

Diversité génétique de *Trichopria drosophilae*, un ennemi de la drosophile du cerisier

Felix Gugerli¹, Marco Moretti¹, René Graf¹, Michela Maier¹, Corrado Cara³, Jana Collatz² et Valeria Trivellone^{1,3}

¹Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage WSL, 8903 Birmensdorf, Suisse

²Agroscope, 8046 Zurich, Suisse

³Université de l'Illinois, 61820 Champaign, États-Unis

Renseignements: Valeria Trivellone, e-mail: valeria.trivellone@gmail.com



Possible antagoniste de la drosophile du cerisier: le parasitoïde *Trichopria drosophilae*, ici en train de pondre ses œufs dans la puppe d'une drosophile du cerisier. (Photo: Jana Collatz, Steffen Hagenbucher, Agroscope, Urs Wyss, Entofilm)

Introduction

La drosophile du cerisier (*Drosophila suzukii*) est originaire d'Asie et se propage en Europe depuis 2008 (Cini *et al.* 2012). Contrairement aux mouches du vinaigre indigènes (Drosophilidae), elle peut pondre ses œufs dans des fruits mûrs et intacts, provoquant ainsi des dégâts dans diverses cultures fruitières (Mazzi *et al.* 2017). Actuellement, on a recours aux insecticides, aux filets anti-insectes et aux pièges à insectes pour lutter contre ce fléau; cependant, ces méthodes affectent également d'autres espèces et l'environnement, et elles ne sont pas applicables dans toutes les situations ou ne sont pas suffisamment efficaces (Haye *et al.* 2016).

Plusieurs études ont indiqué que le parasitoïde indigène *Trichopria drosophilae* pourrait constituer un ennemi naturel prometteur dans la lutte biologique contre la drosophile du cerisier, car il a un effet de parasitage élevé et que son élevage est simple (par ex. Rossi Stacconi *et al.* 2019). *Trichopria drosophilae* a déjà été identifié

en Suisse, principalement dans des structures boisées et des haies dans le paysage agricole (Knoll *et al.* 2017).

La diversité et le flux génétiques peuvent être déterminants pour le succès de l'utilisation des parasitoïdes pour la lutte biologique (Wajnberg 2004; Hoelmer et Kirk 2005). Les populations qui se sont adaptées à leur environnement local par différenciation génétique peuvent, par exemple, se distinguer considérablement dans leur choix des espèces hôtes ou dans leur capacité d'adaptation à la température (Fleury *et al.* 2009; Henry *et al.* 2008). Par conséquent, ces parasitoïdes conviennent plus ou moins bien pour la lutte biologique contre un ravageur dans un environnement donné. La différenciation génétique peut également résulter d'un flux génétique restreint, lorsque la reproduction s'effectue de préférence à l'échelle locale ou que des barrières paysagères empêchent le mélange des individus.

Il n'existe pas à ce jour d'études génétiques sur *T. drosophilae* dans son aire de répartition naturelle, mais certaines études montrent de grandes différences entre les populations locales (Wang *et al.* 2016; Knoll *et al.* 2017). Pour décrire la diversité et la différenciation génétiques, nous avons développé des marqueurs moléculaires (microsatellites) et relevé la structure génétique de *T. drosophilae* dans l'espace aux niveaux local et régional, en particulier dans le canton du Tessin (Suisse). Nous avons posé les questions suivantes:

1. Comment la diversité génétique de *T. drosophilae* est-elle répartie à différentes échelles dans l'espace?
2. La différenciation génétique reflète-t-elle les différents habitats de *T. drosophilae*?

Matériel et méthodes

Collection de parasitoïdes

Dans le canton du Tessin, 16 sites ont été sélectionnés et répartis sur l'ensemble de la zone d'étude (fig. 1): huit localités hétérogènes avec un mélange de zones fores-

tières semi-naturelles et de différentes cultures (par ex. vignes, petits fruits, cerisiers) et huit localités présentant des paysages agricoles plus homogènes avec des zones forestières semi-naturelles et une seule culture. Trois types d'habitats ont été définis par site: intérieur de la surface cultivée (=culture), intérieur de la zone forestière (semi-) naturelle (=bois) et zone de transition entre la culture et le bois (=écotone). Pour chaque type d'habitat, trois emplacements ont été choisis pour les pièges avec chacun un piège Delta au sol et un dans le feuillage (1–1,5 m) (=micro-site). Les pièges comprenaient chacun quatre gobelets en plastique contenant des fruits de saison (cerises, prunes) infestés de larves et de pupes d'espèces indigènes de *Drosophila* *D. hydei*, *D. immigrans*, *D. melanogaster* et *D. subobscura*, dans lesquels les parasitoïdes pouvaient pondre leurs œufs (Knoll *et al.* 2017). En juin, août, septembre et octobre 2017, des pièges ont été installés sur tous les sites pendant 4–5 jours. Au total, 416 échantillons ont été prélevés.

Les échantillons ont été conservés à 23 °C et 60 % d'humidité relative et les parasitoïdes adultes éclos ont été placés dans de l'alcool à 96 %, à une température de –20 °C. Les espèces ont ensuite été déterminées. Tous les *T. drosophilae* ont été conservés pour analyse génétique. Serge Fischer (Agroscope Changins), Annette Herz et Camilla Englert (Julius Kühn-Institut Darmstadt) et BioPlanet (Cesena, Italie) ont mis à disposition d'autres individus de *T. drosophilae* comme référence. Ces individus ont été utilisés pour comparer les données du Tessin avec celles de régions plus éloignées.

Extraction d'ADN et géotypage microsatellite

Afin de déterminer la diversité génétique et la structure, nous avons développé en collaboration avec ecogenics GmbH (Balgach) des marqueurs pour des microsatellites dans l'ADN des noyaux cellulaires, spécifiques de *T. drosophilae*. Sur la base de séquences d'ADN (Illumina MiSeq, Nano 2x250 v2) à partir d'un mélange de dix individus de *T. drosophilae*, des configurations microsatellites caractéristiques, c'est-à-dire des séquences de 2–4 paires de bases répétitives (Gugerli *et al.* 2016), ont été recherchées et des sites appropriés pour les amorces ont été identifiés dans les séquences d'ADN adjacentes pour permettre une amplification PCR (*polymerase chain reaction*) de ces fragments d'ADN. Par la suite, 21 marqueurs fiables qui présentaient des variations dans 15 échantillons de *T. drosophilae* ont été établis, c'est-à-dire qu'ils présentaient des nombres de copies différents de la configuration microsatellite. Les 21 marqueurs ont été combinés dans trois approches ACP multiplex, ce qui a permis d'analyser les parasitoïdes des micro-sites

Résumé

La drosophile du cerisier (*Drosophila suzukii*) est une espèce envahissante qui a été introduite en Europe et cause des dégâts aux cultures fruitières. *Trichopria drosophilae* est considéré comme un parasitoïde indigène prometteur pour la lutte biologique contre *D. suzukii*. Afin de déterminer la diversité génétique et la structure génétique des populations de *T. drosophilae* dans l'espace, nous avons développé 21 nouveaux marqueurs moléculaires (microsatellites) spécifiques pour cette espèce. Des échantillons de *T. drosophilae* ont été prélevés sur 16 sites dans trois types d'habitats différents et ont permis d'identifier trois groupes génétiques. Bien que de nombreux individus auraient pu être attribués à plus d'un des trois groupes génétiques, on a pu observer une corrélation entre l'appartenance à l'un de ces groupes et l'habitat privilégié (faible flux génétique entre les habitats au sein des sites). D'autres analyses suggèrent que *T. drosophilae* se propage rapidement entre différentes régions (flux génétique élevé entre les sites). Nos résultats montrent comment les études génétiques peuvent servir à suivre la propagation d'organismes utilisés pour la lutte biologique contre les ravageurs.

où un nombre suffisant d'individus étaient disponibles. Des détails sur les marqueurs moléculaires (numéros d'accès GenBank MN264147–MN264167) et l'ensemble complet des données sont disponibles sur <https://doi.org/10.16904/envidat.80>.

Analyses génétiques des populations

Pour décrire la diversité et la différenciation génétiques, nous avons effectué des analyses génétiques des populations par le logiciel Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier *et al.* 2005). Des groupes d'individus génétiquement similaires ont été déterminés avec le logiciel Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000). Afin de vérifier si les trois groupes génétiques ($K=3$) correspondaient aux trois types d'habitats, nous avons appliqué un test χ^2 . L'auto-corrélation spatiale résultant d'une éventuelle isolation par éloignement géographique a été déterminée par le test de Mantel (dans Arlequin), qui permet de calculer une corrélation matricielle des distances génétiques et géographiques par paires.

Résultats et discussion

Au total, 467 individus de *T. drosophilae* provenant de 11 sites ont été sélectionnés pour les analyses génétiques et complétés par des guêpes d'Allemagne et de BioPlanet. La diversité génétique moyenne calculée à l'aide des marqueurs était de 0,3349-0,6177 et variait considérablement entre les trois types d'habitats (tabl. 1). Bien que la diversité génétique ait tendance à être plus élevée dans la surface agricole utile (tabl. 1), cela n'a pu être confirmé statistiquement en raison du petit nombre de comparaisons et des écarts-types importants. Les analyses structurales ont montré une grande variation entre les analyses répétées (itérations avec le même nombre de groupes *K*), ce qui indique une attribution plutôt incertaine aux groupes biologiquement significatifs. Par conséquent, les résultats indiqués ici sont caractéristiques de l'attribution, mais ne sont donnés qu'à titre d'exemples.

Nos analyses ont révélé un degré élevé de mélange génétique chez la plupart des individus, ce qui s'est manifesté par une probabilité d'attribution à plus d'un groupe génétique. Ce mélange est dû au fait que des populations qui étaient auparavant séparées entrent en

Tableau 1 | Diversité génétique pondérée à l'aide de 21 marqueurs microsatellites (\pm écart-type, ET), dans l'occurrence de *Trichopria drosophilae* collectés dans différents habitats au Tessin.

Localité	Habitat	Diversité génétique moyenne \pm ET
Vezia	Écotone	0,3349 \pm 0,1795
Contone	Culture	0,5668 \pm 0,2869
	Bois	0,3667 \pm 0,1935
Davescio	Culture	0,6078 \pm 0,3062
	Forêt	0,4614 \pm 0,2393
Corteglia	Bois	0,4990 \pm 0,2579
	Écotone	0,5018 \pm 0,2560
Mezzana	Culture	0,4511 \pm 0,2344
	Bois	0,5909 \pm 0,3024
	Écotone	0,3750 \pm 0,1975
Stabio	Bois	0,6117 \pm 0,3097
Gordola	Culture	0,6038 \pm 0,3036
	Écotone	0,5048 \pm 0,2818
Sementina	Culture	0,5904 \pm 0,3018
	Bois	0,5326 \pm 0,2742
	Écotone	0,5339 \pm 0,2712
Novazzano	Culture	0,5569 \pm 0,2904
Monteggio	Bois	0,4470 \pm 0,2324
Giubiasco	Bois	0,5780 \pm 0,2958

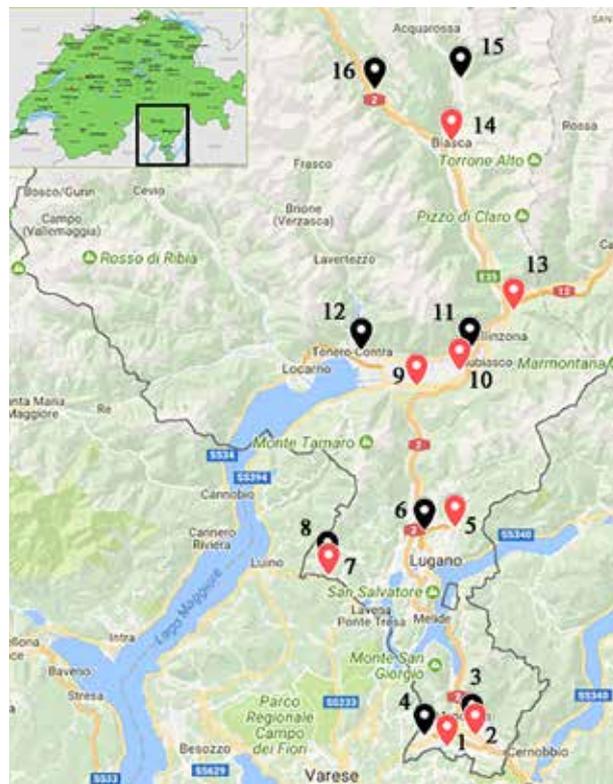


Figure 1 | Répartition géographique des 16 sites étudiés dans le canton du Tessin. En noir, les sites ayant plus d'une plante utile dans un rayon de 3 ha; en rouge, les localités présentant des paysages homogènes. 1: Novazzano, 2: Mezzana, 3: Corteglia, 4: Stabio; 5: Davescio, 6: Vezia, 7: Monteggio, 8: Sessa, 9: Contone, 10: Giubiasco, 11: Sementina, 12: Gordola, 13: Arbedo, 14: Biasca, 15: Malvaglia, 16: Giornico.

Carte du Tessin: Google Maps (novembre 2017): <https://www.google.com/maps/place/Ticino,+Switzerland/@46.2176967,8.59652,10z/data=!4m5!3m4!1s0x478597da2e3ade83:0xc3eda1a3958deb8!8m2!3d46.331734!4d8.8004529?hl=fr>

Carte de la Suisse: Annamap.com (novembre 2017) : <http://annamappa.com/svizzera/>

contact les unes avec les autres et se reproduisent entre elles. C'est ce que montre l'exemple de $K=3$ groupes génétiques, où de nombreux individus affichaient une certaine probabilité d'attribution aux trois groupes (fig. 2). D'autre part, il y avait des différences génétiques nettes entre les occurrences de *T. drosophilae* dans différents micro-sites et habitats d'une localité. Cela indique un flux génétique local restreint. Les échantillons de BioPlanet (BP) présentaient une appartenance à l'un des groupes génétiques (en rouge sur la figure 2) qui dominait dans différentes localités; le même modèle a également été trouvé en prenant des valeurs *K* différentes comme hypothèses (résultats non publiés). Cela pourrait indiquer que les *T. drosophilae* lâchés dans le nord de l'Italie sont déjà présents à plusieurs endroits du Tessin et se sont établis dans des populations indigènes. Cependant, il y avait trop peu d'individus du nord de l'Italie pour confirmer l'attribution de ces animaux au groupe

Tableau 2 | Attribution des individus de *Trichopria drosophilae* à l'un des trois groupes génétiques et regroupement par occurrence. Regroupement par (A) micro-site à l'intérieur d'un type d'habitat, (B) type d'habitat et (C) micro-site.

A	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Culture-végétation	35	37	0
Culture-sol	38	45	34
Écotone-végétation	0	1	54
Écotone-sol	42	13	2
Bois-végétation	29	19	0
Bois-sol	57	42	19
B			
Culture	73	82	34
Écotone	42	14	56
Bois	86	61	19
C			
Végétation	64	57	54
Sol	137	100	55

génétique «rouge» et ainsi prouver clairement l'origine des animaux.

La différenciation génétique (F_{ST}) entre toutes les occurrences des différents micro-sites était relativement élevée à 0,189 et significativement supérieure à 0 ($p < 0,001$). De même, toutes les différenciations génétiques entre les paires des micro-sites étaient relativement élevées, que les paires proviennent d'occurrences à l'intérieur des localités ou entre elles. Cela signifie que la différenciation à petite échelle est élevée. Si, en revanche, tous les individus d'un même site sont combinés, c'est-à-dire non séparés par type d'habitat, la différenciation génétique

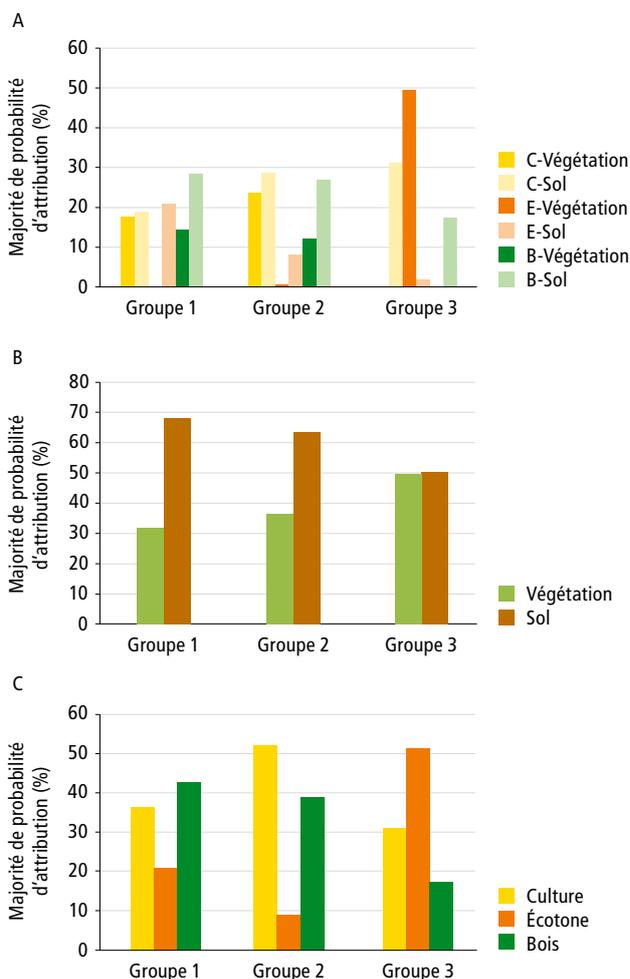


Figure 3 | Occurrence d'individus de *Trichopria drosophilae* attribués à l'un des trois groupes génétiques par rapport à l'origine en provenance de (A) micro-sites à l'intérieur des habitats, (B) d'habitats et (C) des micro-sites.

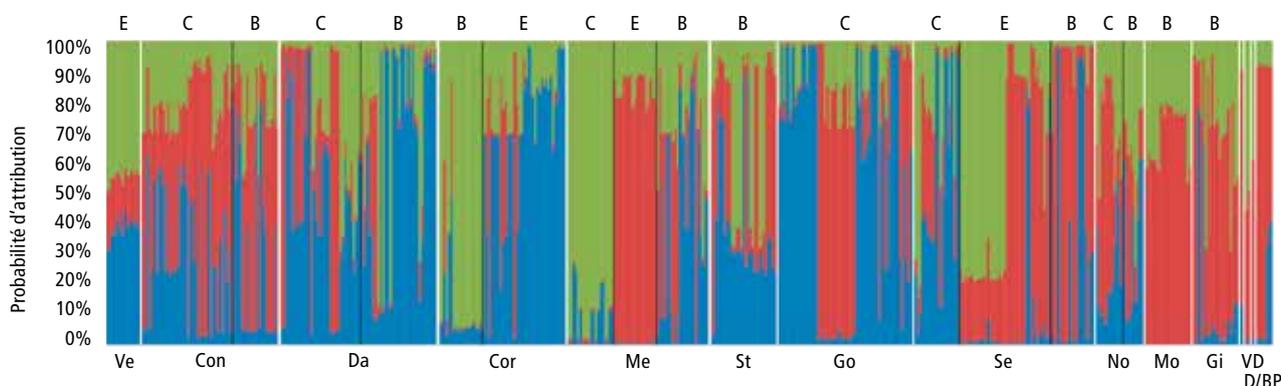


Figure 2 | Probabilité d'attribution des individus de *Trichopria drosophilae* à trois groupes génétiques (rouge: groupe 1; bleu: groupe 2; vert: groupe 3), d'après des analyses de structure (Pritchard et al. 2000). Chaque barre verticale colorée représente un individu, groupé par habitat (séparé par des lignes noires) à l'intérieur des sites (séparés par des lignes blanches). Abréviations des habitats et sites: B=bois, C=culture, E=écotone, Ve=Veza, Con=Contone, Da=Davesco, Cor=Corteglia, Me=Mezzana, St=Stabio, Go=Gordola, Se=Sementina, No=Novazzano, Mo=Monteggio, Gi=Giornico. Des échantillons supplémentaires de quatre origines (VD/D/BP) sont répartis comme suit: canton de Vaud, Suisse; Weil am Rhein et Dossenheim, Allemagne; BioPlanet, Italie du Nord à l'origine.

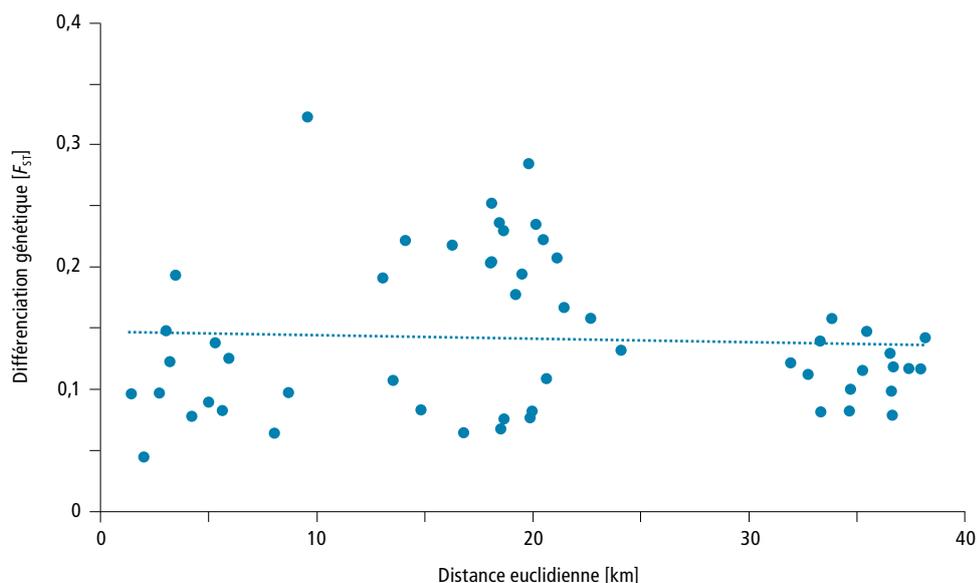


Figure 4 | Relation entre les distances génétiques (F_{ST}) et géographiques (euclidiennes) par paires chez *Trichopria drosophilae*, groupées selon leur occurrence dans différents habitats.

entre les sites tend vers 0, ce qui suggère un flux génétique élevé au niveau régional.

Par la suite, les individus ont été attribués à l'un des trois groupes génétiques en fonction de la probabilité d'attribution la plus élevée: 201 individus appartenaient ainsi au groupe 1 (en rouge sur la figure 2), 157 au groupe 2 (en bleu) et 109 au groupe 3 (en vert). Il a été démontré que les individus provenant de pièges au sol issus du bois (28,4 %) et de l'écotone (20,9 %) étaient de préférence assignés au groupe 1 (tabl. 2). Le groupe 2 comprenait de nombreux individus provenant de surfaces cultivées (28,7 %) et de pièges au sol dans le bois (26,8 %), et environ 50 % des individus du groupe 3 provenaient du feuillage de l'écotone (fig. 3). La relation entre l'attribution à l'un des trois groupes génétiques et l'origine des échantillons a été confirmée par le test χ^2 (tableau 2A; $\chi^2 = 244,43$; $p < 0,001$). Cette relation est également demeurée significative lorsque les groupes ont été établis uniquement par habitat (tableau 2B; $\chi^2 = 71,81$; $p < 0,001$) ou par sol par opposition au feuillage (tableau 2C; $\chi^2 = 9,59$; $p < 0,01$). Cette structuration à petite échelle des occurrences de *T. drosophilae* a également été confirmée par l'absence de corrélation entre les distances génétiques et géographiques par paires (fig. 4; Mantel $r = -0,047$; $p = 0,681$): les différences génétiques étaient très similaires tant à petite échelle qu'à grande échelle et n'ont pas augmenté avec l'éloignement.

Conclusions et perspective

L'analyse génétique à l'aide de 21 marqueurs microsatellites nouvellement développés a permis de distinguer trois groupes génétiques d'individus de *T. drosophilae*

dans le canton du Tessin. On observe à la fois un mélange important entre les sites étudiés, et une nette différenciation entre les trois habitats étudiés. Ce schéma suggère, d'une part, la formation de populations fermées à petite échelle qui se sont adaptées localement (par exemple à différents hôtes ou microclimats) et se reproduisent principalement entre elles. Par conséquent, ces populations locales peuvent plus ou moins bien convenir à la lutte contre la drosophile du cerisier. D'autre part, il semble y avoir un flux génétique élevé à grande échelle. Que les parasitoïdes soient lâchés à partir d'un élevage ou qu'il s'agisse de populations indigènes, on peut supposer qu'ils se dissémineront et se mélangeront relativement rapidement et que cette dissémination pourra également être retracée par les nouveaux marqueurs moléculaires développés. ■

Remerciements

Nous remercions l'Office fédéral de l'agriculture (OFAG) pour le soutien financier apporté au projet par la Task Force *Drosophila suzukii*. Nous remercions également Patrik Kehrlé pour son aide à l'identification des parasitoïdes dans le canton du Tessin et les propriétaires des terrains pour leur bonne collaboration. Jörg Romeis a donné de précieux conseils pour une version antérieure de l'article.

Riassunto

Diversità genetica di *Trichopria drosophilae*, un nemico naturale della drosophila del ciliegio
Drosophila suzukii è una specie esotica invasiva recentemente introdotta in Europa e che causa diversi danni in frutticoltura. *Trichopria drosophilae* è considerato uno dei parassitoidi indigeni più adatti da utilizzare nei programmi di biocontrollo contro *D. suzukii*. Per caratterizzare la variabilità e la struttura genetica delle popolazioni di *T. drosophilae* a diverse scale spaziali, abbiamo sviluppato 21 nuovi marker molecolari specifici. I campioni di *T. drosophilae* sono stati raccolti in 16 località e in tre differenti tipi di habitat, consentendo così di individuare tre gruppi genetici. Sebbene molti degli individui analizzati mostravano probabilità di classificazione in più di uno dei tre gruppi genetici, abbiamo trovato una correlazione tra la probabilità di classificazione più alta a uno dei tre gruppi e l'habitat privilegiato (limitato flusso genico tra gli habitat all'interno delle località). Ulteriori analisi hanno suggerito che *T. drosophilae* si diffonde facilmente tra le differenti regioni (alto flusso genico tra le località). Questi risultati indicano che tali studi genetici potrebbero essere usati per tracciare la diffusione di organismi da impiegare in lotta biologica contro i parassiti.

Summary

Genetic diversity of *Trichopria drosophilae*, a natural enemy of spotted wing drosophila
Drosophila suzukii is an invasive species recently introduced in Europe and causing damages to fruit production. *Trichopria drosophilae* is considered one of the most suitable indigenous parasitoid to be used in biocontrol programs against *D. suzukii*. To characterize genetic variability and the spatial genetic structure of populations of *T. drosophilae*, we developed 21 species-specific molecular markers. Samples of *T. drosophilae* were collected in 16 localities and each of three different habitats and revealed three genetic groups. Though most of the sampled individuals showed mixed assignment probabilities to one of three genetic groups, we found a coincidence between the highest assignment probability to one of the three groups and the preferred habitat (limited gene flow among habitats within localities). Further analyses suggested that *T. drosophilae* disperses well among different regions (high gene flow among localities). These findings indicate how genetic studies may be used to track the dispersal of a species that is released for biological control.

Key words: parasitoid, biological control, spotted wing drosophila, microsatellite markers.

Bibliographie

- Cini A., Ioriatti C. & Anfora G., 2012. A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bull. Insectol.* **65** (1), 149–60.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* **1**, 47–50.
- Fleury F., Gibert P., Ris N. & Allemand R., 2009. Ecology and life history evolution of frugivorous *Drosophila* parasitoids. *Adv. Parasitol.* **70**, 3–44.
- Gugerli F., Holderegger R., 2016. Genetische Methoden. In: *Naturschutzgenetik – Ein Handbuch für die Praxis* (Eds. R. Holderegger R., G. Segelbacher). Haupt, Bern, 183–202.
- Haye T., Girod P., Cuthbertson A. G. S., Wang X. G., Daane K. M., Hoelmer K. A., Baroffio C., Zhang J. P. & Desneux N., 2016. Current SWD IPM tactics and their practical implementation in fruit crops across different regions around the world. *J. Pest Sci.* **89** (3), 643–651.
- Henry L. M., Roitberg B. D. & Gillespie D. R., 2008. Host-range evolution in *Aphidius* parasitoids: fidelity, virulence and fitness trade-offs on an ancestral host. *Evolution* **62**, 689–699.
- Hoelmer K. A. & Kirk A. A., 2005. Selecting arthropod biological control agents against arthropod pests: can the science be improved to decrease the risk of releasing ineffective agents? *Biol. Control* **34**, 255–264.
- Knoll V., Ellenbroek T., Romeis J. & Collatz J., 2017. Seasonal and regional presence of hymenopteran parasitoids of *Drosophila* in Switzerland and their ability to parasitize the invasive *Drosophila suzukii*. *Sci. Rep.* **7**, 40697.
- Mazzi D., Bravin E., Meraner M., Finger R. & Kuske S., 2017. Economic Impact of the Introduction and Establishment of *Drosophila suzukii* on Sweet Cherry Production in Switzerland. *Insects* **8** (18), 1–13.
- Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155** (2), 945–959.
- Rossi Stacconi M. V., Grassi A., Ioriatti C., Anfora G., 2019. Augmentative releases of *Trichopria drosophilae* for the suppression of early season *Drosophila suzukii* populations. *BioControl* **64**, 9–19.
- Wajnberg E., 2004. Measuring genetic variation in natural enemies used for biological control: why and how. In: *Genetics, evolution and biological control* (Eds Ehler L. E., Sforza R., Mateille T.) CAB International, New York, 19–37.
- Wang X. G., Kacar G., Biondi A. & Daane K. M., 2016. Life-history and host preference of *Trichopria drosophilae*, a pupal parasitoid of spotted wing drosophila. *BioControl* **61**, 387–397.