriser l'invasion (Dlugosch, Parker, 2008a; Lee, 2002; Lindholm *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2006). Dans le cas de *T. evansi*, j'ai travaillé sur des marqueurs neutres alors que c'est sur des caractères fonctionnels que la sélection s'exerce.

Bien que l'adaptation des populations dans les aires d'introduction puisse, dans certains cas, jouer un rôle dans le succès de l'invasion, un nombre croissant d'études suggère que l'invasion peut être le résultat d'une population particulièrement envahissante qui peut servir de source de colonisation pour des nouvelles zones (Ciosi *et al.*, 2008; Downie, 2002; Lombaert *et al.*, 2010). Dans notre étude, les données génétiques ont permis de révéler qu'un potentiel invasif différent semble exister entre les deux lignées d'acariens détectées.

L'invasion par les acariens de la lignée I est caractérisée par une large distribution géographique incluant l'ensemble du bassin méditerranéen avec l'Afrique, l'Asie et l'Amérique du nord (nous avons pu séquencer partiellement un spécimen de Floride et plusieurs de Guadeloupe, tous appartenaient à la lignée I) alors que l'invasion par les individus de la lignée II est restreinte au Portugal et à la Catalogne (française et espagnole). En plus des différences dans leur répartition géographique, les deux lignées semblent se distinguer par leur dynamique des populations et par leur spectre de plantes hôtes. Les acariens qui appartiennent à la lignée I ont été signalés dans des zones où des infestations importantes d'acariens ont été rapportées sur différentes plantes de la famille des solanacées cultivées (tomate, aubergine, tabac, pomme de terre, poivron, etc.) et sauvages (morelle noire, datura, etc.). C'est le cas au Kenya (Saunyama, Knapp 2003; Sibanda *et al.* 2000), au Sénégal (Duverney *et al.*, 2005), en Espagne (Ferragut, Escudero 1999), en France et aux îles Canaries (nos observations) et en Algérie (Guenauoui, 2010). En revanche, dans les régions où des acariens de la lignée II sont présents, de fortes densités de populations n'ont jamais été enregistrées et les populations d'acariens n'ont été observées qu'en association avec des solanacées sauvages comme la morelle noire et le datura. Bien que les acariens de la lignée I aient partagé les deux haplotypes les plus distribués H1 et H4 et se soient bien établis dans des régions où les conditions climatiques sont favorables à cette espèce (la région méditerranéenne et l'Afrique du sud et de l'est), l'haplotype H4 a été également détecté dans des lieux au-delà des régions climatiques modélisées comme régions favorables pour cette espèce en Asie et au Niger (voir section II.3.3). Quelques exemples montrent que la plasticité phénotypique semble avoir joué un rôle plus important que la diversité génétique dans le succès de l'invasion (Ahern *et al.*, 2009; Richards *et al.*, 2008; Valiente *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

Il semble bien que *T. evansi* possède une certaine plasticité concernant le spectre de plantes hôtes qu'il exploite ce qui a certainement favorisé la colonisation de nouveaux milieux lors de l'invasion. Pour évaluer la part entre le rôle de la sélection et celui de la plasticité phénotypique dans le succès de l'invasion de *T. evansi*, il serait intéressant de mener des études comparatives entre des populations natives et introduites pour certains traits biologiques qui semblent déterminants pour son invasion tels que la tolérance au froid, le spectre d'utilisation et adaptation à la plante hôte.

Dans son aire d'origine en Amérique du Sud, *T. evansi* n'est pas considéré comme un ravageur important de la culture de tomate, à l'exception d'une période à la fin des années soixante-dix et au début des années quatre-vingt (voir section IV.2). Deux ennemis naturels

spécifiques, l'acarien prédateur *Phytoseiulus longipes* et le champignon pathogène *Neozygites floridana* sont considérés comme des régulateurs naturels des populations de *T. evansi* au Brésil (voir section II.3.6).

Outre ces ennemis naturels spécifiques, *T. evansi* souffre de la pression des généralistes et des compétiteurs, où plusieurs acariens prédateurs et d'autres tétranyques compétiteurs ont été observés en association avec lui sur les solanacées sauvages et la tomate au Brésil. Ceci pourrait expliquer les faibles densités de populations de *T. evansi* que nous avons généralement observées au cours de notre échantillonnage au Brésil, et au cours d'autres prospections (Da Silva *et al.*, 2008; De Vasconcelos *et al.*, 2008; Fiaboe *et al.*, 2007b; Furtado *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2007; Furtado *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2005). En revanche, dans l'aire d'introduction, outre le relâchement des ennemis naturels les acariens prédateurs généralistes ainsi que spécialistes habituellement utilisés contre les tétranyques, ne se sont pas avérés efficaces pour contrôler *T. evansi* (De Moraes, McMurtry, 1986; De Moraes, Lima, 1983; De Moraes, McMurtry, 1985; Escudero, Ferragut, 2005). Tandis que les autres tétranyques qui occupaient auparavant les solanacées sont régulés par leurs ennemis naturels spécialistes et les généralistes.

Ainsi, le succès de *T. evansi* à coloniser des nouveaux environnements semble être expliqué par l'avantage du relâchement de ses ennemis naturels spécifiques. L'histoire adaptative des espèces explique que les prédateurs s'attaquent préférentiellement aux espèces indigènes plutôt qu'aux exotiques, engendrant ce que l'on appelle la compétition apparente (Holt, 1977). Ainsi, ce phénomène de compétition apparente explique également en partie le succès de *T. evansi*. Lors de nos prospections en Europe, en plein air et sous serre, les populations de *T. evansi* étaient présentes en fortes densités et nous avons rarement observé des prédateurs, si ce n'est la coccinelle généraliste *Stethorus punctillum* ou d'autres tétranyques associés avec ces colonies sur les solanacées sauvages (la morelle noire ou le datura) ou cultivés (tomates, aubergine ou pomme de terre).

V.2 Validation des scénarios de colonisation de *Tetranychus evansi*

Les méthodes ABC utilisées ici ont permis de reconstituer deux voies indépendantes et complexes des invasions récentes, malgré les lacunes des données historiques fiables et les faibles niveaux de variation génétique des marqueurs microsatellites dans les populations étudiées. Elles ont également fourni des estimations sur les périodes de pré-détection, qui sont problématiques pour les biologistes et les gestionnaires de l'invasion (Sax *et al.*, 2007). De plus, ces méthodes ont permis d'estimer le temps de divergence entre ces deux lignées détectées au sein des échantillons natifs et introduits et le temps d'événement d'hybridation détectée entre elles au Portugal (voir section IV.4). Cependant, comme pour toute approche bayésienne, il faut se poser la question de la pertinence des distributions a priori et de leur éventuelle influence sur les distributions a posteriori des paramètres.

Dans notre cas, un fort contraste existe entre les distributions a priori et les distributions a posteriori pour les paramètres historico-démographiques. Cependant, on doit s'interroger sur la stabilité des estimations de ces paramètres et leur dépendance aux autres jeux de distributions a priori. C'est notamment le cas pour les dates d'introduction de *T. evansi* en Europe, estimée à environ 140 ans. Ces estimations nous semblent incompatibles avec les données historiques et environnementales en Europe.

On sait par ailleurs, que les paramètres démographiques de *T. evansi* (le nombre de générations et la taille efficace des populations) sont fluctuants et varient considérablement en fonction des conditions écologiques (voir section II.3.2). Ceci peut conduire à influencer les distributions a posteriori pour les paramètres historico-démographiques en fonction des distributions a priori pour ces paramètres. Pour valider ce modèle dans le cas des espèces haplodiploïdes, nous proposons de tester cette approche sur d'autres espèces de tétranyques pour lesquelles nous disposons de plus de données historiques et écologiques, telles que *Oligonychus perseae* Tuttle, Baker & Abbatiello, 1976, *Eutetranychus orientalis* Klein, 1936 et *Eurytetranychus banksi* McGregor, 1914. Ce sont des ravageurs de plantes pérennes, qui ne subissent pas d'aussi fortes fluctuations démographiques et dont l'introduction a été bien datée (Migeon, Dorkeld, 2006). Appliquer cette approche à de telles espèces haplodiploïdes pourrait nous permettre d'évaluer la pertinence de nos estimations.

Bibliographie

- Ahern R, Hawthorne D, Raupp M (2009) Founder effects and phenotypic variation in *Adelges cooleyi*, an insect pest introduced to the eastern United States. *Biological Invasions* **11**, 959- 971.
- Allendorf FW, Lundquist LL (2003) Introduction: Population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology* **17**, 24-30.
- Alroth P, Alatalo RV, Holopainen A, Kumpulainen T, Suhonen J (2003) Founder population size and the number of source populations enhance colonisation success in water striders. *Oecologia* **137**, 617-620.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 535-544.
- Auffray JC, Vanlerberghe F, Britton-Davidian J (1990) The house mouse progression in Eurasia: a palaeontological and archaeozoological approach. *Biological Journal of the Linnean Society* **41**, 13-25.
- Ayres DR, Grotkopp E, Zaremba K, Sloop CM, Blum MJ, Bailey JP, Anttila CK, Strong DR (2008) Hybridization between invasive *Spartina densiflora* (Poaceae) and native *S. foliosa* in San Francisco Bay, California, USA. *American Journal of Botany*. **95**, 713-719.
- Baker HG (1965) Characteristics and modes of origin of weeds. In: *The Genetics of Colonizing Species* (eds. Baker HG, Stebbins GL), pp. 147-168. Academic Press, New York.
- Baker EW, Pritchard AE (1960) The Tetranychoid mites of Africa. *Hilgardia* **29**, 455-574.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**, 729-744.
- Baumel A, Ainouche ML, Levasseur JE (2001) Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Molecular Ecology* **10**, 1689-1701.
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian Computation in Population Genetics. *Genetics* **162**, 2025-2035.
- Ben-David T, Melamed S, Gerson U, Morin S (2007) ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and applied acarology* **41**, 169-181.
- Berggren A (2001) Colonization success in roesel's bush-cricket *Metrioptera roeseli*: The effects of propagule size. *Ecology* **82**, 274-280.
- Binggeli P (2001) The human dimensions of invasive woody plants. In: *The Great Reshuffling: Human Dimensions of Alien Invasive Species* (ed. McNeely JA), pp. 145-159. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge.
- Blair BW (1983) *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari : Tetranychidae) : a new pest of tobacco in Zimbabwe. *Corest Phytopathology and Agronomy Study Group, Bergerac*, 1-6.
- Blair BW (1989) Laboratory screening of acaricides against *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard. *Crop Protection* **8**, 212-216.
- Blair AC, Hufbauer RA (2010) Hybridization and invasion: one of North America's most devastating invasive plants shows evidence for a history of interspecific hybridization. *Evolutionary Applications* **3**, 40-51.
- Bolland HR, Gutierrez J, Flechtmann CHW (1998) World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Brill Academic publisher, Leiden.

- Bonato O (1999) The effect of temperature on life history parameters of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and applied acarology* **23**, 11-19.
- Bossdorf O, Auge H, Lafuma L, Rogers W, Siemann E, Prati D (2005) Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* **144**, 1-11.
- Britto E, Gondim M, Torres J, Fiaboe K, Moraes G, Knapp M (2009) Predation and reproductive output of the ladybird beetle *Stethorus tridens* preying on tomato red spider mite *Tetranychus evansi*. *BioControl* **54**, 363-368.
- Caldera E, Ross K, DeHeer C, Shoemaker D (2008) Putative native source of the invasive fire ant *Solenopsis invicta* in the USA. *Biological Invasions* **10**, 1457-1479.
- Carbonnelle S, Hance T, Migeon A, Baret P, Cros-Arteil S, Navajas M (2007) Microsatellite markers reveal spatial genetic structure of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations along a latitudinal gradient in Europe. *Experimental and Applied Acarology* **41**, 225-241.
- Cassey P, Blackburn TM, Russell GJ, Jones KE, Lockwood JL (2004a) Influences on the transport and establishment of exotic bird species: an analysis of the parrots (Psittaciformes) of the world. *Global Change Biology* **10**, 417-426.
- Cassey P, Blackburn TM, Sol D, Duncan RP, Lockwood JL (2004b) Global patterns of introduction effort and establishment success in birds. *Biological Letters* **274**, S405-S408.
- Castagnoli M, Nannelli R, Simoni S (2006) Un nuovo temibile fitofago per la fauna Italiana: *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae). *Informatore Fitopatologico* **5**, 50-52.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards WF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* **21**, 550-570.
- Chen Y, Opp S, Berlocher S, Roderick G (2006) Are bottlenecks associated with colonization? Genetic diversity and diapause variation of native and introduced *Rhagoletis completa* populations. *Oecologia* **149**, 656-667.
- Ciosi M, Miller NJ, Kim KS, Giordano R, Estoup A, Guillemaud T (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Molecular Ecology* **17**, 3614-3627.
- Colautti RI, MacIsaac HJ (2004) A neutral terminology to define 'invasive' species. *Diversity & Distributions* **10**, 135-141.
- Colautti RI, Grigorovich IA, MacIsaac HJ (2006) Propagule Pressure: A Null Model for Biological Invasions. *Biological Invasions* **8**, 1023-1037.
- Colautti RI, Ricciardi A, Grigorovich IA, MacIsaac HJ (2004) Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters* **7**, 721-733.
- Cornuet JM, Beaumont MA, Estoup A, Solignac M (2006) Inference on microsatellite mutation processes in the invasive mite, *Varroa destructor*, using reversible jump Markov chain Monte Carlo. *Theoretical Population Biology* **69**, 129-144.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* **24**, 2713-2719.
- Costa JM, Heuvelink E (2005) Introduction: the tomato crop and industry. In: *Tomatoes* (ed. Heuvelink E), pp. 1-19. CABI Publishing, Wallingford.
- Cox GW (2004) Founder effects and exotic variability. In: *Alien Species and Evolution: The Evolutionary Ecology of Exotic Plants, Animals, Microbes, and Interacting Native Species* (ed. Cox GW), pp. 32-46. Island Press, Washington.

- Croft BA, Van De Baan HE (1988) Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. *Experimental and Applied Acarology* **4**, 277-300.
- Crozier RH (1985) Adaptive Consequences of Male-haploidy. In: *spider mites, their biology, natural enemies and control* (eds. Helle W, Sabelis MW), pp. 201-222. Elsevier, Amsterdam.
- Da Silva F, De Moraes G, Knapp M (2008) Distribution of *Tetranychus evansi* and its predator *Phytoseiulus longipes* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) in southern Brazil. *Experimental and Applied Acarology* **45**, 137-145.
- Dalton R (2006) Whitefly infestations: The Christmas Invasion. *Nature* **443**, 898-900.
- Darling JA, Bagley MJ, Roman J, Tepolt CK, Geller JB (2008) Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Molecular Ecology* **17**, 4992-5007.
- Davies N, Villablanca FX, Roderick GK (1999) Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 17-21.
- Davis MA, Thompson K (2000) Eight ways to be a colonizer; two ways to be an invader: a proposed nomenclature scheme for invasion ecology. *Bulletin of the Ecological Society of America* **81**, 226.
- De Barro PJ (1985) Reproductive barriers. In: *Spider mites, their biology, natural enemies and control* (eds. Helle W, Sabelis MW), pp. 193-199. Elsevier, Amsterdam.
- De Moraes GJ, Lima HC (1983) Biology of *Euseius concordis* (Chant) (Acarina: Phytoseiidae) a predator of the tomato russet mite. *Acarologia* **24**, 251-255.
- De Moraes GJ, McMurtry JA (1985) Comparison of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) as prey for eight species of phytoseiid mites. *Entomophaga* **30**, 393-397.
- De Moraes GJ, McMurtry JA (1986) Suitability of the spider mite *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **40**, 109-115.
- De Moraes GJ, McMurtry JA (1987) Effect of temperature and sperm supply on the reproductive potential of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* **3**, 95-107.
- De Moraes GJ, McMurtry JA, Baker EW (1987) Redescription and distribution of the spider mites *Tetranychus evansi* and *T. marianae*. *Acarologia* **28**, 333-343.
- De Moraes GJ, Ramalho FS, Oliveira CAV, Freire LC (1986) Artropodos associados ao tomateiro industrial em Petrolina, PE e racionalizaçao do uso de defensivos agrícolas. *Boletim de Pesquisa* **28**, EMBRAPA-CPATSA. Petrolina.
- De Vasconcelos G, De Moraes G, Júnior Í, Knapp M (2008) Life history of the predatory mite *Phytoseiulus fragariae* on *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae) at five temperatures. *Experimental and Applied Acarology* **44**, 27-36.
- Dehnen-Schmutz K, Touza J, Perrings C, Williamson M (2007a) A century of the ornamental plant trade and its impact on invasion success. *Diversity and Distributions* **13**, 527-534.
- Dehnen-Schmutz K, Touza J, Perrings C, Williamson M (2007b) The Horticultural Trade and Ornamental Plant Invasions in Britain. *Conservation Biology* **21**, 224-231.
- Denholm I, Cahill M, Dennehy TJ, Horowitz AR (1998) Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplified by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **353**, 1757-1767.

- Denmark HA (1970) The mariana mite, *Tetranychus marianae* McGregor, in Florida (Tetranychidae: Acarina), p. 1, Florida Bureau of Entomology.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008a) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**, 431-449.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008b) Invading populations of an ornamental shrub show rapid life history evolution despite genetic bottlenecks. *Ecology Letters* **11**, 701-709.
- Downie DA (2002) Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology* **11**, 2013-2026.
- Drake JM, Baggenstos P, Lodge DM (2005) Propagule pressure and persistence in experimental populations. *Biology Letters* **1**, 480-483.
- Duncan RP, Bomford M, Forsyth DM, Conibear L (2001) High predictability in introduction outcomes and the geographical range size of introduced Australian birds: a role for climate. *Journal of Animal Ecology* **70**, 621-632.
- Durka W, Bossdorf O, Prati D, Auge H (2005) Molecular evidence for multiple introductions of garlic mustard (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae) to North America. *Molecular Ecology* **14**, 1697-1706.
- Duverney C, Kade N, Nguaye-Ndiaye A (2005) Essais préliminaires pour limiter les dégâts de Tetranychidae sur les cultures maraichères dans le Sine-Saloum (Sénégal). *Comptes rendus du deuxième colloque international sur les acariens des cultures*, 24-25 octobre, Annales AFPP. Montpellier, France.
- Ehara S, Ohashi K (2002) A new species of from *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae) the Kinki District, Japan. *Acta Arachnologica* **51**, 19-22.
- El-Jaouani N (1988) Contribution à la connaissance des acariens phytophages au Maroc et étude bio-écologique de *Tetranychus evansi* Baker et Pritchard (Acarina : Tetranychidae). Thèse de doctorat, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.
- Ellstrand NC, Schierenbeck KA (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 7043-7050.
- Elton CS (1958) The ecology of invasions by animals and plants. The University of Chicago Press, Chicago.
- Escudero LA, 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.
- Estoup A, Angers B (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: *Advances in Molecular Ecology* (ed. Carvalho G), pp. 55-86. NATO Press, Amsterdam.
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04773.x
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study. *Molecular ecology* **14**, 2611-2620.
- FAO. 2008-FAOSTAT-Agriculture. <http://faostat.fao.org> (consulté en juin 2010).
- Facon B, Crespin L, Loiseau A, Lombaert E, Magro A, Estoup A (2010) Can things get worse when an invasive species hybridizes? The harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in France as a case study. *Evolutionary Applications* doi: 10.1111/j.1752-4571.2010.00134.x

- Facon B, Genton BJ, Shykoff J, Jarne P, Estoup A, David P (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 130-135.
- Facon B, Jarne P, Pointier JP, David P (2005) Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 524-535.
- Ferragut F, Escudero LA (1999) *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari, Tetranychidae), una nueva araña roja en los cultivos hortícolas españoles. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* **25**, 157-164.
- Ferreira MA, Carmona MM (1995) Acarofauna do tomateiro em Portugal. *Avances en entomologia, Ibérica*. 385-392.
- Ferrero M (2009) Le système tritrophique tomate-tétranyques tisserands-*Phytoseiulus longipes*. Etude de la variabilité des comportements alimentaires du prédateur et conséquences pour la lutte biologique. Thèse de doctorat, SupAgro, Montpellier, France.
- Fiaboe KKM, Gondim JMGC, De Moraes GJ, Ogol CKPO, Knapp M (2007a) Bionomics of the acarophagous ladybird beetle *Stethorus tridens* fed *Tetranychus evansi*. *Journal of Applied Entomology* **131**, 355-361.
- Fiaboe KKM, Gondim JMGC, De Moraes GJ, Ogol CKPO, Knapp M (2007b) Surveys for natural enemies of the tomato red spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in northeastern and southeastern Brazil. *Zootaxa* **1395**, 33-58.
- Foucaud J, Orivel J, Loiseau A, Delabie JHC, Jourdan H, Konghouleux D, Vonshak M, Tindo M, Mercier JL, Fresneau D, Mikissa JB, McGlynn T, Mikheyev AS, Oettler J, Estoup A (2010) Worldwide invasion by the little fire ant: routes of introduction and eco-evolutionary pathways. *Evolutionary Applications* **3**, 363-374.
- Frankham R (2005) Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity* **94**, 385-385.
- Furtado I, Kreiter S, De Moraes GJ, Tixier MS, Flechtman C, Knapp M (2005) Plant mites (Acari) from Northeastern Brazil, with descriptions of two new species of the family Phytoseiidae (Mesostigmata). *Acarologia* **45**, 131-143.
- Furtado I, De Moraes JG, Kreiter S, Knapp M (2006) Search for effective natural enemies of *Tetranychus evansi* in south and southeast Brazil. *Experimental and Applied Acarology* **40**, 157-174.
- Furtado I, De Moraes GJ, Kreiter S, Tixier MS, 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.
- Garzón-Luque E, Pascual A, Ragusa E, Ferragut F (2008) Host plant range of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in the Mediterranean. Field and laboratory evidences. *Proceedings of the 6th EURAAC, 21-25th July, Montpellier, France*.
- Genton BJ, Shykoff JA, Giraud T (2005) High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology* **14**, 4275-4285.
- Golani D, Azzurro E, Corsini-Foka M, Falautano M, Andaloro F, Bernardi G (2007) Genetic bottlenecks and successful biological invasions: the case of a recent Lessepsian migrant. *Biology Letters* **3**, 541-545.
- Goodwin BJ, McAllister AJ, Fahrig L (1999) Predicting Invasiveness of Plant Species Based on Biological Information. *Conservation Biology* **13**, 422-426.
- Grapputo A, Boman S, Lindstrom L, Lyytinen A, Mappes J (2005) The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology* **14**, 4207-4219.

- Griffing B (1982) A theory of natural selection incorporating interactions among individuals. IX. Use of groups consisting of a mating pair together with haploid and diploid caste members. *Journal of Theoretical Biology* **95**, 199-223.
- Grosholz ED (2005) Recent biological invasion may hasten invasional meltdown by accelerating historical introductions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1088-1091.
- Guenauoui Y (2010) *Tetranychus evansi* (Baker & Pritchard) (Acari:Tetranychidae) acarien invasif signalé sur culture de tomate à Mostaganem dans le nord-ouest de l'Algérie. *EPPO Bulletin* **40**, 193-195.
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, Cornuet JM, Estoup A (2010) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity* **104**, 88-99.
- Gutierrez J (1983) Le rôle de l'homme dans la dispersion et l'établissement des acariens phytophages à travers le domaine insulaire de l'Indo-Pacifique. *Bulletin de Liaison - SEPANRIT* **12** spécial, 161-166.
- Gutierrez J (1985) Systematics. In: *Spider mites, their biology, natural enemies and control* (eds. Helle W, Sabelis MW), pp. 75-90. Elsevier, Amsterdam.
- Gutierrez J (1991) Acariens Tetranychidae: quelques caractéristiques de la famille et principales espèces vivant sur manioc en Afrique. Atelier Réseau Manioc CORAF, 4-8 mars, Cotonou, Bénin.
- Gutierrez J, Etienne J (1986) Les Tetranychidae de l'île de la Réunion et quelques-uns de leurs prédateurs. *L'Agronomie Tropicale* **41**, 84-91.
- Gutierrez J, Helle W, Bolland HR (1979) Etude d'une souche de *Tetranychus piercei* (Acariens: Tetranychidae), d'Indonésie: redescription, caryotype et reproduction. *Entomologische Berichten* **39**, 88-94.
- Gutierrez J, Van Zon AQ (1973) A comparative study of several strains of the *Tetranychus neocaledonicus* complex and sterilization tests of males by X-rays. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **16**, 123-134.
- Harper RW (1966) new pest finds. Bureau of entomology. *California Department of Agriculture Bulletin* **55**, 92-93.
- Havron A, Rosen D, Rössler Y, Hillel J (1987) Selection on the male hemizygous genotype in arrhenotokous insects and mites. *BioControl* **32**, 261-268.
- Hayes K, Barry S (2008) Are there any consistent predictors of invasion success? *Biological Invasions* **10**, 483-506.
- Heger T, Trepl L (2003) Predicting Biological Invasions. *Biological Invasions* **5**, 313-321.
- Helle W (1965) Inbreeding depression in an arrhenotokous mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **8**, 299-304.
- Helle W, Bolland HR, Heitmans WRB (1981) A survey of chromosome complements in the Tetranychidae. *International Journal of Acarology* **7**, 147 - 155.
- Helle W, Pijnacker LP (1985) Parthenogenesis, Chromosomes and Sex. In: *Spider mites, their biology, natural enemies and control* (eds. Helle W, Sabelis MW), pp. 129-139. Elsevier, Amsterdam.
- Ho CC, Wang SC (2007) Addendum on the records of *Tetranychus evansi* in Taiwan. *Plant Protection Bulletin* **49**, 167-168.
- Holt RD (1977) Predation, apparent competition, and the structure of prey communities. *Theoretical Population Biology* **12**, 197-229.
- Hulme PE (2007) Biological Invasions in Europe: Drivers, Pressures, States, Impacts and Responses. In: *Biodiversity Under Threat* (eds. Hester R, Harrison RM), pp. 56-80. Royal Society of Chemistry, Cambridge.

- Hulme PE (2008) Phenotypic plasticity and plant invasions: is it all Jack? *Functional Ecology* **22**, 3-7.
- Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* **46**, 10-18.
- Humber R, De Moraes GJ, dos Santos J (1981) Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* sp (Zygomycetes: Entomophthorales) in northeastern Brazil. *BioControl* **26**, 421-425.
- IUCN (2000) Guidelines for the Prevention of Biodiversity Loss Caused by Alien Invasive Species. International Union for the Conservation of Nature, Gland, Switzerland.
- Kijas J, Fowler J, Garbett C, Thomas M (1994) Enrichment of microsatellites from citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particules. *Biotechniques* **16**, 657-662.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 424-429.
- Jeschke JM, Strayer DL (2005) Invasion success of vertebrates in Europe and North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 7198-7202.
- Kaluza P, Kälzsch A, Gastner MT, Blasius B (2010) The complex network of global cargo ship movements. *Journal of The Royal Society Interface* **7**, 1093-1103.
- Keane RM, Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 164-170.
- Kennedy G, Smitley D (1985) Dispersal. In: *Spider mites, their biology, natural enemies and control* (eds. Helle W, Sabelis MW), pp. 233-242. Elsevier, Amsterdam.
- Kennedy TA, Naeem S, Howe KM, Knops JMH, Tilman D, Reich P (2002) Biodiversity as a barrier to ecological invasion. *Nature* **417**, 636-638.
- Knapp M, Luchen SWS (2000) *Tetranychus evansi* - a new challenge to small-holder tomato growers in southern Africa. XXI International Congress of Entomology, Foz do Iguaçu, Brazil, 12-13.
- Knapp M, Wagener B, Navajas M (2003) Molecular discrimination between the spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *African Entomology* **11**, 300-304.
- Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 199-204.
- Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LRG, Lara AC, Larson A, Losos JB (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* **431**, 177-181.
- Kolbe JJ, Larson A, Losos JB, de Queiroz K (2008) Admixture determines genetic diversity and population differentiation in the biological invasion of a lizard species. *Biology Letters* **4**, 434-437.
- Koller M, Knapp M, Schausberger P (2007) Direct and indirect adverse effects of tomato on the predatory mite *Neoseiulus californicus* feeding on the spider mite *Tetranychus evansi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **125**, 297-305.
- Krishnakumar K, Raghavan R, Prasad G, Bijukumar A, Sekharan M, Pereira B, Ali A (2009) When pets become pests - exotic aquarium fishes and biological invasions in Kerala, India. *Current Science Association* **97**, 474-476.
- Lande R, Engen S, Saether BE (2003) Stochastic population dynamics in ecology and conservation. Oxford University Press, Oxford.
- Langor D, DeHaas L, Footitt R (2009) Diversity of non-native terrestrial arthropods on woody plants in Canada. *Biological Invasions* **11**, 5-19.

- Lee CE (1999) Rapid and repeated invasions of fresh water by the saltwater copepod *Eurytemora affinis*. *Evolution* **53**, 1423–1434.
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 386–391.
- Lee CE, Gelembiuk GW (2008) Evolutionary origins of invasive populations. *Evolutionary Applications* **1**, 427–448.
- Lee CE, Remfert J, Chang Y-M (2007) Response to selection and evolvability of invasive populations. *Genetica* **129**, 179–192.
- Leprieur F, Beauchard O, Blanchet S, Oberdorff T, Brosse S (2008) Fish Invasions in the World's River Systems: When Natural Processes Are Blurred by Human Activities. *PLoS Biol* **6**, e28.
- Levine JM (2008) Biological invasions. *Current Biology* **18**, 57–60.
- Levine JM, D'Antonio CM (1999) Elton revisited: a review of evidence linking diversity and invasibility. *Oikos* **87**, 15–26.
- Lin W, Zhou G, Cheng X, Xu R (2007) Fast Economic Development Accelerates Biological Invasions in China. *PLoS ONE* **2**, e1208.
- Lindholm AK, Breden F, Alexander HJ, Chan W-K, Thakurta SG, Brooks R (2005) Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. *Molecular Ecology* **14**, 3671–3682.
- Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 223–228.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet JM, Malausa T, Facon B, Estoup A (2010) Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE* **5**, e9743.
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M (2007) 100 Espèces Exotiques Envahissantes parmi les plus néfastes au monde. Une sélection de la Global Invasive Species Database.
- Lozier J, Roderick G, Mills N (2009) Tracing the invasion history of mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae), in North America: a population genetics approach. *Biological Invasions* **11**: 299–314.
- Lunt DH, Hyman BC (1997) Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* **387**, 247–247.
- Mabuchi K, Senou H, Nishida M (2008) Mitochondrial DNA analysis reveals cryptic large-scale invasion of non-native genotypes of common carp (*Cyprinus carpio*) in Japan. *Molecular Ecology* **17**, 796–809.
- Mack RN (2003) Global Plant Dispersal, Naturalization, and Invasion: Pathways, Modes, and Circumstances. In: *Invasive species: vectors and management strategies* (eds. Ruiz GM, Carlton JT), pp. 3–30. Island Press, Washington.
- Mack RN, Lonsdale WM (2001) Humans as global plant dispersers: getting more than we bargained for. *BioScience* **51**, 95–102.
- Mack RN, Simberloff D, Mark Lonsdale W, Evans H, Clout M, Bazzaz FA (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* **10**, 689–710.
- Maron JL, Vilà M (2001) When do herbivores affect plant invasion? Evidence for the natural enemies and biotic resistance hypotheses. *Oikos* **95**, 361–373.
- Matesanz S, Gianoli E, Valladares F (2010) Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1206**, 35–55.
- Matisoo-Smith E, Robins JH (2004) Origins and dispersals of Pacific peoples: Evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9167–9172.

- McKinney ML, Lockwood JL (1999) Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 450-453.
- McNeely J (2006) As the world gets smaller, the chances of invasion grow. *Euphytica* **148**, 5-15.
- Mergeay J, Verschuren D, De Meester L (2006) Invasion of an asexual American water flea clone throughout Africa and rapid displacement of a native sibling species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 2839-2844.
- Meyer MKPS (1996) Mite pests and their predators on cultivated plants in Southern Africa: vegetables and berries. *Plant Protection Research Institute Handbook* **6**, 90.
- Meyerson LA, Mooney HA (2007) Invasive alien species in an era of globalization. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**, 199-208.
- Migeon A (2005) Un nouvel acarien ravageur en France: *Tetranychus evansi* Baker et Pritchard. *Phytoma -La Défense des Végétaux* **579**, 38-43.
- Migeon A, Dorkel F (2006) Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>.
- Migeon A, Ferragut F, Escudero-Colomar L, Fiaboe K, Knapp M, Moraes GD, Ueckermann E, Navajas M (2009) Modelling the potential distribution of the invasive tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* **48**, 199-212.
- Miller N, Estoup A, Toepfer S, Bourguet D, Lapchin L, Derridj S, Kim KS, Reynaud P, Furlan L, Guillemaud T (2005) Multiple Transatlantic Introductions of the Western Corn Rootworm. *Science* **310**, 992.
- Mooney HA, Cleland EE (2001) The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 5446-5451.
- Moutia LA (1958) Contribution to the Study of some Phytophagous Acarina and their Predators in Mauritius. *Bulletin of Entomological Research* **49**, 59-75.
- Naeem S, Knops JMH, Tilman D, Howe KM, Kennedy T, Gale S (2000) Plant diversity increases resistance to invasion in the absence of covarying extrinsic factors. *Oikos* **91**, 97-108.
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* **14**, 2729-2738.
- Navajas M, Fenton B (2000) The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology* **24**, 751-774.
- Navajas M, Thistlewood HMA, Lagnel J, Hughes C (1998) Microsatellite sequences are under-represented in two mite genomes. *Insect Molecular Biology* **7**, 249-256.
- Navia D, De Moraes GJ, Roderick G, Navajas M (2005) The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. *Bulletin of Entomological Research* **95**, 505-516.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- Nentwig W (2007) Biological Invasions: why it Matters. In: *Biological Invasions* (ed. Nentwig W). pp. 1-6. Springer, Berlin.
- Noble IR (1989) Attributes of invaders and the invading process: Terrestrial and vascular plants. In: *Biological Invasions: a Global Perspective* (eds. Drake JA, Mooney HJ, Di Castri F, et al.), pp. 301-313. John Wiley & Sons, New York.
- Oatman ER, Fleschner CA, McMurtry JA (1967) New, highly destructive spider mite present in Southern California. *Journal of Economic Entomology* **60**, 477-480.

- Osakabe M, Komazaki S (1997) Differences in ecological and genetic traits between *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) populations infesting citrus and *Osmant hus*. *Experimental and Applied Acarology* **21**, 365-378.
- Pascal M, Vigne JD, Tresset A (2009) L'homme, maître d'oeuvre des invasions biologiques. *Dossier pour la Science* **65**, 8-13.
- Pascual M, Chapuis MP, Mestres F, BalanyÀ J, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L, Estoup A (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* **16**, 3069-3083.
- Pérez J, Nirchio M, Alfonsi C, Muñoz C (2006) The Biology of Invasions: The Genetic Adaptation Paradox. *Biological Invasions* **8**, 1115-1121.
- Perrings C, Dehnen-Schmutz K, Touza J, Williamson M (2005) How to manage biological invasions under globalization. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 212-215.
- Perrings C, Williamson M, Dalmazzone S (2000) *The Economics of Biological Invasions*. Edward Elgar, Cheltenham.
- Perrot-Minnot MJ, Migeon A, Navajas M (2004) Intergenomic interactions affect female reproduction: evidence from introgression and inbreeding depression in a haplodiploid mite. *Heredity* **93**, 551-558.
- Pfenninger M, Reinhardt F, Streit B (2002) Evidence for cryptic hybridization between different evolutionary lineages of the invasive clam genus *Corbicula* (Veneroida, Bivalvia). *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 818-829.
- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* **52**, 273-288.
- Prentis PJ, Wilson JR, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ (2008) Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science* **13**, 288-294.
- Pritchard AE, Baker EW (1955) A revision of the spider mite family Tetranychidae. *Memoirs Series, San Francisco, Pacific Coast Entomological Society* **2**, 472 p.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Puillandre N, Dupas S, Dangles O, Zeddam JL, Capdevielle-Dulac C, Barbin K, Torres-Leguizamon M, Silvain JF (2008) Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions* **10**, 319-333.
- Qureshi AH, Oatman ER, Fleschner CA (1969) Biology of the Spider Mite, *Tetranychus evansi*. *Annals of the Entomological Society of America* **62**, 898-903.
- Rabitsch W (2010) Pathways and vectors of alien arthropods in Europe. *Biorisk* **4**, 27-43.
- Ramalho FS, Flechtmann CHW (1979) Levels of infestation by *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 in different phases of the growth of the tomato plant. *Revista de Agricultura, Brazil* **54**, 51-56.
- Reed DH, Frankham R (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* **55**, 1095-1103.
- Reid D, Orlova MI (2002) Geological and evolutionary underpinnings for the success of Ponto-Caspian species invasions in the Baltic Sea and North American Great Lakes. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* **59**, 1144-1158.
- Rejmánek M, Richardson DM, Barbour MG (2002) Biological Invasions: Politics and the Discontinuity of Ecological Terminology. *Bulletin of the Ecological Society of America* **83**, 131-133.
- Richard MS, Richard HAB, Chris PM, Sue H, Roger PH, Joe CO-S, Dominique WC (2007) Recent non-native invertebrate plant pest establishments in Great Britain: origins, pathways, and trends. *Agricultural and Forest Entomology* **9**, 307-326.

- Richards CL, Walls RL, Bailey JP, Parameswaran R, George T, Pigliucci M (2008) Plasticity in salt tolerance traits allows for invasion of novel habitat by Japanese knotweed *S. L. (Fallopia japonica and F-xbohemica, Polygonaceae)*. *American Journal of Botany* **95**: 931-942.
- Richardson DM, Pysek P, Rejmanek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity & Distributions* **6**, 93-107.
- Robinson R (2008) Human Activity, not Ecosystem Characters, Drives Potential Species Invasions. *PLoS Biology* **6**, e39.
- Roderick GK (2004) Tracing the origin of pests and natural enemies: genetic and statistical approaches. In: *Genetics, Evolution, and Biological control* (eds. Ehler LE, Sforza R, Mateille T), pp. 97-112. CAB International, Wallingford.
- Roderick GK, Navajas M (2003) Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews Genetics* **4**, 889-899.
- Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 411-417.
- Roman J (2006) Diluting the founder effect: cryptic invasions expand a marine invader's range. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 2453-2459.
- Roman J, Darling JA (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 454-464.
- Roques A (2010) Taxonomy, time and geographic patterns (2010) *Biorisk* **4**, 11-26.
- Roques A, Rabitsch W, Rasplus J-Y, *et al.* (2009) Alien Terrestrial Invertebrates of Europe. In: *The Handbook of Alien Species in Europe* (ed. DAISIE), pp. 63-79. Springer, Heidelberg.
- Rosa AA, Gondim Junior MGC, Fiaboe KKM, De Moraes GJ, Knapp M (2005) Predatory mites associated with *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) on native solanaceous plants of coastal Pernambuco State, Brazil. *Neotropical Entomology* **34**, 689-692.
- Rossi Simons NH (1961) Lista de las especies de Tetranychidae (Acari) de la Republica Argentina. *Idia* **163**, 9-13.
- Roy H, Wajnberg E (2008) From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. *BioControl* **53**, 1-4.
- Sabelis MW (1985) Reproductive strategies. In: *Spider mites, their biology, natural enemies and control* (eds. Helle W, Sabelis MW), pp. 265-278. Elsevier, Amsterdam.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN, Weller SG (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 305-332.
- Saunyama IGM, Knapp M (2003) Effects of pruning and trellising of tomatoes on red spider mite incidence and crop yield in Zimbabwe. *African Crop Science Journal* **11**, 269-277.
- Sax DF, Brown JH (2000) The paradox of invasion. *Global Ecology and Biogeography* **9**, 363-371.
- Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, Bruno JF, Dawson MN, Gaines SD, Grosberg RK, Hastings A, Holt RD, Mayfield MM, O'Connor MI, Rice WR (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 465-471.
- Scheffer SJ, Grissell EE (2003) Tracing the geographical origin of *Megastigmus transvaalensis* (Hymenoptera: Torymidae): an African wasp feeding on a South American plant in North America. *Molecular Ecology* **12**, 415-421.

- Schuster MF (1959) Chemical Control of *Tetranychus marianae* McG. on Tomatoes in the Lower Rio Grande Valley. *Journal of Economic Entomology* **52**, 763-764.
- Seif AA, Varela AM, Nyambo B (2003) Tomatoes pest and diseases in Somalia and their control Edited by A. J. Harberd. Integrated Pest Management Project in Somalia. UNA IPM Project.
- Semmens BX, Buhle ER, Salomon AK, Pattengill-Semmens CV (2004) A hotspot of non-native marine fishes: evidence for the aquarium trade as an invasion pathway. *Marine Ecology Program Series* **266**, 239–244.
- Shirley SM, Kark S (2006) Amassing Efforts against Alien Invasive Species in Europe. *PLoS Biology* **4**, e279.
- Sibanda T, Dobson HM, Cooper JF, Manyangarirwa W, Chiimba W (2000) Pest management challenges for smallholder vegetable farmers in Zimbabwe. *Crop Protection* **19**, 807-815.
- Silva P (1954) Um novo acaro nocivo ao tomateiro na Bahia. *Boletim do Instituto Biologica da Bahia* **1**, 1-20.
- Simberloff D (1996) Impacts of introduced species in the United States. *Consequences: Nature Implication of Environmental Change* **2**, 13.
- Simberloff D (2009) The Role of Propagule Pressure in Biological Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**, 81-102.
- Smith RM, Baker RHA, Malumphy CP, Hockland S, Hammon RP, Ostojá-Starzewski JC, Collins DW (2007) Recent non-native invertebrate plant pest establishments in Great Britain: origins, pathways, and trends. *Agricultural and Forest Entomology* **9**, 307-326.
- Sol D, Lefebvre L (2000) Behavioural flexibility predicts invasion success in birds introduced to New Zealand. *Oikos* **90**, 599-605.
- Sol D, Timmermans S, Lefebvre L (2002) Behavioural flexibility and invasion success in birds. *Animal Behaviour* **63**, 495-502.
- Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D, Le Conte Y, Anderson D, Evans J, Cros-Arteil S, Navajas M (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee *Apis mellifera*, are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**, 411-419.
- Suarez AV, Tsutsui ND (2008) The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology* **17**, 351-360.
- Suehs CM, Affre L, Medail F (2004) Invasion dynamics of two alien *Carpobrotus* (Aizoaceae) taxa on a Mediterranean island: I. Genetic diversity and introgression. *Heredity* **92**, 31-40.
- Takafuji A, Ishii T (1989) Inheritance of sex ratio in the kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida. *Researches on Population Ecology* **31**, 123-128.
- Tatem AJ (2009) The worldwide airline network and the dispersal of exotic species: 2007-2010. *Ecography* **32**, 94-102.
- Tatem AJ, Hay SI (2007) Climatic similarity and biological exchange in the worldwide airline transportation network. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**, 1489-1496.
- Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI (2006) Global transport networks and infectious disease spread. *Advances Parasitology* **62**, 293-343.
- Taylor CM, Hastings A (2005) Allee effects in biological invasions. *Ecology Letters* **8**, 895-908.
- Torchin ME, Lafferty KD, Dobson AP, McKenzie VJ, Kuris AM (2003) Introduced species and their missing parasites. *Nature* **421**, 628-630.

- Torchin ME, Mitchell CE (2004) Parasites, pathogens, and invasions by plants and animals. *Frontiers in Ecology and the Environment* **2**, 183-190.
- Tsagkarakou A, Cros-Arteil S, Navajas M (2007) First record of the invasive mite *Tetranychus evansi* in Greece. *Phytoparasitica* **35**, 519-522.
- Tsagkarakou A, Navajas M, Lagnel J, Pasteur N (1997) Population structure in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Crete based on multiple allozymes. *Heredity* **78**, 84-92.
- Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 5948-5953.
- Valéry L, Fritz H, Lefeuvre J-C, Simberloff D (2008) In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. *Biological Invasions* **10**, 1345-1351.
- Valiente A, Juanes F, Nuñez P, Garcia-Vazquez E (2010) Brown trout (*Salmo trutta*) invasiveness: plasticity in life-history is more important than genetic variability. *Biological Invasions* **12**, 451-462.
- Vilà M, Corbin JD, Dukes JS, Joan P, Smith SD (2006) Linking Plant Invasions to Global Environmental Change. In: *Terrestrial ecosystems in a changing world* (eds. Canadell J, Pataki D, Pitelka L), pp. 93-102. Springer, New York.
- Villablanca FX, Roderick GK, Palumbi SR (1998) Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Molecular Ecology* **7**, 547-560.
- Voisin M, Engel CR, Viard F (2005) Differential shuffling of native genetic diversity across introduced regions in a brown alga: aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5432-5437.
- Weber E, Li B (2008) Plant invasions in China: What is to be expected in the wake of economic development? *Bioscience* **58**, 437-444.
- Wekesa VW, Knapp M, Maniania NK, Boga HI (2006) Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. *Journal of Applied Entomology* **130**, 155-159.
- Wekesa VW, Moraes GJ, Knapp M, Delalibera Junior I (2007) Interactions of two natural enemies of *Tetranychus evansi*, the fungal pathogen *Neozygites floricola* (Zygomycetes: Entomophthorales) and the predatory mite, *Phytoseiulus longipes* (Acari: Phytoseiidae). *Biological Control* **41**, 408-414.
- Wekesa VW, Maniania NK, Knapp M, Boga HI (2005) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology* **36**, 41-50.
- Wene GP (1956) *Tetranychus marianae* McG., A New Pest of Tomatoes. *Journal of Economic Entomology* **49**, 712-713.
- Westphal M, Browne M, MacKinnon K, Noble I (2008) The link between international trade and the global distribution of invasive alien species. *Biological Invasions* **10**, 391-398.
- Whitney KD, Gabler CA (2008) Rapid evolution in introduced species, 'invasive traits' and recipient communities: challenges for predicting invasive potential. *Diversity & Distributions* **14**, 569-580.
- Whittier JM, Limpus D (1996) Reproductive patterns of a biologically invasive species: the brown tree snake (*Boiga irregularis*) in eastern Australia. *Journal of Zoology* **238**, 591-597.
- Williamson M (1996) Biological invasions. Chapman & Hall London.
- Williamson M, Fitter A (1996) The Varying Success of Invaders. *Ecology* **77**, 1661-1666.

- Winkler G, Dodson JJ, Lee CE (2008) Heterogeneity within the native range: population genetic analyses of sympatric invasive and noninvasive clades of the freshwater invading copepod *Eurytemora affinis*. *Molecular Ecology* **17**, 415-430.
- Wolfenbarger DA, Getzin LW (1964) Insecticides and surfactant-insecticide combinations for control of the mite *Tetranychus marianae* McG., on tomatoes and eggplant. *Florida Entomologist* **42**, 123-128.
- Wrensch DL (1993) Evolutionary flexibility through haploid males or how chance favors the prepared genome. In: *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites* (eds. Wrensch DL, Ebbert MA), pp. 118-149. Chapman & Hall, New York.
- Yeh PJ (2004) Rapid evolution of a sexually selected trait following population establishment in a novel habitat. *Evolution* **58**, 166-174.
- Zhang ZQ (2003) Mites of greenhouses: Identification, Biology and Control CABI, London.
- Zhang Y-Y, Zhang D-Y, Barrett SCH (2010) Genetic uniformity characterizes the invasive spread of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), a clonal aquatic plant. *Molecular Ecology* **19**, 1774-1786.
- Zayed A, Constantin AA, Packer L (2007) Successful Biological Invasion despite a Severe Genetic Load. *PLoS ONE* **2**, e868.

Annexes

Annexe I. Article V

Genetic diversity of the invasive tomato spider mite *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae) in the Mediterranean basin, assessed by sequences of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS).

Angham Boubou¹, Alain Migeon¹, Kaouthar Lebdi-Grissa² and Maria Navajas¹.

¹ INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro), Campus international de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France; email: navajas@supagro.inra.fr; ² INAT, 43, Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis-Mahrajène, Tunisie.

Abstract : The tomato red spider mite *Tetranychus evansi* was first discovered in 1952 in north-east Brazil (Silva, 1954), where the species probably originated. The mite is now present in many parts of the world and it is considered as an invasive species in Africa and in the Mediterranean basin. It is an important pest of solanaceous crops. In this study, we present the current distribution map of *T. evansi* in the Mediterranean basin based on both bibliographical records and samples obtained in this work. The genetic variation of the nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) region (1137 nucleotides) was estimated based in sequences obtained from mites collected in different localities from several countries around the Mediterranean perimeter including, Algeria, Greece, France, Israel, Italy, Spain and Tunisia. Two types of ITS sequences were obtained which clearly separate the samples in two main groups. One gathers all individuals from the French and Spanish Catalonia. All the rest of the Mediterranean *T. evansi* samples gather in a second group. Our results show that this mite is well established in the Mediterranean basin being a serious threat to both outdoor and protected cultivation of solanaceous crops in this region. The obtained molecular data suggest that there were two ways of introduction and dissemination of this mite around the Mediterranean basin.

Key words: *Tetranychus evansi*, invasive species, Internal Transcribed Spacer (ITS), Mediterranean basin, tomato.

Introduction

The tomato red spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) was first discovered in 1952 in north-east Brazil (Silva, 1954), where the species probably originated. Later, it was reported in the Mauritius Island (Baker, Pritchard, 1960) and in different localities of south USA (Oatman *et al.*, 1967a). Since then, this mite has reached other parts of the world: several Indian Ocean Islands, many countries in Africa, several parts of Europe and Hawaii and Taiwan in the Pacific area (see Migeon and Dorkeled, 2006 for a detailed coverage of the *T. evansi* distribution). In the Mediterranean basin, the mite has been reported in Morocco (El-Jaouani, 1988), Tunisia (Kreiter *et al.*, 2002; Navajas *et al.*, 1994) and in south Europe including Portugal (Ferreira, Carmona, 1995; Navajas *et al.*, 1994), Spain (Aucejo *et al.*, 2003; Ferragut, Escudero, 1999) and France (Migeon, 2005a). More recently, it was reported in Italy (Castagnoli *et al.*, 2006), in the Crete Island (Tsagkarakou *et al.*, 2007b) and in Israel (Ben-David *et al.*, 2007) (Fig.1).

Tetranychus evansi attacks mainly plants of the Solanaceae family, including weeds, vegetables and ornamental crops (Navajas *et al.*, 1994) and it is considered as a key pest of tomato in several African countries where it is resistant to several pesticides (Duverney *et al.*, 2005; Saunyama, Knapp, 2003; Sibanda *et al.*, 2000). Because the Solanaceae there are important crops in the EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) region, both outdoors and in protected cultivation, and the mite has a strong invasive ability, the species has recently been added to the EPPO alert list. It has also been reported to cause considerable damages to horticultural crops in the Spanish Mediterranean coast (Escudero, Ferragut, 2005a). The use of predatory mites usually being efficient to control other species of the genus *Tetranychus*, has been unsuccessful to control the tomato mite (Escudero, Ferragut, 2005b).

It is becoming increasingly evident that the establishment of effective control strategies requires a detailed knowledge of the biology, genetic structure and geographical variability, of a given species (Roderick, Navajas, 2003). The objective of this study is to map the distribution of *T. evansi* in the Spanish Mediterranean coast and more broadly investigate the genetic diversity of mites collected from different localities in several countries of the Mediterranean basin including, Algeria, Crete Is, France, Israel, Italy, Spain and Tunisia.

Material and methods

Samples collection

A total of 56 samples of *T. evansi* analysed in this study were obtained in part by our collaborators (in Algeria, Greece and Israel) or by our surveys along the European Mediterranean coast (France, Italy, and Spain) and Tunisia (Fig.1; further details on the sampling localities are available from the authors upon request). Samples were collected from Solanaceous plants (tomato and black nightshade). Mites from each origin were kept in absolute ethanol at -20 °C until DNA analysis. A few individuals of each sample were preserved in 70% ethanol for further morphological identification.

Sequencing and sequence alignment

Total DNA was extracted from individual adult females using the DNeasy tissue Kit (Qiagen, USA), following the protocol described in (Tsagkarakou *et al.*, 2007a). DNA was suspended in 50 µl of ultra pure water. The Internal Transcribed Spacer region (ITS: ITS1-5.8sRNA-ITS2) of the nuclear ribosomal genes was PCR-amplified and sequenced. PCR conditions were as described in detail by (Tsagkarakou *et al.*, 2007a). PCR amplifications were carried out in an Eppendorf Mastercycler. Primers used to amplify and sequence the ITS (1137 bp) and the annealing temperatures used for the PCR, are described in (Gotoh *et al.*, 2009). PCR products were purified using ultra filtration membranes and were subsequently commercially sequenced either by (Cogenics, Meylan, France) or by (Macrogen, Seoul, Korea). The Seqscape package (SeqScape Software v2.5, Applied Biosystems SeqScape® Software) was used to edit sequences and CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) for sequence alignments. 1 to 5 mite specimens per locality were analyzed.

Results and discussion

Known distribution of T. evansi in the Mediterranean basin

Our surveys of *T. evansi* in the European Mediterranean coast (France and Spain) and in Tunisia showed that this mite is well established in this region (both in open fields and greenhouses). Outbreaks have been observed in plastic greenhouses on tomatoes in France, near Nice (October 2007) (Fig 1, photo 1). By modeling the potential distribution of *T. evansi*,

Migeon *et al.* (2009) demonstrated that the whole Mediterranean region will be unavoidably colonized by this mite but its establishment will be limited to coastal areas.

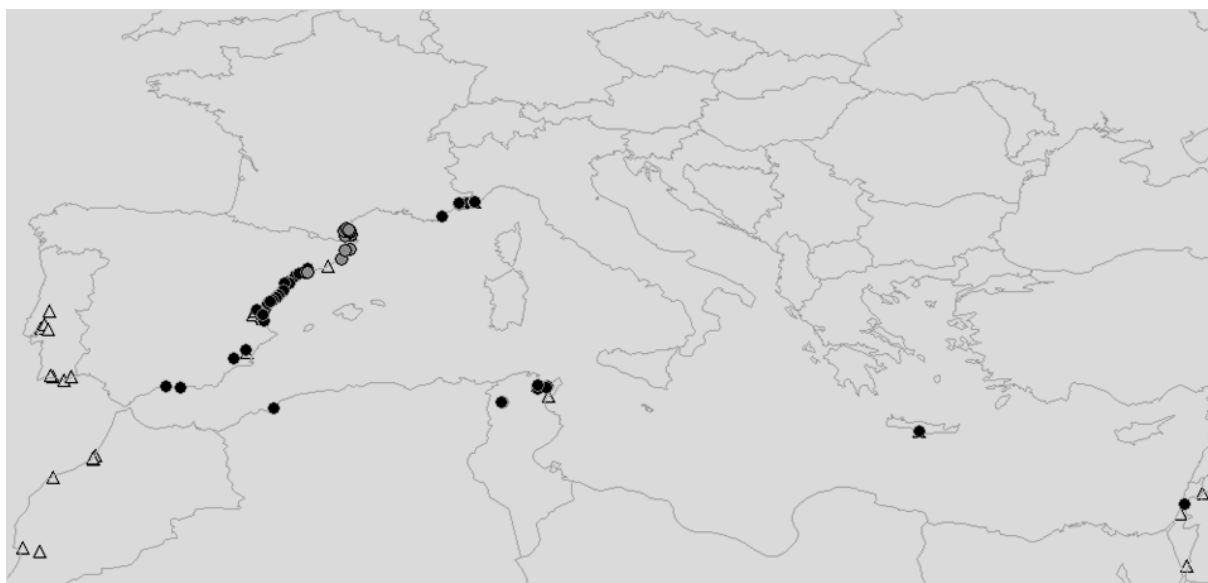


Figure1. Distribution of *Tetranychus evansi* in the Mediterranean area according to both bibliographical (triangle) and observation records (circle) from this study. Each colour circle (grey and black) corresponds to two different ITS sequences.



Photo 1. Outbreaks caused by *Tetranychus evansi* on protected culture of tomatoes near Nice - France, October 2007.

Molecular study

The complete ribosomal ITS sequences (1137 bp) were sequenced for mite samples indicated in Fig 1. When possible intra-population variation was examined and no differences were observed among individuals from each population. Two types of ITS sequences were obtained which differ each other by 0.18% of nucleotide divergence (2 point mutations) and separate the samples in two main groups. A first group (Fig 1, grey circles) gathers only mites collected from the Spanish and French Catalonia. The second group (Fig 1, black circles) contains the rest of the Mediterranean *T. evansi* samples.

The presence of two distinct haplotypes suggests that two ways of introduction have occurred in the Mediterranean region. It seems likely that repeated introductions and/or migration of mites occurred in this region facilitated by human activities as trade and tourism.

In addition, although *T. evansi* has presumably a tropical origin; general global warming and the strong invasive potential of this pest increase the risk of extension into other parts of Europe and the world. A similar case of invasion as *T. evansi*, is the tropical whitefly *Bemisia tabaci* which has emerged in the last decade as a worldwide agricultural pest and two biotypes (Q and B) have invaded the Mediterranean region.

To further understand the invasion process of *T. evansi* and to assess its potential expansion which threatens important crops for the Mediterranean agriculture, our team conducts additional studies on the genetic diversity of the species worldwide and using several genetic markers (mitochondrial sequences and microsatellites loci in addition to the ITS are studied). Life-history traits of the two types of mites here detected are also studied which should added light to the understanding of the *T. evansi* invasive process.

Acknowledgements

We thank all the colleagues having contributed to the mite sampling: T. Ben-David (The Hebrew University of Jerusalem, Israel), M. Castagnoli (CRA, Firenze, Italy), F. Ferragut (Universidad Polit cnica, Valencia, Spain), Y. Guenaoui (Mostaganem, Algeria), J. Jacas (Universidad de Castellon, Spain), S. Kreiter (SupAgro, Montpellier, France), P. Martini (IRF, Sanremo, Italy), S. Rapetti (IRF, Sanremo, Italy), S. Simoni (CRA, Firenze, Italy) and A. Tsagkarakou (Heraklion, Greece).

References

- Aucejo, S., Foo, M., *et al.* 2003: Management of *Tetranychus urticae* in citrus in Spain: acarofauna associated to weeds. Bull Oilb/Srop. 26: 213-220.
- Baker, E. W. & Pritchard, A. E. 1960: The Tetranychoid mites of Africa. Hilgardia. 29: 455-574.
- Ben-David, T., Melamed, S., *et al.* 2007: ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). Exp. Appl. Acarol. 41: 169-181.
- Bolland, H. R., Gutierrez, J., *et al.*, 1998. World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Leiden, Brill Academic publisher.
- Bolland, H. R. & Vala, F. 2000: First record of the spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) from Portugal. 60: 180.
- Castagnoli, M., Nannelli, R., *et al.* 2006: Un nuovo temibile fitofago per la fauna Italiana: *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae). Informatore Fitopatologico. 5: 50-52.
- Duverney, C., Kade, N., *et al.*, 2005: Essais préliminaires pour limiter les dégâts de Tetranychidae sur les cultures maraîchères dans le Sine-Saloum (Sénégal). In: Comptes rendus du deuxième colloque international sur les acariens des cultures de l'AFPP. Montpellier, France., Annales AFPP.
- El-Jaouani, N. 1988: Contribution à la connaissance des acariens phytophages au Maroc et étude bio-écologique de *Tetranychus evansi* Baker et Pritchard (Acarina : Tetranychidae).
- 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). Biol. Control. 32: 378-384.
- Ferragut, F. & Escudero, L. A. 1999: *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari, Tetranychidae), una nueva ar na roja en los cultivos hortícolas espan les. Boletín de Sanidad Vegetal. 25: 157-164.

- Ferreira, M. A. & Carmona, M. M. 1995: Acarofauna do tomateiro em Portugal. *Avances en entomologia Ibérica*. 385-392.
- Gotoh, T., Araki, R., *et al.* 2009: Evidence of co-specificity between *Tetranychus evansi* and *T. takafujii* (Acari, Prostigmata, Tetranychidae) suggested by molecular, morphological and compatibility data: comments on taxonomical and agricultural consequences. *Int. J. Acarol.* *Submitted*.
- Kreiter, S., Auger, P., *et al.* 2002: Plant inhabiting mites (Acari: Prostigmata & Mesostigmata) of some Northern Tunisian crops. *Acarol.* 42: 389-402.
- Migeon, A. 2005: Un nouvel acarien ravageur en France : *Tetranychus evansi* Baker et Pritchard : Cet envahisseur sans doute originaire d'Amérique du Sud s'attaque principalement aux Solanacées. *Phytoma*. 579: 38-43.
- Migeon, A. & Dorkel, F. 2006: Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>
- Migeon, A., Ferragut, F., *et al.* 2009: Modelling the potential distribution of the invasive tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* *In press*.
- Oatman, E. R., Fleschner, C. A., *et al.* 1967: New, highly destructive spider mite present in Southern California. *J. Econ. Entomol.* 60: 477-480.
- Roderick, G. K. & Navajas, M. 2003: Genes in new environments: Genetics and evolution in biological control. *Nat. Rev. Genet.* 4: 889-899.
- Saunyan, I. G. M. & Knapp, M. 2003: Effects of pruning and trellising of tomatoes on red spider mite incidence and crop yield in Zimbabwe. *Afr. Crop. Sci. J.* 11: 269-277.
- Sibanda, T., Dobson, H. M., *et al.* 2000: Pest management challenges for smallholder vegetable farmers in Zimbabwe. *Crop Protection*. 19: 807-815.
- Silva, P. 1954: Um novo àcaro nocivo ao tomateiro na Bahia. *Boletim do Instituto Biologica da Bahia* 1: 1-20.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., *et al.* 1994: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 4673-4680.
- Tsagkarakou, A., Cros-Arteil, S., *et al.* 2007: First record of the invasive mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) Baker and Pritchard in Greece. *Phytoparasitica*. 35: 519-522.
- Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5948-5953.

Annexe II. Résumés des communications à des congrès : C1, C2, C3, C4, C5 et C6

- **C1**

XIIth International Congress of Acarology, 21-26 August 2006, Amsterdam, The Netherlands.

Genetic markers to trace the dissemination of *Tetranychus evansi*, a new invasive spider mite in Europe

Boubou A., Cros-Arteil S., Navajas M.

Abstract

The analysis of molecular diversity has become a valuable approach to study the population biology of invasive species. Particularly, mitochondrial (mt) DNA haplotypes and nuclear ribosomal genes are interesting markers which have been used extensively to study population structure and phylogeography and have proved to be informative to ascertain the recent history of species.

Tetranychus evansi was first discovered in north-east Brazil by P. Silva (1954) and is now an invasive pest in southern and eastern Africa and more recently in south-western Europe (Ferragut & Escudero, 1999; Migeon, 2005). Although *T. evansi* has presumably a tropical origin, general global warming might increase the risk of extension of this pest in Europe. This invasion potential of new areas prompts us to develop genetic markers for this species.

We have used a fragment of the mt *Cytochrome oxidase I* (COI) gene (950 nucleotides) and the ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) region (ca. 1200 nucleotides) together with microsatellite loci to analyse patterns of genetic variation of mites collected mainly in France. The presented first data give new insights on the biogeographical history of this invasive mite.

Genetic markers to trace the dissemination of *Tetranychus evansi*, a new invasive spider mite in Europe.

Angham BOUBOU, Sandrine Cros-Arteil and Maria Navajas

Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP)
Campus International de Baillarguet, CS30016, 34988 MONTFERRIER-sur-LEZ, France - navajas@ensam.inra.fr

The analysis of molecular diversity has become a valuable approach to study the population biology of invasive species. Two of the most commonly applied markers in studies of population structure and phylogeography are mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes and nuclear ribosomal genes (rDNA). They differ in their genomic organization and mode of evolution and have proved to be informative to ascertain the recent evolutionary history of species. We use here this approach to investigate the geographical origin and the dissemination of *Tetranychus evansi*, a new invasive spider mite in Europe. Samples of 19 populations from Europe, Africa and South America (Brazil) were analyzed

Why to work on *Tetranychus evansi*?

Tetranychus evansi was first discovered in north-east Brazil by Silva (1954). This species is now an invasive pest in southern and eastern Africa and more recently in south-western Europe (Ferragut & Escudero, 1999; Migeon, 2005). Although this species has probably a tropical origin, general global warming might increase the risk of extension of this pest in Europe (Fig. 1). The invasive potential of new areas prompts us to develop genetic markers to study this mite.

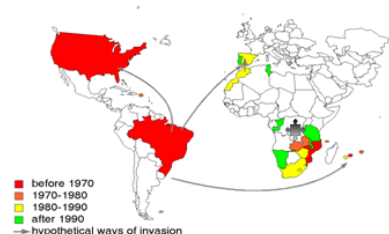


Figure (1). Biogeography of the *Tetranychus evansi*. The potential routes of colonisations are indicated by arrows

A molecular phylogeography approach

The Internal Transcribed Spacer (ITS) of the rDNA (ca. 1200 nucleotides) and a fragment of the mtDNA gene coding for the Cytochrome Oxidase I gene (COI) (ca. 950 nucleotides), were PCR-amplified. Two primer combinations (18S/28S for ITS and C1J1718/COI REVA for COI) were used to amplify and then sequence 19 samples of various geographical regions (Table 1).

Table 1. Collection sites of mites. The mitochondrial haplotypes and COI and ITS variable sites are indicated. Colors correspond to the map in Figure 2.

Sample	Abbreviation	Country	Location	Host plant	Collector	Variable sites of COI	Variable sites of ITS
SP1a		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1b		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1c		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1d		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1e		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1f		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1g		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1h		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1i		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1j		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1k		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1l		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1m		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1n		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1o		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1p		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1q		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1r		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1s		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1t		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1u		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1v		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1w		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1x		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1y		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1
SP1z		Spain	Madrid	on leaves of grape	A. J. Ferragut (1999)	1	1

Main results:

- ✓ Two types of ITS sequences (0.178% of nucleotide diversity in average) clearly split the samples in two main groups (see table 1 and figure 2): A first group (**East Pyrenees**) includes all French and Northern Spain samples. Interestingly, the two Brazilian samples have the same sequences (table 1). The second group contains samples from the **African region**: Canaries Islands (Tenerife), Madeira Island, Reunion Island, South Africa and Kenya, together with the sample from Spain (Valencia).
- ✓ Consistently, mitochondrial sequences groups in one side samples from the **East Pyrenees** and in the other samples from the **African region** (differing by 2.8% of nucleotide diversity). However, the Brazilian samples although close to the East Pyrenees, differ by 1 (Recife) and 4 (Sao Paulo) positions. The samples from Spain (Valencia) is close to the African group but it shows a new haplotype. Phylogenetic relationships between samples are depicted in Figure 3.

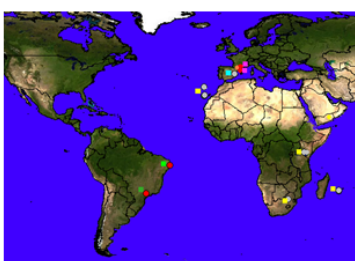


Figure 2. Geographical distribution of mitochondrial haplotypes (squares) and rDNA sequence (circles) variation of *Tetranychus evansi* samples. Each color represents a different haplotype. See Table 1 for sampled localities.

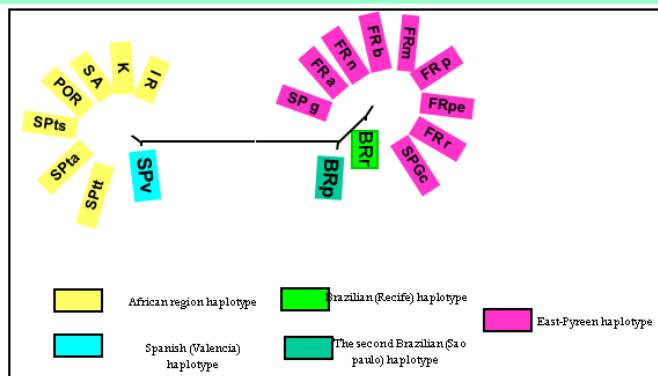


Figure 3. Phylogenetic relationships of *T. evansi* samples, inferred by the NeighborJoining method and based on mitochondrial COI sequences

Some insights on the invasion pathway

First result suggest:

- Two invasion routes in Europe: Mites from Valencia have African ITS sequences whereas mites from Girona the Brazilian type.
- The colonization of Southern France from Spanish mites;
- A single source of mites having colonized the African region;
- The hypothesized South American origin of the species cannot be confirmed.

Ongoing work:

To fully prove a South American origin of the species, additional samples from this continent need to be studied. Similarly, to precise pathways of the invasion in Africa and Europe, specially the Mediterranean basin. This extensive sampling of *T. evansi*, as well as the isolation of new genetic markers are two of the main objectives of the ongoing work in our laboratory. A genomic library of *T. evansi* has been constructed to screen for microsatellites. Ten microsatellites loci are selected to search for genetic variation at a fine population scale.

Our approach should help to unfold the fascinating history of the invasion process of this species and to establish pest control and quarantine strategies.

References

- Ferragut F. & Escudero L.A. (1999). Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas, 25(2): 157-164.
- Migeon A. (2003). Phytoma - La Défense des Végétaux, 561: 30-31.
- Silva P. (1954). Boletim do Instituto Biológico da Bahia, 1(1): 1-20.

- C2

4th African Acarology Symposium, 22-26th October 2007, Hammamet, Tunisia.

Invasive species: a genetic approach to understand movements and evaluate the risk of expansion of pests

Navajas M., **Boubou** A., Migeon A.

Abstract

The analysis of DNA has become a valuable approach in studies of arthropods. It is nowadays acknowledged that developing high-throughput, repeatable and easy-to-use molecular markers, is critical to accommodate the growing need for surveying and monitoring pests, e.g. detecting emerging pests, monitoring and managing agriculture pests. Some of the fields of application of DNA data are described with emphasis in a new emerging pest in Africa and European countries.

Molecular diversity to study population biology of invasive species

An increasing number of pest species is being transported to new biogeographic regions each year and the knowledge of the patterns of geographic variation of the species can be useful in tracing accidental pest introductions. Population genetic tools have the potential to answer key questions in pest management including quantifying the number of genetically distinct populations represented in an invasion, the number of individuals present, whether populations are expanding or contracting, identifying the origin of invasive individuals, and the number of introduction events that have occurred. Genetic methods have only recently gained sufficient resolution to address these questions due to advances in laboratory techniques coupled with an increase in computational power. In combination, these methods may lead to a more comprehensive understanding of the dynamics of invasions. The expansion of the tomato mite, *Tetranychus evansi*, is used as an applied example. This mite probably originated from South America and has recently developed into an important pest of Solanaceae in many countries in Africa, Europe and East Asia. The colonization potential of this invasive species is here assessed based in mitochondrial cytochrome oxidase I (*COI*) and nuclear Internal Transcribed Spacers (ITS) sequences.

- C3

Invasions biologiques et traits d'histoire de vie, 2^{ème} rencontres francophones, 14 -16 novembre 2007, Rennes, France.

Approche évolutive pour l'étude des invasions biologiques : Biogéographie et écologie de l'acarien rouge de la tomate *Tetranychus evansi*

Boubou A., Navajas M.

Résumé

L'analyse de la diversité moléculaire est devenue une approche souvent utilisée pour l'étude des espèces invasives. Particulièrement, l'ADN mitochondriale (ADNmt) et les gènes de l'ADN ribosomique nucléaire (ADNr) ont été souvent utilisés pour les études de phylogéographie, permettant dans certains cas d'établir l'histoire récente des espèces.

L'acarien rouge de la tomate *Tetranychus evansi* a été signalé pour la première fois en 1954 au nord-est du Brésil (Silva, 1954), d'où il est probablement originaire. Cet acarien constitue actuellement une espèce envahissante en Afrique australe et orientale et plus récemment dans le bassin Méditerranéen (Ferragut, Escudero, 1999; Knapp *et al.*, 2003b; Migeon, 2005a). Notre travail sur *T. evansi* a pour but de i) retracer les voies de colonisation de nouvelles zones géographiques et ii) comprendre les bases du fort potentiel invasif de l'espèce qui lui a permis de coloniser de nouveaux habitats.

Pour aborder le premier but, nous avons utilisé un fragment du gène codant pour la Cytochrome Oxydase sous-unité I (*COI*) de l'ADNmt (950 pb) et la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr (1250 pb) afin d'analyser un vaste échantillonnage des aires récemment colonisées par l'acarien. Les premiers résultats suggèrent qu'une seule source d'introduction a envahi l'Afrique (un seul haplotype rencontré). En revanche, il apparaît plusieurs sources d'introduction dans le bassin Méditerranéen (4 haplotypes détectés).

Le deuxième but sera réalisé par l'étude de certains traits d'histoire de vie des acariens introduits et d'origine dans le but de faire la part entre un éventuel élargissement de la niche écologique (spectre de plantes-hôtes) et une agressivité accrue dans les nouvelles régions envahies. La plasticité et potentiel de sélection de ces traits nous aideront à comprendre son adaptation rapide aux nouveaux environnements et son succès d'invasion.

- **C4**

6th Symposium of European Association of Acarologists, 21-25 July 2008, Montpellier, France.

Movement of pests: What a phylogeographical study tell us about the colonisation of new continents by the invasive tomato spider mite *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard?

Boubou A., Navajas M.

Abstract

The spider mite *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard was first discovered in north-east Brazil, where the species probably originated. In the last two decades, the mite has become an invasive pest in Africa and more recently in southern Europe. It has also been recorded from some parts in Asia. We are interested in confirming the geographical origin of *T. evansi* and investigate the colonization routes followed by the mite in the invasion of new continents. We have used a fragment of the mitochondrial *Cytochrome oxidase I (COI)* gene (950 nucleotides) and the nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) region (ca. 1200 nucleotides) to study genetic variation of mites collected from different localities in several countries in Asia, Africa, Europe and South America. A phylogeographical analysis of these two types of DNA sequences clearly and consistently separates the samples in two main groups. One gathers all individuals from Africa, Asia, from the Mediterranean basin (except mites from the French and Spanish Catalonia), and the samples from Argentina and southern Brazil. Interestingly, all samples collected in Catalonia clustered in a second group together with the east-northern Brazilian samples.

Based on these results several insights in the historical colonisation of *T. evansi* can be putted forward: 1) The higher variability found in South America (5 haplotypes out of the total 8 founded are scattered in the two main clades of the tree) tends to confirm an origin of the mite in this continent; 2) Although no clear geographical routes of colonisation appear from the results, at least, two ways of dissemination of the pest seem to exist (East Africa and the Mediterranean basin); 3) All the four haplotypes encountered out of South America are present in mites from West Mediterranean countries (Spain and France) suggesting repeated

introductions and/or migration of mites in this region. We discuss the results on the movement of the mite pest which shed light on the management of bio-invasions.

- **C5**

IOBC/WPRS Working Group “Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate”. Preceedings of the meeting at Chania, 6-11 September, Crete, Greece 2009.

Genetic diversity of the ribosomal internal transcribed spacers regions in the invasive tomato spider mite *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae) in the Mediterranean basin

Boubou A., Migeon A., Lebdi-Grissa K., Navajas M.

Abstract

The tomato red spider mite *Tetranychus evansi* was first discovered in 1952 in north-east Brazil (Silva, 1954), where the species probably originated. The mite is now present in many parts of the world and it is considered as an invasive species in Africa and in the Mediterranean basin. It is an important pest of solanaceous crops. In this study, we present the current distribution map of *T. evansi* in the Mediterranean basin based on both bibliographical records and samples obtained in this work. The genetic variation of the nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) region (1137 nucleotides) was estimated based in sequences obtained from mites collected in different localities form several countries around the Mediterranean perimeter including, Algeria, Greece, France, Israel, Italy, Spain and Tunisia. Two types of ITS sequences were obtained which clearly separate the samples in two main groups. One gathers all individuals from the French and Spanish Catalonia. All the rest of the Mediterranean *T. evansi* samples gather in a second group. Our results show that this mite is well established in the Mediterranean basin being a serious threat to both outdoor and protected cultivation of solanaceous crops in this region. The obtained molecular data suggest that there were two ways of introduction and dissemination of this mite around the Mediterranean basin.

- **C6**

XIIIth International Congress of Acarology, 23-27 August 2010, Recife, Brazil.

How much environmental conditions drive the invasive potential of *Tetranychus evansi*

Boubou A., Migeon A., Auger P., Navajas M.

Abstract

The pace of movement of species from their native ranges to new geographical areas is continuously increasing. When arriving to new habitats, alien species often become invasive with tremendous economic and environmental consequences, and in the last ten years, invasive species have motivated a growing number of studies to understand invasion processes. To this end, genetic markers and more recently computational approaches have proved to be valuable tools to determine colonization routes, source populations, number and size of introductions. However, while genetic approaches are useful in describing the invasion history, what makes a species or population to become invasive once a propagule arrives to a new geographical area, remains poorly understood. Recent research has revealed that adaptive evolution plays a crucial role in many invasions. We address these questions here by studying the tomato spider mite, *Tetranychus evansi*. The species originated from South America and has recently emerged as a new threat to solanaceous crops in Africa and in the Mediterranean basin. Using mitochondrial (COI) and nuclear (ITS) sequences generated from *T. evansi* samples spanning the current geographical distribution; we studied several stages of the invasive process. Genetic data demonstrated that invading populations are the result of multiple cryptic introductions with two main mite lineages have arrived in Europe. According to the geographical distribution of the invading genotypes, a differential invasive potential seem to exist for two detected mite lineages. The invasions are characterized by a high reproductive output and an ability to withstand a wide range of temperatures. When a CLIMEX model distribution was developed using both South American records and laboratory life-history parameters to predict the global expansion of the species, the distribution appears to be limited by cold stress in a large part of North America and Europe. As recent research has revealed that adaptive evolution plays a crucial role in many invasions, we address these questions here by examining biological traits that appeared as crucial for the success of the invasion of *T. evansi* in temperate climates, considering that the species is not able to diapause and its ability to exploit plants in a new environment. We experimentally

compare life-history parameters of mites collected from both the introduced areas and from the area of origin in South America and submitted to different environmental conditions (temperature and host plant). We show that the invasion success of *T. evansi* may result from the occurrence of a particularly successful invasive population which might have served as the source of colonists for remote areas. Dissecting biological traits favoring the invasion potential, not only helps to understand the invasion process itself, but in the case of an agricultural pest, as *T. evansi*, it ultimately should help to build up management strategies.

Annexe III. Caractérisation de 16 loci microsatellites isolés chez *Tetranychus evansi*

Annexe III Caractérisation de 16 loci microsatellites isolés chez *Tetranychus evansi*. Nombre total d'allèles (N_a), indice de consanguinité (F_{IS}), hétérozygotie attendue (H_E) et observée (H_O) sont indiqués.

PCR multiplex set2	Population			BR-C		BR-G		BR-B		POR-L		POR-C		POR-B		FR-TO		FR-SM	
	Locus	Size range (bp)	N a	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}
	evaTC1-F5	118-126	3	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,340/0,192	0,439	0/0	-	0,409/0,333	0,188	0/0	-	0/0	-
	evaATCT1-H4	170-188	2	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,382/0,192	0,502	0,268/0,3	-0,125	0,425/0,296	0,307	0/0	-	0/0	-
	evaTC1-A12	211-239	9	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,557/0,385	0,314	0,209/0,222	-0,067	0,391/0,296	0,246	0/0	-	0/0	-
	evaTC1-H4	173-175	2	0,029/0,029	0	0/0	-	0/0	-	0,317/0,154	0,519	0/0	-	0,425/0,370	0,13	0/0	-	0/0	-
	eva TC5-E6	299-302	2	0,163/0,177	-0,082	0/0	-	0,228/0	1	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC2-G2	178-198	9	0/0	-	0/0	-	0,458/0,436	0,046	0,340/0,192	0,439	0,209/0,222	-0,067	0,498/0,444	0,11	0/0	-	0,151/0,097	0,362
	evaTC2-A8	279-287	5	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,301/0,2	0,341	0,1/0,1	0	0,391/0,296	0,246	0/0	-	0/0	-
	evaTG2-A7	283-285	2	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,327/0,24	0,269	0,189/0,2	-0,059	0,391/0,222	0,437	0/0	-	0/0	-
PCR multiplex set1	evaTC2-A2	167-180	7	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,340/0,192	0,439	0/0	-	0,352/0,296	0,161	0/0	-	0/0	-
	evaTC5-E3	300-316	5	0/0	-	0/0	-	0,506/0,313	0,386	0,362/0,231	0,367	0,189/0,2	-0,059	0,419/0,346	0,176	0/0	-	0/0	-
	evaTG1-D9	253-277	10	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,317/0,154	0,519	0,268/0,1	0,64	0,362/0,231	0,367	0/0	-	0/0	-
	evaTC3-D3	105-124	5	0/0	-	0/0	-	0,131/0	1	0,340/0,192	0,439	0,189/0,2	-0,059	0,425/0,370	0,13	0,037/0,037	0	0/0	-
	evaTC1-A8	229-246	7	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,340/0,192	0,439	0,189/0	1	0,425/0,296	0,307	0/0	-	0/0	-
	evaTC1-G11	299-334	7	0,219/0,223	1	0/0	-	0,432/0,226	0,481	0,304/0,182	0,408	0,209/0,222	-0,067	0,391/0,222	0,437	0/0	-	0/0	-
	evaTC5-D2	225-229	3	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,327/0,16	0,515	0/0	1	0,391/0,222	0,437	0/0	-	0/0	-
	evaATCT2-G11	121-146	4	0/0	-	0,051/0,053	0	0/0	-	0,340/0,192	0,439	0,189/0,2	-0,059	0,425/0,370	0,13	0/0	-	0/0	-
PCR multiplex set2	Population			BR-U		BR-A		BR-I		KenW		TZ		K-A5		K-A4			
	Locus	Size range (bp)	N a	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}		
	evaTC1-F5	118-126	3	0/0	-	0,275/0,250	0,091	0,363/0,393	-0,084	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaATCT1-H4	170-188	2	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC1-A12	211-239	9	0,507/0,412	0,191	0,430/0,179	0,59	0,508/0,464	0,088	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC1-H4	173-175	2	0,295/0,294	0,003	0,453/0,370	0,185	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	eva TC5-E6	299-302	2	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC2-G2	178-198	9	0,211/0,176	0,165	0/0	-	0,299/0,214	0,286	0,1/0,1	0	0,048/0,048	0	0,166/0,059	0,652	0,271/0,154	0,442		
	evaTC2-A8	279-287	5	0,086/0,088	-0,031	0,440/0,333	0,245	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-		
	evaTG2-A7	283-285	2	0,357/0,151	0,579	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-		
PCR multiplex set1	evaTC2-A2	167-180	7	0,507/0,441	0,132	-	-	0,287/0,333	-0,158	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC5-E3	300-316	5	0,255/0,176	0,31	0,177/0,192	-0,087	0,238/0,185	0,226	0,111/0,111	0	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTG1-D9	253-277	10	0,403/0,303	0,251	0,465/0,556	-0,2	0,385/0,296	0,234	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC3-D3	105-124	5	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC1-A8	229-246	7	0,492/0,471	0,043	0,467/0,5	-0,071	0,249/0,143	0,432	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC1-G11	299-334	7	0,500/0,353	0,298	0,299/0	1	0,107/0,037	0,658	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaTC5-D2	225-229	3	0/0	-	0/0	-	0,195/0,214	-0,102	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
	evaATCT2-G11	121-146	4	0/0	-	0,073/0,074	-0,02	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-		
PCR multiplex set2	Population			CRY		POR-SE		SP-V		SP-M		SP-Ag		SP-Am					
	Locus	Size range (bp)	N a	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}	H _E /H _O	F _{IS}				
	evaTC1-F5	118-126	3	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,417/0,062	0,854	0,348/0,348	0				
	evaATCT1-H4	170-188	2	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-				
	evaTC1-A12	211-239	9	0/0	-	0,083/0,083	0	0,325/0,375	-0,167	0,219/0,077	0,657	0,067/0,067	0	0,085/0,087	-0,023				
	evaTC1-H4	173-175	2	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-				
	eva TC5-E6	299-302	2	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-				
	evaTC2-G2	178-198	9	0,083/0,083	0	0,228/0,083	0,645	0,233/0,25	-0,077	0/0	-	0,314/0,250	0,211	0,294/0,174	0,413				
	evaTC2-A8	279-287	5	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,129/0,133	-0,037	0,130/0,136	-0,05				
	evaTG2-A7	283-285	2	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-				
PCR multiplex set1	evaTC2-A2	167-180	7	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,3701/0,2	0,468	0,414/0,130	0,69				
	evaTC5-E3	300-316	5	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,516/0,357	0,316	0,414/0,217	0,481				
	evaTG1-D9	253-277	10	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,198/0,071	0,649	0,414/0,130	0,69				
	evaTC3-D3	105-124	5	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-				
	evaTC1-A8	229-246	7	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0,162/0,174	-0,073				
	evaTC1-G11	299-334	7	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-				
	evaTC5-D2	225-229	3	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-				
	evaATCT2-G11	121-146	4	0/0	-	0,083/0,083	0	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-				

Annexe IV. Distribution des fréquences alléliques dans les échantillons analysés de *Tetranychus evansi* à l'aide des marqueurs microsatellites

Annexe IV. Distribution des fréquences alléliques dans les échantillons analysés de *Tetranychus evansi* à l'aide des marqueurs microsatellites. Pour l'abréviation des échantillons voir tableau 4.

Locus <i>evaTC1-F5</i>				
Population	Allèles			Nombre de gènes
	118	124	126	
BR-C	0	0	1	68
BR-G	0	0	1	40
BR-B	0	0	1	62
BR-SE	0	0	1	56
POR-L	0,212	0	0,788	52
POR-C	0	0	1	20
POR-B	0,278	0	0,722	54
BR-SE	0	0	1	22
FR-TO	0	0	1	54
FR-SM	0	0	1	62
BR-U	1	0	0	68
BR-A	0,161	0	0,839	56
BR-I	0	0,768	0,232	56
KenES	1	0	0	24
KenW	1	0	0	20
TZ	1	0	0	42
TZE	1	0	0	38
Ken-A3	1	0	0	40
Ken-A5	1	0	0	34
Ken-A4	1	0	0	32
CRY	1	0	0	24
POR-SE	1	0	0	24
SP-C2	1	0	0	8
SP-T	1	0	0	10
SP-C1	1	0	0	14
SP-Vv	1	0	0	36
SP-Va	1	0	0	12
SP-V	1	0	0	16
SP-M	1	0	0	30
FR-SJ	1	0	0	56
TU-L	0	0	1	28
TU-B	0	0	1	26
GR	0	0	1	32
SP-Ag	0,281	0	0,719	32
SP-Am	0,217	0	0,783	46

Locus <i>evaATCT1-H4</i>			
Population	Allèles		Nombre de gènes
	170	188	
BR-C	0	1	68
BR-G	0	1	40
BR-B	0	1	64
BR-SE	0	1	56
POR-L	0,25	0,75	52
POR-C	0,15	0,85	20
POR-B	0,296	0,704	54
BR-SE	0	1	22
FR-TO	0	1	54
FR-SM	0	1	62
BR-U	0	1	68
BR-A	0	1	54
BR-I	0	1	56
KenES	1	0	24
KenW	1	0	20
TZ	1	0	42
TZE	1	0	38
Ken-A3	1	0	40
Ken-A5	1	0	34
Ken-A4	1	0	28
CRY	1	0	24
POR-SE	1	0	24
SP-C2	1	0	8
SP-T	1	0	10
SP-C1	1	0	14
SP-Vv	1	0	36
SP-Va	1	0	12
SP-V	1	0	16
SP74_9	1	0	30
FR-SJ	1	0	56
TU-L	1	0	28
TU-B	1	0	26
GR	1	0	32
SP-Ag	1	0	32
SP-Am	1	0	46

Locus *evaTC1-A12*

Population	Allèles									Nombre de gènes
	211	213	215	219	221	228	230	232	239	
BR-C	0	0	0	0	0	0	0	0	1	66
BR-G	0	0	0	0	0	0	0	0	1	34
BR-B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	62
BR-SE	0	0	0	0	0	0	0	0	1	56
POR-L	0	0	0	0,615	0,173	0	0,212	0	0	52
POR-C	0	0	0	0,889	0	0	0,111	0	0	18
POR-B	0	0	0	0,741	0	0	0,259	0	0	54
BR-SE	0	0	0	1	0	0	0	0	0	22
FR-TO	0	0	0	1	0	0	0	0	0	52
FR-SM	0	0	0	1	0	0	0	0	0	62
BR-U	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	68
BR-A	0,696	0	0,304	0	0	0	0	0	0	56
BR-I	0	0,482	0,518	0	0	0	0	0	0	56
KenES	0	0	0	0	0	0	1	0	0	24
KenW	0	0	0	0	0	0	1	0	0	12
TZ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	42
TZE	0	0	0	0	0	0	1	0	0	32
Ken-A3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	40
Ken-A5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	34
Ken-A4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	30
CRY	0	0	0	0	0	0	1	0	0	22
POR-SE	0	0	0	0	0	0	0,958	0,042	0	24
SP-C2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	8
SP-T	0	0	0	0	0	0	1	0	0	10
SP-C1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	12
SP-Vv	0	0	0	0	0	0	1	0	0	32
SP-Va	0	0	0	0	0	0	0,977	0,023	0	12
SP-V	0,188	0	0	0	0	0	0,813	0	0	16
SP74_9	0	0	0	0	0	0,077	0,885	0,038	0	26
FR-SJ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	54
TU-L	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28
TU-B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28
GR	1	0	0	0	0	0	0	0	0	32
SP-Ag	0,967	0	0	0	0	0	0,033	0	0	30
SP-Am	0,957	0	0	0	0	0	0,043	0	0	46

Locus *evaTC1-H4*

Population	Allèles		Nombre de gènes
	173	175	
BR-C	0,015	0,985	68
BR-G	0	1	38
BR-B	0	1	64
BR-SE	0	1	56
POR-L	0,192	0,808	52
POR-C	0	1	20
POR-B	0,296	0,704	54
BR-SE	0	1	22
FR-TO	0	1	52
FR-SM	0	1	62
BR-U	0,824	0,176	68
BR-A	0,333	0,667	54
BR-I	1	0	56
KenES	1	0	24
KenW	1	0	20
TZ	1	0	42
TZE	1	0	38
Ken-A3	1	0	40
Ken-A5	1	0	34
Ken-A4	1	0	30
CRY	1	0	22
POR-SE	1	0	24
SP-C2	1	0	8
SP-T	1	0	10
SP-C1	1	0	14
SP-Vv	1	0	36
SP-Va	1	0	10
SP-V	1	0	16
SP74_9	1	0	28
FR-SJ	1	0	56
TU-L	1	0	26
TU-B	1	0	28
GR	1	0	32
SP-Ag	1	0	32
SP-Am	1	0	46

Locus *evaTC5-E6*

Population	Allèles		Nombre de gènes
	299	302	
BR-C	0,912	0,088	68
BR-G	1	0	38
BR-B	0,871	0,129	62
BR-SE	1	0	56
POR-L	0	1	50
POR-C	0	1	18
POR-B	0	1	54
BR-SE	0	1	22
FR-TO	0	1	42
FR-SM	0	1	62
BR-U	0	1	68
BR-A	0	1	54
BR-I	0	1	56
KenES	0	1	22
KenW	0	1	18
TZ	0	1	40
TZE	0	1	34
Ken-A3	0	1	40
Ken-A5	0	1	32
Ken-A4	0	1	30
CRY	0	1	22
POR-SE	0	1	24
SP-C2	0	1	8
SP-T	0	1	10
SP-C1	0	1	14
SP-Vv	0	1	36
SP-Va	0	1	10
SP-V	0	1	16
SP74_9	0	1	30
FR-SJ	0	1	56
TU-L	0	1	26
TU-B	0	1	20
GR	0	1	24
SP-Ag	0	1	30
SP-Am	0	1	44

Locus *evaTC2-G2*

Population	Allèles									Nombre de gènes
	178	180	182	184	186	188	190	196	198	
BR-C	0	0	1	0	0	0	0	0	0	68
BR-G	0	0	1	0	0	0	0	0	0	38
BR-B	0	0	0,344	0	0	0,656	0	0	0	64
BR-SE	0	1	0	0	0	0	0	0	0	56
POR-L	0	0	0,788	0	0	0	0	0,212	0	52
POR-C	0	0	0,889	0	0	0	0	0,111	0	18
POR-B	0	0,093	0,667	0	0	0	0	0,241	0	54
BR-SE	0	0	1	0	0	0	0	0	0	22
FR-TO	0	0	1	0	0	0	0	0	0	54
FR-SM	0	0	0,919	0,081	0	0	0	0	0	62
BR-U	0	0	0	0	0	0,882	0,118	0	0	68
BR-A	0	0	0	0	0	1	0	0	0	56
BR-I	0,821	0	0,179	0	0	0	0	0	0	56
KenES	0	0	0	0	0	0	0	1	0	22
KenW	0	0	0	0	0	0	0	0,95	0,05	20
TZ	0	0	0	0	0	0	0	0,976	0,024	42
TZE	0	0	0	0	0	0	0	1	0	38
Ken-A3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	40
Ken-A5	0	0	0	0	0	0	0	0,912	0,088	34
Ken-A4	0	0	0	0	0	0	0	0,846	0,154	26
CRY	0	0	0	0	0,042	0	0	0,958	0	24
POR-SE	0	0	0	0	0	0	0	0,875	0,125	24
SP-C2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	8
SP-T	0	0	0	0	0	0	0	1	0	10
SP-C1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	14
SP-Vv	0	0	0	0	0	0	0	1	0	34
SP-Va	0	0	0	0	0	0	0	1	0	12
SP-V	0	0	0	0	0	0	0	0,875	0,125	16
SP74_9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	26
FR-SJ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	54
TU-L	0	0	0	0	1	0	0	0	0	28
TU-B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	28
GR	0	0	0	0	1	0	0	0	0	28
SP-Ag	0	0	0	0	0,813	0	0	0,188	0	32
SP-Am	0	0	0	0	0,826	0	0	0,174	0	46

Locus evaTC2-A8

Population	Allèles					Nombre de gènes
	279	281	283	285	287	
BR-C	1	0	0	0	0	68
BR-G	1	0	0	0	0	38
BR-B	0	1	0	0	0	64
BR-SE	0	1	0	0	0	52
POR-L	0	0,82	0,18	0	0	50
POR-C	0	0,95	0,05	0	0	20
POR-B	0	0,741	0,259	0	0	54
BR-SE	0	1	0	0	0	22
FR-TO	0	1	0	0	0	48
FR-SM	0	1	0	0	0	62
BR-U	0	0	0	0,956	0,044	68
BR-A	0,685	0	0	0,315	0	54
BR-I	0	0	0	1	0	56
KenES	0	0	1	0	0	20
KenW	0	0	1	0	0	18
TZ	0	0	1	0	0	40
TZE	0	0	1	0	0	36
Ken-A3	0	0	1	0	0	36
Ken-A5	0	0	1	0	0	28
Ken-A4	0	0	1	0	0	22
CRY	0	0	1	0	0	20
POR-SE	0	0	1	0	0	24
SP-C2	0	0	1	0	0	8
SP-T	0	0	1	0	0	10
SP-C1	0	0	1	0	0	14
SP-Vv	0	0	1	0	0	30
SP-Va	0	0	1	0	0	12
SP-V	0	0	1	0	0	14
SP74_9	0	0	1	0	0	24
FR-SJ	0	0	1	0	0	54
TU-L	0	0	0	0	1	28
TU-B	0	0	0	0	1	28
GR	0	0	0	0	1	28
SP-Ag	0	0	0,067	0	0,933	30
SP-Am	0	0	0,068	0	0,932	44

Locus evaTG2-A7

Population	Allèles		Nombre de gènes
	283	285	
BR-C	1	0	68
BR-G	1	0	30
BR-B	1	0	62
BR-SE	1	0	56
POR-L	0,8	0,2	50
POR-C	0,9	0,1	20
POR-B	0,741	0,259	54
BR-SE	1	0	22
FR-TO	1	0	50
FR-SM	1	0	62
BR-U	0,227	0,773	66
BR-A	0	1	54
BR-I	0	1	54
KenES	0	1	24
KenW	0	1	16
TZ	0	1	42
TZE	0	1	36
Ken-A3	0	1	40
Ken-A5	0	1	32
Ken-A4	0	1	30
CRY	0	1	24
POR-SE	0	1	24
SP-C2	0	1	8
SP-T	0	1	10
SP-C1	0	1	12
SP-Vv	0	1	36
SP-Va	0	1	12
SP-V	0	1	16
SP74_9	0	1	30
FR-SJ	0	1	54
TU-L	0	1	26
TU-B	0	1	24
GR	0	1	24
SP-Ag	0	1	26
SP-Am	0	1	46

Locus evaTC2-A2

Population	Allèles							Nombre de gènes
	167	169	170	172	174	176	180	
BR-C	0	0	0	0	1	0	0	68
BR-G	0	0	0	0	1	0	0	38
BR-B	0	0	0	0	1	0	0	64
BR-SE	0	0	0	0	0	0	1	54
POR-L	0	0	0	0,212	0	0,788	0	52
POR-C	0	0	0	0	0	1	0	18
POR-B	0	0	0	0,222	0	0,778	0	54
BR-SE	0	0	0	0	0	1	0	22
FR-TO	0	0	0	0	0	1	0	54
FR-SM	0	0	0	0	0	1	0	62
BR-U	0,515	0,485	0	0	0	0	0	68
BR-A	1	0	0	0	0	0	0	56
BR-I	0,148	0	0,833	0,019	0	0	0	54
KenES	0	0	0	1	0	0	0	22
KenW	0	0	0	1	0	0	0	20
TZ	0	0	0	1	0	0	0	42
TZE	0	0	0	1	0	0	0	38
Ken-A3	0	0	0	1	0	0	0	40
Ken-A5	0	0	0	1	0	0	0	34
Ken-A4	0	0	0	1	0	0	0	28
CRY	0	0	0	1	0	0	0	24
POR-SE	0	0	0	1	0	0	0	24
SP-C2	0	0	0	1	0	0	0	8
SP-T	0	0	0	1	0	0	0	10
SP-C1	0	0	0	1	0	0	0	14
SP-Vv	0	0	0	1	0	0	0	36
SP-Va	0	0	0	1	0	0	0	12
SP-V	0	0	0	1	0	0	0	14
SP74_9	0	0	0	1	0	0	0	30
FR-SJ	0	0	0	1	0	0	0	54
TU-L	1	0	0	0	0	0	0	26
TU-B	1	0	0	0	0	0	0	28
GR	1	0	0	0	0	0	0	32
SP-Ag	0,767	0	0	0,233	0	0	0	30
SP-Am	0,717	0	0	0,283	0	0	0	46

Locus evaTC5-E3

Population	Allèles					Nombre de gènes
	300	305	308	314	316	
BR-C	0	1	0	0	0	66
BR-G	0	1	0	0	0	32
BR-B	0	0,531	0,469	0	0	64
BR-SE	0	0	0	0	1	56
POR-L	0	0,769	0	0	0,231	52
POR-C	0	0,9	0	0	0,1	20
POR-B	0	0,712	0	0	0,288	52
BR-SE	0	1	0	0	0	22
FR-TO	0	1	0	0	0	54
FR-SM	0	1	0	0	0	62
BR-U	0	0,853	0	0	0,147	68
BR-A	0,096	0,904	0	0	0	52
BR-I	0,074	0,056	0,87	0	0	54
KenES	0	0	0	0	1	24
KenW	0	0	0	0,056	0,944	18
TZ	0	0	0	0	1	40
TZE	0	0	0	0	1	34
Ken-A3	0	0	0	0	1	40
Ken-A5	0	0	0	0	1	34
Ken-A4	0	0	0	0	1	30
CRY	0	0	0	0	1	22
POR-SE	0	0	0	0	1	24
SP-C2	0	0	0	0	1	8
SP-T	0	0	0	0	1	10
SP-C1	0	0	0	0	1	14
SP-Vv	0	0	0	0	1	36
SP-Va	0	0	0	0	1	10
SP-V	0	0	0	0	1	12
SP74_9	0	0	0	0	1	30
FR-SJ	0	0	0	0	1	54
TU-L	1	0	0	0	0	26
TU-B	1	0	0	0	0	28
GR	1	0	0	0	0	22
SP-Ag	0,464	0	0	0	0,536	28
SP-Am	0,717	0	0	0	0,283	46

Locus evaTG1-D9

Population	Allèles										Nombre de gènes
	253	255	259	263	264	265	267	269	275	277	
BR-C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64
BR-G	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38
BR-B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58
BR-SE	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52
POR-L	0,808	0	0	0,192	0	0	0	0	0	0	52
POR-C	0,85	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	20
POR-B	0,769	0	0	0,231	0	0	0	0	0	0	52
BR-SE	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
FR-TO	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54
FR-SM	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	62
BR-U	0	0	0	0	0,273	0	0	0	0,727	0	66
BR-A	0	0	0	0	0	0	0	0	0,648	0,352	54
BR-I	0	0,056	0	0	0	0	0,778	0,074	0,093	0	54
KenES	0	0	0	0,958	0	0,042	0	0	0	0	24
KenW	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	18
TZ	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	38
TZE	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	38
Ken-A3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	40
Ken-A5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	34
Ken-A4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	26
CRY	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	24
POR-SE	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	24
SP-C2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	8
SP-T	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	10
SP-C1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	14
SP-Vv	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	34
SP-Va	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	12
SP-V	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	16
SP74_9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	30
FR-SJ	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	56
TU-L	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	26
TU-B	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	22
GR	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	26
SP-Ag	0	0	0,893	0,107	0	0	0	0	0	0	28
SP-Am	0	0	0,717	0,283	0	0	0	0	0	0	46

Locus evaTC3-D3

Population	Allèles					Nombre de gènes
	105	116	118	122	124	
BR-C	0	0	0	1	0	68
BR-G	0	0	0	1	0	40
BR-B	0	0	0,931	0,069	0	58
BR-SE	0	1	0	0	0	54
POR-L	0	0	0,212	0	0,788	52
POR-C	0	0	0,1	0	0,9	20
POR-B	0	0	0,296	0	0,704	54
BR-SE	0	0	0	0	1	18
FR-TO	0	0	0	0,019	0,981	54
FR-SM	0	0	0	0	1	62
BR-U	0	0	1	0	0	68
BR-A	0	0	1	0	0	56
BR-I	1	0	0	0	0	56
KenES	0	0	1	0	0	24
KenW	0	0	1	0	0	18
TZ	0	0	1	0	0	42
TZE	0	0	1	0	0	38
Ken-A3	0	0	1	0	0	40
Ken-A5	0	0	1	0	0	34
Ken-A4	0	0	1	0	0	32
CRY	0	0	1	0	0	24
POR-SE	0	0	1	0	0	24
SP-C2	0	0	1	0	0	8
SP-T	0	0	1	0	0	10
SP-C1	0	0	1	0	0	14
SP-Vv	0	0	1	0	0	36
SP-Va	0	0	1	0	0	12
SP-V	0	0	1	0	0	12
SP74_9	0	0	1	0	0	30
FR-SJ	0	0	1	0	0	56
TU-L	0	0	1	0	0	28
TU-B	0	0	1	0	0	28
GR	0	0	1	0	0	30
SP-Ag	0	0	1	0	0	32
SP-Am	0	0	1	0	0	46

Locus *evaTC1-A8*

Population	Allèles							Nombre de gènes
	229	234	236	240	242	243	246	
BR-C	0	0	0	0	0	0	1	68
BR-G	0	0	0	0	0	0	1	36
BR-B	0	0	0	0	0	0	1	64
BR-SE	0	0	0	0	0	0	1	56
POR-L	0	0	0	0,212	0	0	0,788	52
POR-C	0	0	0	0	0	0,1	0,9	20
POR-B	0	0	0	0,296	0	0	0,704	54
BR-SE	0	0	0	0	0	0	1	22
FR-TO	0	0	0	0	0	0	1	52
FR-SM	0	0	0	0	0	0	1	62
BR-U	0	0,588	0	0	0,412	0	0	68
BR-A	0,357	0	0	0	0,643	0	0	56
BR-I	0,143	0,857	0	0	0	0	0	56
KenES	0	0	0	1	0	0	0	24
KenW	0	0	0	1	0	0	0	20
TZ	0	0	0	1	0	0	0	40
TZE	0	0	0	1	0	0	0	38
Ken-A3	0	0	0	1	0	0	0	40
Ken-A5	0	0	0	1	0	0	0	34
Ken-A4	0	0	0	1	0	0	0	28
CRY	0	0	0	1	0	0	0	24
POR-SE	0	0	0	1	0	0	0	24
SP-C2	0	0	0	1	0	0	0	8
SP-T	0	0	0	1	0	0	0	10
SP-C1	0	0	0	1	0	0	0	14
SP-Vv	0	0	0	1	0	0	0	36
SP-Va	0	0	0	1	0	0	0	8
SP-V	0	0	0	1	0	0	0	12
SP74_9	0	0	0	1	0	0	0	30
FR-SJ	0	0	0	1	0	0	0	56
TU-L	0	0	1	0	0	0	0	28
TU-B	0	0	1	0	0	0	0	28
GR	0	0	1	0	0	0	0	30
SP-Ag	0	0	1	0	0	0	0	30
SP-Am	0	0	0,913	0,087	0	0	0	46

Locus *evaTC1-G11*

Population	Allèles							Nombre de gènes
	299	301	318	324	326	328	334	
BR-C	0	0	0	0,875	0,125	0	0	48
BR-G	0	0	0	0	0	1	0	32
BR-B	0	0	0	0,306	0,694	0	0	62
BR-SE	0	0	0	0	0	0	1	56
POR-L	0,182	0	0,818	0	0	0	0	44
POR-C	0,111	0	0,889	0	0	0	0	18
POR-B	0,259	0	0,741	0	0	0	0	54
BR-SE	0	0	1	0	0	0	0	22
FR-TO	0	0	1	0	0	0	0	54
FR-SM	0	0	1	0	0	0	0	60
BR-U	0,559	0,441	0	0	0	0	0	68
BR-A	0,821	0,179	0	0	0	0	0	56
BR-I	0,056	0,944	0	0	0	0	0	54
KenES	1	0	0	0	0	0	0	24
KenW	1	0	0	0	0	0	0	16
TZ	1	0	0	0	0	0	0	40
TZE	1	0	0	0	0	0	0	38
Ken-A3	1	0	0	0	0	0	0	38
Ken-A5	1	0	0	0	0	0	0	32
Ken-A4	1	0	0	0	0	0	0	26
CRY	1	0	0	0	0	0	0	22
POR-SE	1	0	0	0	0	0	0	24
SP-C2	1	0	0	0	0	0	0	8
SP-T	1	0	0	0	0	0	0	10
SP-C1	1	0	0	0	0	0	0	10
SP-Vv	1	0	0	0	0	0	0	36
SP-Va	1	0	0	0	0	0	0	8
SP-V	1	0	0	0	0	0	0	16
SP74_9	1	0	0	0	0	0	0	30
FR-SJ	1	0	0	0	0	0	0	56
TU-L	1	0	0	0	0	0	0	24
TU-B	1	0	0	0	0	0	0	18
GR	1	0	0	0	0	0	0	28
SP-Ag	1	0	0	0	0	0	0	32
SP-Am	1	0	0	0	0	0	0	46

Locus evaTC5-D2

Population	Allèles			Nombre de gènes
	225	227	229	
BR-C	0	0	1	68
BR-G	0	0	1	38
BR-B	0	0	1	64
BR-SE	0	0	1	56
POR-L	0	0,2	0,8	50
POR-C	0	0	1	20
POR-B	0	0,259	0,741	54
BR-SE	0	0	1	22
FR-TO	0	0	1	54
FR-SM	0	0	1	62
BR-U	0	1	0	68
BR-A	0	1	0	52
BR-I	0,893	0,107	0	56
KenES	0	1	0	20
KenW	0	1	0	20
TZ	0	1	0	42
TZE	0	1	0	38
Ken-A3	0	1	0	40
Ken-A5	0	1	0	34
Ken-A4	0	1	0	30
CRY	0	1	0	24
POR-SE	0	1	0	24
SP-C2	0	1	0	8
SP-T	0	1	0	10
SP-C1	0	1	0	14
SP-Vv	0	1	0	36
SP-Va	0	1	0	10
SP-V	0	1	0	14
SP74_9	0	1	0	30
FR-SJ	0	1	0	56
TU-L	0	1	0	28
TU-B	0	1	0	28
GR	0	1	0	30
SP-Ag	0	1	0	32
SP-Am	0	1	0	46

Locus evaATCT2-G11

Population	Allèles				Nombre de gènes
	121	127	130	146	
BR-C	0	0	1	0	68
BR-G	0,026	0	0,974	0	38
BR-B	0	0	1	0	64
BR-SE	0	0	1	0	56
POR-L	0	0,212	0	0,788	52
POR-C	0	0,1	0	0,9	20
POR-B	0	0,296	0	0,704	54
BR-SE	0	0	0	1	22
FR-TO	0	0	0	1	54
FR-SM	0	0	0	1	62
BR-U	0	1	0	0	68
BR-A	0,037	0,963	0	0	54
BR-I	0	1	0	0	56
KenES	0	1	0	0	24
KenW	0	1	0	0	20
TZ	0	1	0	0	42
TZE	0	1	0	0	38
Ken-A3	0	1	0	0	40
Ken-A5	0	1	0	0	34
Ken-A4	0	1	0	0	32
CRY	0	1	0	0	24
POR-SE	0	0,958	0	0,042	24
SP-C2	0	1	0	0	8
SP-T	0	1	0	0	10
SP-C1	0	1	0	0	14
SP-Vv	0	1	0	0	36
SP-Va	0	1	0	0	12
SP-V	0	1	0	0	12
SP74_9	0	1	0	0	30
FR-SJ	0	1	0	0	56
TU-L	0	1	0	0	28
TU-B	0	1	0	0	28
GR	0	1	0	0	26
SP-Ag	0	1	0	0	32
SP-Am	0	1	0	0	46