



HAL
open science

**BIOLOGIE ET PHYLOGEOGRAPHIE DE
MONOCHAMUS GALLOPROVINCIALIS
(COLEOPTERA, CERAMBYCIDAE) VECTEUR DU
NEMATODE DU PIN EN EUROPE**

Fotini A. Koutroumpa

► **To cite this version:**

Fotini A. Koutroumpa. BIOLOGIE ET PHYLOGEOGRAPHIE DE MONOCHAMUS GALLO-PROVINCIALIS (COLEOPTERA, CERAMBYCIDAE) VECTEUR DU NEMATODE DU PIN EN EUROPE. Interactions entre organismes. Université d'Orléans, 2007. Français. NNT: . tel-00288604

HAL Id: tel-00288604

<https://theses.hal.science/tel-00288604>

Submitted on 17 Jun 2008

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.

THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Physiologie et Biologie des Organismes et des Populations - Interactions

PAR

Koutroumpa Fotini

**BIOLOGIE ET PHYLOGEOGRAPHIE DE *MONOCHAMUS GALLOPROVINCIALIS*
(COLEOPTERA, CERAMBYCIDAE) VECTEUR DU NEMATODE DU PIN
EN EUROPE**



Soutenue le : **20 décembre 2007**

MEMBRES DU JURY:

Mme Claire Villemant	Chargée de recherche au Muséum d'Histoire Naturelle, Paris	Rapporteur
M. Jean-Claude Grégoire	Professeur, Université Libre de Bruxelles, Belgique	Rapporteur
M. Edmundo Sousa	Chercheur à INIA-EFN Oeiras, Portugal	Examineur
Mme Catherine Bastien	Directeur de recherche, INRA d'Orléans	Examineur
M. Jean-Luc Flot	Chef du Département de la Santé des Forêts, Paris	Examineur
M. Francis Delmotte	Professeur, Université d'Orléans	Examineur
M. François Lieutier	Professeur, Université d'Orléans	Directeur de thèse
Mme Géraldine Roux-Morabito	Maître de conférences, Université d'Orléans	Co-Encadrante

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
INTRODUCTION GENERALE: LE PROBLEME DES ESPECES INVASIVES	6
Les espèces invasives	7
Le nématode du pin	9
Méthodes de surveillance	11
Danger pour la France et l'Europe	13
Objectifs de la thèse	13
MATERIELS ET METHODES: ECHANTILLONNAGE DE <i>MONOCHAMUS</i>	16
PREMIERE PARTIE: APPROFONDISSEMENT SUR LA BIOLOGIE DE <i>M. GALLOPROVINCIALIS</i>	20
INTRODUCTION	21
Les conifères-hôtes en France	24
CHAPITRE I: Fécondité et développement larvaire de <i>Monochamus galloprovincialis</i> (Coleoptera Cerambycidae) en élevage	26
Présentation de l'article	27
Publication	29
CHAPITRE II	52
II.I Distribution géographique et arbres hôtes	52
II.II Préférences de nutrition et de ponte de <i>Monochamus galloprovincialis</i> (Coleoptera, Cerambycidae) entre ses deux principaux hôtes <i>Pinus sylvestris</i> et <i>P. pinaster</i>	57
Présentation de l'article	58
Publication	60
DEUXIEME PARTIE: SYSTEMATIQUE ET STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS DE <i>MONOCHAMUS</i> SPP.	70
INTRODUCTION	71
L'histoire de la taxonomie	71
L'ADN mitochondrial, un outil indispensable pour la taxonomie	72
L'hétéroplasmie	74
Pseudogènes	77
CHAPITRE III: Incorporation de fragments mitochondriaux dans le génome nucléaire (Numts) du longicorne <i>Monochamus galloprovincialis</i> (Coleoptera, Cerambycidae),	80
Présentation de l'article	81
Publication	83

CHAPITRE IV: Utilisation de données morphologiques et moléculaires pour la délimitation des taxons dans le complexe des espèces soeurs <i>Monochamus galloprovincialis</i> - <i>M. sutor</i> (Coleoptera Cerambycidae)	108
Présentation de l'article	109
Publication	112
SYNTHESE ET PERSPECTIVES	144
DISCUSSION GENERALE	145
Caractéristiques bio-écologique de <i>M. galloprovincialis</i>	145
Caractérisation de la variabilité génétique et morphologique des espèces de <i>Monochamus</i> et facteurs la structurant	147
CONCLUSIONS APPLIQUEES ET PERSPECTIVES	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150
ANNEXES	161
Annexe I: Campagne de piégeage et échantillonnage	162
Annexe II: Stades de pigmentation de <i>M. galloprovincialis</i>	167
Annexe III: Clés d'identification d'après Picard (1929)	168
Annexe IV: Accouplement et système reproducteur de <i>M. galloprovincialis</i>	170

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Directeur du Laboratoire de Biologie des Ligneux et de Grandes Cultures, Francis Delmotte, pour son accueil, ses nombreux conseils et son intérêt pour l'avenir des thésards.

Je remercie mon directeur de thèse, François Lieutier, à qui je suis reconnaissante pour m'avoir proposé ce sujet de recherche et pour son dynamisme et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

Je remercie tout particulièrement ma co-encadrante, Géraldine Roux-Morabito, pour m'avoir fait découvrir le monde de la génétique des populations, mais surtout pour son soutien et son amitié.

Je tiens aussi à remercier la Fondation Korialenio pour avoir financé une grande partie de cette thèse.

Je remercie les rapporteurs, Claire Villemant, Jean-Claude Grégoire, pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury Catherine Bastien, Edmundo Sousa, Jean-Luc Flot et Francis Delmotte qui ont accepté de lire et d'évaluer ce travail.

J'aimerais par ailleurs souligner la grande contribution de l'ONF et du DSF et plus particulièrement les correspondants observateurs dont l'aide sur le terrain a été irremplaçable.

J'aimerais aussi remercier Alain Roques et tous les membres de l'Unité de Zoologie Forestière de l'INRA d'Orléans pour m'avoir permis et aidé à effectuer les expériences de biologie dans les locaux de l'INRA. Je pense tout particulièrement à Jacques Garcia, Emmanuelle Magnoux, Jérôme Rousselet et Carlos Lopez-Vaamonde qui se sont impliqués directement dans la réalisation de ce travail. Merci pour le temps qu'ils m'ont consacré et leurs conseils.

Un grand merci à Pedro Naves et Edmundo Sousa pour leur merveilleux accueil au Portugal et leurs conseils pertinents sur les *Monochamus* et le problème du nématode du Pin dans leur pays. Merci surtout à Pedro d'avoir fini sa thèse avant moi car elle m'a servie de guide pour la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite remercier également Christian Stauffer, Christian Tomiczek et Ute Hoyer-Tomiczek pour m'avoir accueillie en Autriche et pour avoir partagé avec moi leurs connaissances sur le problème des pseudogènes et plus généralement sur les *Monochamus*.

Mes plus sincères remerciements vont également à tous les gens du Laboratoire de Biologie des Ligneux et de Grandes Cultures pour leur accueil chaleureux et l'excellente ambiance au sein du

laboratoire qui a fait que ces quatre années de thèse se sont déroulées dans les meilleures conditions. Je tiens à dire que j'ai passé avec eux des moments inoubliables et qu'ils auront pour toujours mon amitié en espérant que le contact ne sera pas perdu après mon départ du laboratoire. Merci alors aux chercheurs : Sabine Carpin, Barbaroux Cécile, Fanny Bankhead, Christiane Depierreux, Françoise Cheddor, Domenico Morabito, Stéphane Maury, Franck Brignolas et Jean-Claude Vala, et aux techniciens Gilles Moreau, Alain Guichard et Alain Delaunay. Je n'oublie pas non plus Christiane et Daniel Rougon qui m'ont entourée dès mes premiers moments au laboratoire et pour leurs conseils en systématique ainsi que Valérie Altemayer, Carine Martin et Xavier Pineau pour leur aide sur le terrain. Merci aussi à Aurelien Sallé et François Hericourt qui ont pris le temps de m'expliquer différentes notions en statistique et en génétique. Je remercie aussi mes deux stagiaires, Moea Labour et Sébastien Desbois, qui m'ont aidé à avancer plus vite les différentes expériences et avec lesquels j'ai passé des super moments. Je ne pourrais pas ne pas parler des thésards (Agnès Horn, Romain Monclus, Bruno Vincent, Coralie Bertheau, Marie-Véronique Gentil, Ludovic Bonhomme, Thomas Durand, Sophie Pointeau et Sylvain Chamaillard) avec lesquels j'ai pu partager tous les bons et les moins bons moments dans le laboratoire et en dehors. Sans leur aide et amitié je n'aurais pas pu arriver aux termes de cette étude.

Merci aussi à tous mes amis français et grecs qui de près ou de loin m'ont encouragée et soutenue toutes ces années de thèse. J'aimerais remercier de tout cœur le plus proche d'entre eux, Adrien Acquistapace, pour son soutien moral et sa patience pendant la dernière et plus difficile année de la thèse ainsi que ses conseils en français, mais surtout pour avoir fait de mon séjour en France une belle aventure.

Je suis également reconnaissante envers toute ma famille qui même de loin a fait en sorte que je ne me sente jamais seule. Je remercie ma sœur, Dimitra, avec qui on a pu découvrir ensemble les petits secrets de la France pendant ces quatre années. Merci aussi à mon frère, George, qui lui, malheureusement de loin, me rappelait souvent de vivre pleinement cette expérience en dehors du laboratoire.

Je ne pourrais jamais assez remercier mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée à tous les niveaux. Mon père, Athanase, qui grâce à son expérience personnelle m'a encouragée et un peu conditionnée pour faire une thèse en entomologie. Ma mère, Olga, qui a respecté et encouragé ma décision d'effectuer cette thèse à l'étranger malgré ses appréhensions. De plus je leur serai toujours reconnaissante pour m'avoir permis financièrement de réaliser cette thèse. Pour finir je voudrais leur dédier cette thèse ainsi qu'à mes grands parents en leur exprimant ma grande gratitude pour avoir toujours été à mes côtés.

INTRODUCTION GENERALE :

LE PROBLEME DES ESPECES INVASIVES

LE PROBLEME DES ESPECES INVASIVES

Les espèces invasives

L'histoire de la planète montre que des barrières naturelles comme les océans et les montagnes ont joué un rôle catalytique dans la divergence des espèces et la spéciation (Mayr, 1963). Malgré ces barrières, le mouvement des organismes peut se réaliser naturellement, après des changements environnementaux radicaux (ex. glaciations, réchauffement climatique), ou artificiellement par l'homme. Au cours des deux derniers siècles, la constante augmentation des échanges commerciaux internationaux a été responsable de la dissémination à longue distance de tous types d'organismes au-delà de leurs barrières naturelles géographiques qui jusqu'à présent limitaient leur dispersion (Evans et al., 1996; Liebhold et al., 1995; Mattson et al., 2007; Tkacz, 2002). Pour satisfaire à l'augmentation de la demande en bois de toutes catégories, la sylviculture européenne s'est profondément modifiée durant le 20^{ème} siècle. Ainsi, l'intensification de la sylviculture, la généralisation de plantations monospécifiques, le choix par inexpérience d'essences mal adaptées aux conditions mésologiques locales, et la tendance vers une rotation de plus en plus courte d'arbres susceptibles de fournir les bois d'œuvre éloignent progressivement nos forêts de leur état originel (Levieux and Cassier, 1994). L'introduction intentionnelle d'espèces forestières économiquement plus prometteuses ainsi que la création de jardins botaniques exotiques sont responsables de la forte dissémination de plusieurs espèces d'arbres dans des nouvelles régions et simultanément de l'introduction accidentelle de phytopathogènes (Liebhold et al., 1995; Macdonald and van Wilgen, 2002; Mattson et al., 2007; Roques et al., 2006; Storer et al., 1999). Ce mouvement accéléré des hommes et de leurs biens est à l'origine de la dramatique augmentation des invasions biologiques. Celles-ci peuvent aboutir à des désastres économiques et à la création d'écosystèmes instables dans les régions d'introduction, suite aux fortes interactions entre les espèces indigènes et les espèces exotiques, s'accompagnant d'un impact important sur la biodiversité locale. La majorité de ces invasions sont passées inaperçues mais quelques unes ont abouti à l'apparition de dangereux ravageurs provoquant des dommages économiques et environnementaux très importants (Liebhold et al., 1995; Niemelä and Mattson, 1996). L'impact écologique de ces ravageurs est souvent beaucoup plus important dans la région de leur introduction que dans leur région d'origine. Les insectes phytophages et les champignons phytopathogènes se retrouvent en haut de la liste des organismes non intentionnellement introduits. Ils ont la capacité de passer inaperçus et de

s'introduire dans un pays de multiples façons. Outre le matériel végétal vivant, ils peuvent être transportés par des caisses et des palettes en bois ainsi que par toutes sortes de chargements.

L'introduction d'un organisme dans un nouvel habitat ne suffit pas au succès d'une invasion. Deux autres étapes sont nécessaires : l'installation et la dispersion (Sakai et al., 2001).

Afin de réussir leur installation, les organismes accidentellement introduits dans un nouvel écosystème doivent affronter des conditions environnementales nouvelles et pas forcément appropriées à leur survie. La présence et la qualité de l'arbre hôte sont aussi des paramètres essentiels au succès de l'installation (Barbosa and Schaefer, 1997). La proximité botanique des hôtes d'origine et des nouveaux hôtes potentiels peut conditionner la résistance de ces derniers aux espèces phytophages introduites, avec des conséquences majeures sur leur propagation (Lieutier, 2006). Sakai et al. (2001) ont démontré qu'une espèce peut devenir invasive soit parce qu'elle partage des caractéristiques communes avec les espèces natives soit au contraire parce qu'elle possède des caractères différents de ces dernières (absence d'espèces compétitrices) et par conséquent peut occuper des niches écologiques vides. L'absence, dans la zone d'introduction, d'ennemis naturels de l'espèce exotique peut aussi s'avérer un avantage décisif dans la procédure d'installation. D'autre part, les dégâts résultant d'une invasion réussie peuvent influencer la vigueur des plantes indigènes à d'autres types d'attaques, tant par les espèces indigènes qu'exotiques (Lieutier, 2006).

La réussite totale d'une invasion par une espèce exotique implique toutefois, après la phase d'installation, et une fois celle-ci réussie, une phase de dispersion. Les organismes introduits peuvent être capables de se disséminer par leurs propres moyens (vol, marche) mais d'autres (champignons, bactéries, virus, nématodes etc.) nécessitent pour leur dissémination l'intervention de vecteurs qu'ils doivent trouver dans leur habitat d'introduction. Dans de tels cas, les perspectives de lutte contre les espèces introduites impliquent donc la compréhension de la biologie, de l'écologie et du mode de déplacement des vecteurs. Les insectes xylophages jouent un rôle considérable tant comme espèces invasives que comme vecteurs de pathogènes invasifs (Liebhold et al., 1995; Macdonald and van Wilgen, 2002; Storer et al., 1999). Ainsi l'introduction et l'installation des capricornes asiatiques *Anoplophora chinensis* (Forster) et *A. glabripennis* (Motschulsky) en Amérique du Nord et en Europe est à l'origine de dégâts considérables principalement sur les érables mais aussi sur d'autres arbres forestiers et ornementaux (Cocquempot, 2006; Macdonald and van Wilgen, 2002). De nombreux exemples de vecteurs sont connus : les prédateurs de cônes *Orsillus maculatus* et

Megastigmus wachli qui disséminent au cyprès, *Cupressus sempervirens*, l'agressive maladie "cypress canker disease" (*Seiridium cardinale*) à l'origine de la Californie et introduit en Europe et en Afrique (Battisti et al. 1999) ; les coléoptères Nitidulidae et les scolytes du genre *Pseudopityophthorus* sp. qui disséminent le champignon du dépérissement du chêne, *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) en Amérique du Nord; les scolytes du genre *Scolytus* spp. vecteurs de la graphiose de l'orme provoquée par *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier); l'exemple de la maladie « pitch cancer » provoquée par le champignon pathogène, *Fusarium subglutinans* (Wollenweb and Reinking), qui attaque le pin de Monterey (*Pinus radiata*, D.Don) et a été associé à plusieurs coléoptères vecteurs comme les scolytes du genre *Ips* spp., les *Pityophthorus* spp., le *Conophthorus radiate* (Hopkins) et « l'horloge de la mort » *Ernobius punctulatus* (Fall) (Liebhold et al., 1995; Macdonald and van Wilgen, 2002; Storer et al., 1999). Plusieurs espèces d'insectes sont associées à la transmission de nématodes aux plantes, comme les coléoptères de la famille *Nitidulidae* qui transportent des nématodes du genre *Bursaphelenchus* sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) (Giblin et al. 1985) et les scolytes *Pityokteines* spp. associés à *Bursaphelenchus abientinus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae) (Braasch and Schmutzenhofer et al. 2000).

Le nématode du pin

Ce travail de thèse fait partie d'une étude générale consacrée à l'espèce invasive *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner 1934; Nickle 1970) (Nematoda: Aphelenchoididae) récemment introduite accidentellement au Portugal. Initialement originaire d'Amérique du Nord, l'espèce a d'abord été introduite au Japon au début du 20^{ème} siècle, puis a envahi l'Est de la Chine et la Corée, et cause des dommages considérables dans toutes les forêts de pins de ces régions (Evans et al., 1996). La contamination des peuplements de *Pinus pinaster* au Sud de Lisbonne a été mise en évidence en 1999 (Mota et al., 1999). Depuis cette date, les dégâts dans la zone d'infestation ont été très importants et se chiffraient à 617000 ha en 2005 (Naves, 2007). Ce nématode est associé aux longicornes du genre *Monochamus* sp. (Coleoptera Cerambycidae) qui jouent le rôle de vecteurs indispensables à la dissémination du nématode.

L'introduction du nématode dans l'arbre cause un rapide dépérissement conduisant à sa mort, maladie connue sous le nom de « Pine Wilt Disease (PWD) ». La maladie n'est pas visible au début de la présence du nématode et les symptômes se manifestent soudainement (environ 40 jours après l'infestation) par un jaunissement des pousses (Figure 1), le développement de champignon du bleuissement du bois et la mort de l'arbre (60 jours après

l'infestation) (Mamiya, 1984; Naves, 2007). Le nématode pénètre dans les canaux résinifères et se nourrit du parenchyme et des cellules de l'épithélium. Par conséquent le flux de résine diminue peu à peu puis cesse complètement. La destruction des cellules épithéliales provoque la cavitation des trachéides qui aboutit à l'arrêt du flux d'eau provoquant une très forte diminution de la transpiration et le jaunissement des aiguilles. Ces symptômes ne sont pas spécifiques de la PWD puisque d'autres facteurs peuvent avoir des effets similaires sur l'arbre (Naves, 2007). L'identification du pathogène ne peut donc s'effectuer qu'au laboratoire après extraction du nématode à partir du bois contaminé.



Figure 1. Arbres infestés par le nématode du pin au Portugal. Abattage de ces arbres en hiver (photos de l'auteur).

Le genre *Bursaphelenchus* contient 75 espèces dont la majorité vit dans l'hémisphère Nord (Ryss et al., 2005). La plupart de ces espèces se nourrissent exclusivement des champignons qu'ils trouvent dans les galeries de scolytes. La taxonomie de l'espèce *B. xylophilus* reste très controversée du fait de l'existence d'espèces très proches morphologiquement et en termes d'écologie qui rendent l'identification très difficile. *B. mucronatus* (Mamiya and Enda, 1979) est l'espèce la plus proche qui diffère morphologiquement de *B. xylophilus* par la présence d'un mucron à l'extrémité postérieure de la femelle. Malgré sa plus large distribution naturelle, *B. mucronatus* a une biologie similaire à celle de *B. xylophilus* et est transmis par les mêmes insectes (Jikumaru and Togashi, 2001;

Mamiya, 1984). La séparation des deux espèces nécessite l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire (Abad et al., 1991; Beckenbach et al., 1992; Webster et al., 1990).

B. xylophilus est caractérisé par quatre stades larvaires (Mamiya, 1984) et son cycle biologique peut se compléter en quatre ou cinq jours à 25°C. Sa capacité d'infestation dans des conditions favorables est donc très importante. Les larves du troisième stade présentent des lipides de réserve stockés sous forme de gouttelettes au niveau de l'intestin ce qui leur permet de faire face à des conditions défavorables rencontrées par exemple au cours de l'hiver. Au printemps elles se rassemblent autour de la chambre nymphale des *Monochamus* où elles atteignent le quatrième stade larvaire connu sous le nom de « juveniles dauer » (« larves de durée »). Ce stade ne se nourrit pas et va contaminer les jeunes adultes du vecteur juste après leur mue imaginale, en rentrant dans leur système trachéen par les spiracles. Ceci représente la phase de dispersion du nématode (Mamiya, 1984).

En Amérique du Nord, les dégâts provoqués par ce pathogène sont très réduits puisque, dans cette région, la longue coexistence du nématode et des diverses essences de pin, a conduit ces dernières à développer des mécanismes efficaces de résistance (Evans et al., 1996; Mamiya, 1984). En revanche, l'introduction du nématode en Asie, puis au Portugal, dans des régions où les deux types d'organismes n'avaient jamais été en contact, a conduit à des dommages considérables dans les forêts de pins (Evans et al., 1996; Mamiya, 1984; Takasu et al., 2000). Le transport de bois infesté semble l'hypothèse la plus plausible concernant l'introduction du nématode sur de nouveaux continents. Une fois introduit, l'existence simultanée d'hôtes sensibles (*P. densiflora*, *P. kesiya*, *P. koraiensis*, *P. luchuensis* et *P. thunbergii*), de conditions bioclimatiques favorables (température moyenne annuelle au dessus de 12°C associée à des périodes très sèches) et de vecteurs locaux adéquats, conduit rapidement à un développement épidémique (Evans et al., 1996; Mamiya, 1984; Takasu et al., 2000). *B. xylophilus* est considéré comme un des plus important ravageur forestier en Asie (Mamiya, 1984).

Méthodes de surveillance

Suite à la découverte du nématode dans les forêts de pin maritime du sud de Lisbonne, le gouvernement portugais a mis en place une politique d'éradication avec le « Programa Nacional de Luta contra o Nemátodo da Madeira do Pinheiro » (PROLUNP). Nous avons eu l'occasion de visiter la zone contaminée en 2005 et d'observer les dégâts ainsi que les efforts réalisés pour contrôler le problème. Située autour de la ville de Setubal, la zone contaminée couvre environ 350 000 ha bordés à l'ouest par l'océan Atlantique. L'essence principale est le

pin maritime, le pin pignon et le pin d'Alep étant beaucoup plus faiblement représentés. Ces boisements résineux sont entrecoupés de zones de cultures agricoles, de boisements de chêne vert purs ou mélangés avec des résineux et de vastes surfaces occupées par la culture du chêne-liège. Dans la zone contaminée, tous les résineux morts, mourants ou présentant des signes de dépérissement (arbres symptomatiques) sont systématiquement abattus. Dans le reste du pays, les arbres symptomatiques font l'objet d'une attention particulière. Les déchets, notamment les branches, sont généralement brûlés sur place (Figure 2) ou, en raison du risque d'incendie, emportés sur un autre site, ce qui augmente la complexité du chantier. Les arbres abattus qui ne sont pas brûlés sur place sont évacués dans les meilleurs délais vers une unité de fabrication de copeaux (Figure 2) et fumigés par du phosphore d'hydrogène en plein air sous une bâche en plastique. Les arbres abattus peuvent être aussi utilisés par une scierie située dans la zone d'infestation. Les arbres sont alors écorcés puis débités en planches qui sont ensuite traitées à la chaleur (56° C pendant 30 mn). Le combustible nécessaire au traitement thermique provient des débris végétaux (écorces, sciures, copeaux) des arbres abattus.

La lutte contre la maladie se poursuit durant l'été (période de vol du vecteur) mais avec de moins bons résultats. Les adultes de *Monochamus* sont attirés par les odeurs émises par les arbres abattus puis sont capturés et éliminés. Des pièges attractifs contenant différents composés phéromonaux d'*Ips* spp. et des volatiles d'odeur de pin (turpénine, éthanol et monoterpènes comme l' α -pinène) sont aussi installés en forêt.



Figure 2. Elimination par le feu (à gauche) des branches des arbres présentant des symptômes ou par broyage en copeaux (à droite). (Photos de l'auteur)

Des insecticides, comme le fenitrothion, le fenthion, la diazinone et le carbaryl ont été largement utilisés au Japon et dans les autres pays d'Asie mais leur application est limitée aux

cas exceptionnels à cause de leur impact sur l'environnement (Togashi, 1990b). Enfin l'alternative de la lutte biologique a été testée par l'introduction de prédateurs des vecteurs comme *Dastarcus helophoroides* (Fairmaire) (Coleoptera Bothrideridae) (Miura et al., 2003; Urano, 2004), de parasites comme les guêpes *Ontsira palliatus* (Cameron) (Braconidae) (Wang, 1988) et *Scleroderma guani* (Bethyilidae) (Xiao and Wu) (Shihan et al., 1995) ou le champignon pathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) (Shimazu et al., 1999) avec des résultats cependant peu prometteurs.

Danger pour la France et l'Europe

A ce jour, sept espèces de *Monochamus* sont connues comme vectrices du nématode du Pin : *M. carolinensis* (Olivier, 1975), *M. mutator* (LeConte,), *M. scutellatus* (Say, 1824) et *M. titillator* (Fabricius) en Amérique du Nord, *M. alternatus* (Hope, 1842), *M. saltuarius* (Gebler, 1830) en Asie de l'Est et *M. galloprovincialis* (Olivier, 1795) en Europe (Akbulut and Linit, 1999; Evans et al., 1996; Jikumaru and Togashi, 1995; Kiyohara and Tokushige, 1971; Mamiya, 1988; Mamiya and Enda, 1972).

En 1993 un projet de surveillance, le Pest Risk Analyses (PRA), étendu à l'ensemble des territoires de l'Union Européenne, a démontré qu'il existait cinq espèces endémiques de *Monochamus* (i.e. *M. galloprovincialis*, *M. sutor* (Linnaeus, 1758), *M. sartor* (Fabricius, 1787), *M. urussovi* (Fischer, 1806) et *M. saltuarius*) vectrices potentielles du nématode du pin (Evans et al., 1996). De plus, plusieurs essences de pins fréquemment retrouvées en Europe ont été considérées comme susceptibles à la maladie (Evans et al., 1996). Suite à cette étude, *B. xylophilus* a été classé parmi les organismes de quarantaine pour l'Union Européenne (OEPP/EPPD directive 77/93, EEC, Evans et al. 1996). Cette décision a entraîné la prise de mesures préventives, en particulier pour les importations de bois ronds. Cependant, depuis la découverte du nématode au Portugal en 1999 et la démonstration de son association avec *M. galloprovincialis* sur *Pinus pinaster* (Sousa et al., 2001), le problème de la PWD est devenu une question très sensible pour les Etats Membres.

La situation géographique de la France lui confère une position stratégique dans la surveillance d'une éventuelle dissémination du nématode en Europe via les Pyrénées. Par ailleurs, la France et l'Europe ne sont pas non plus à l'abri d'une nouvelle introduction maritime accidentelle. De plus, la présence d'espèces de Pins sensibles dans de nombreuses régions françaises, d'insectes du genre *Monochamus* dans toutes les forêts de conifères et la similarité bioclimatique au moins du sud de la France avec le Portugal constituent un

ensemble de facteurs qui place les risques de dégâts à un très haut niveau dans le cas où une introduction du nématode aurait lieu.

Objectifs de la thèse

L'objectif général est de donner les connaissances biologiques relatives à l'insecte et nécessaires pour la construction d'un modèle de surveillance d'une éventuelle invasion du nématode en France ainsi qu'un modèle de gestion des populations du vecteur. La thèse de Vincent (2007), effectuée en parallèle avec ma thèse, s'intéresse plutôt aux paramètres liés à l'installation du nématode. Ma contribution concerne les paramètres des insectes vecteurs qui sont reliées à la dispersion du nématode. Il convient de noter que la situation est originale par rapport à la plupart de cas de pathogènes invasifs transportés par des insectes vecteurs, dans la mesure où les vecteurs potentiels sont déjà en place, avant même l'introduction du pathogène. L'étude porte donc sur les longicornes du genre *Monochamus*, présents en France et vecteurs potentiels du nématode du pin.

Le genre *Monochamus* (Coleoptera Cerambycidae), avec ses 150 espèces connues à ce jour, est réparti sur tous les continents à l'exception de l'Amérique du Sud. Trois de ces espèces existent en France : *M. galloprovincialis* avec deux sous-espèces, *M. g. galloprovincialis* (Olivier, 1795) et *M. g. pistor* (Germar, 1818), *M. sutor* avec deux sous-espèces, *M. s. sutor* (Linnaeus 1758) and *M. s. pellio* (Germar, 1818), et *M. sartor* (Bense, 1995; Hellrigl, 1971; Sama, 2002; Villiers, 1978). Au Portugal l'espèce qui véhicule le nématode et l'inocule aux pins est *M. galloprovincialis*.

Peu de documents sont actuellement disponibles sur les espèces européennes du genre *Monochamus*. En effet ces xylophages, ravageurs secondaires d'arbres déjà affaiblis, étaient considérés comme peu nuisibles (Hellrigl, 1971). Des travaux sur la biologie et l'écologie des populations de *Monochamus* du Nord de l'Europe (Hellrigl, 1971; Tomminen, 1993) ainsi qu'une étude sur quelques individus en Italie (Francardi and Pennacchio, 1996) ont été publiés. Cependant, depuis la démonstration de l'association des *Monochamus* avec le nématode du pin, plusieurs publications sur les espèces asiatiques de *Monochamus* sont disponibles (Anbutsu and Togashi, 1997; Anbutsu and Togashi, 2001; Jikumaru et al., 1994; Togashi, 1990d; Togashi, 1991a; Togashi, 1991b; Togashi, 1995; Togashi, 1997; Togashi et al., 2005; Togashi et al., 1994; Togashi and Magira, 1981). En Europe, l'étude du problème a commencé principalement après l'introduction du pathogène au Portugal, avec les travaux de Naves et de Sousa sur la biologie et l'écologie des populations de *M. galloprovincialis* au Portugal et ses relations avec le nématode (Naves, 2007; Naves et al., 2005; Naves et al.,

2006a; Naves et al., 2006b; Sousa et al., 2001) et de Cesari (2005) sur la phylogénie des espèces européennes. A ce jour aucune étude n'a été publiée en France sur ces xylophages.

Pour approfondir nos connaissances sur les *Monochamus* français, il a fallu tout d'abord résoudre des problèmes d'identification taxonomique des différents individus de *Monochamus* échantillonnés. Effectivement, les données de la littérature s'avèrent souvent insuffisantes pour la délimitation des différentes espèces françaises de *Monochamus* surtout à des stades immatures. Il est donc nécessaire d'avoir des marqueurs taxonomiques, fiables et accessibles à tous, pour poursuivre des expériences sur ces espèces.

Une fois les spécimens identifiés, un élevage au laboratoire pour l'espèce *M. galloprovincialis* a été mis en place, en respectant au maximum les conditions naturelles de développement (région de Lorris) et a permis d'étudier en profondeur son cycle biologique en France. Le but était de comparer les populations françaises de cette espèce avec celles présentes au Portugal et essayer d'estimer ainsi l'éventuelle successibilité des populations françaises à la véhiculation et dissémination du nématode. Ensuite, des expériences de préférence d'hôte au laboratoire ont été réalisées pour les deux essences de pins les plus répandues en Europe, *P. sylvestris* et *P. pinaster* (FAO,2007). Parallèlement à cette étude en laboratoire une campagne de piégeage a été réalisée en France pour étudier la biologie et la distribution des populations naturelles des espèces de *Monochamus*.

Cette thèse est rédigée en s'appuyant sur quatre articles en anglais, précédés d'un résumé en français, l'ordre de ces articles ne reflétant pas la chronologie des expériences.

La première partie du manuscrit concerne la biologie et l'écologie du genre *Monochamus* en France. En raison de la vaste répartition européenne de *M. galloprovincialis* et de son rôle de vecteur au Portugal, les études se sont focalisées sur cette espèce. Le premier chapitre de cette partie (Chapitre I) est consacré à la biologie de cette espèce (1^{er} article). Le deuxième chapitre (Chapitre II) présente les résultats du piégeage et les expériences de préférence d'hôte réalisées au laboratoire (2^{ème} article).

La deuxième partie du manuscrit présente la variabilité génétique et morphologique des espèces de *Monochamus* et les facteurs la structurant. Le premier chapitre (Chapitre III) met en évidence les ambiguïtés présentes sur les séquences mitochondriales, utilisées lors de l'étude de variabilité génétique en identifiant leur nature et origine, nécessaire à la poursuite de l'étude (3^{ème} article). Le deuxième chapitre (Chapitre IV), présente, tout d'abord, la délimitation des deux espèces de *Monochamus* les plus communes en France, *M. galloprovincialis* et *M. sutor* ainsi que leurs formes associées respectives, *M. g. galloprovincialis* - *M. g. pistos* et *M. s. sutor* - *M. s. pellio*. Pour identifier assez rapidement

les deux espèces, lors d'un échantillonnage, il était très important de trouver des caractères fiables. Des caractères de morphologie externe ont été combinés avec des marqueurs moléculaires afin de confirmer leur validité et leur importance taxonomique. Les relations évolutives entre ces taxons sont discutées. Ensuite, une étude phylogéographique préliminaire de *M. galloprovincialis* et, à un moindre degré, celle de *M. sutor*, ont été réalisées dans le but de préciser les relations évolutives de ces espèces en Europe (4^{ème} article).

Le manuscrit se finalise avec des conclusions générales et des perspectives suivies par des références bibliographiques pour la totalité du manuscrit (les articles inclus) et des annexes.

MATERIELS ET METHODES :

ECHANTILLONNAGE DE *MONOCHAMUS*

ECHANTILLONNAGE DE *MONOCHAMUS*

Tous les chapitres de la thèse, excepté le paragraphe concernant les résultats du piégeage, sont rédigés sous forme d'articles. Ils présentent donc chacun une partie « matériels et méthodes » propre.

Cependant, je présente ici la campagne de piégeage, effectuée pendant deux ans (2003 et 2004) en France avec l'aide du Département de la Santé des Forêts (DSF) et de ses correspondants observateurs, parce qu'elle est à l'origine de l'échantillonnage utilisé dans les différentes études. Cet échantillonnage a permis en effet de préciser la distribution géographique et le spectre d'essences hôtes de *M. galloprovincialis* ; il a contribué à l'étude du cycle biologique, ainsi qu'aux expériences de choix réalisées en laboratoire. De plus la totalité des insectes échantillonnés grâce à ce dispositif a été utilisée pour évaluer la variabilité morphologique et génétique au sein des populations. L'objectif alors à cette étape de l'étude était tout d'abord de collecter le maximum d'individus, sur le plus d'espèces d'arbres hôtes et de localités possibles pour satisfaire les exigences des expériences détaillées au dessus. Le deuxième objectif était d'évaluer la présence des différentes espèces de *Monochamus* en France en termes quantitatives (nombre d'individus) et qualitatives (sur quels espèces d'hôtes et quelles localités géographiques).

Deux campagnes de piégeage ont été conduites, l'une durant l'été 2003 (préliminaire), l'autre durant l'été 2004, plus complète et tenant compte des améliorations suggérées par les résultats de l'année précédente.

Différents sites répartis sur tout le territoire français, à des altitudes variées (de 0 à 1100 m en 2003 ; 0 à 1400 m en 2004) et dans des peuplements de diverses espèces de conifères-hôtes, ont été choisis pour récolter différentes espèces du genre *Monochamus*, en se basant sur les hôtes préférentiels et les distributions géographiques des insectes indiqués dans la littérature. Ainsi, différentes espèces de pin ont été privilégiées dans les peuplements de plaine (présence de *M. galloprovincialis*), des pins et/ou épicéas dans les peuplements de basse altitude et seulement des épicéas dans les peuplements de moyenne ou haute altitude (présence majoritaire de *M. sutor*). Les peuplements ouverts et bien ensoleillés présentant des arbres affaiblis, des coupes récentes et/ou des chablis ont été privilégiés, lorsque cela était possible (Annexe I.I et I.IV).

Au total, 150 pièges multidirectionnels attractifs à interception en croix (Figure 3) ont été installés sur 40 sites en France (Figure 4). Six à neuf stations (ou massifs forestiers) ont été choisies dans chacune inter-région du DSF et trois ou quatre pièges ont été installés et suivis par un correspondant observateur du DSF dans chaque station.

Le principe de ces pièges est le suivant : les insectes volants sont attirés par un attractif disposé au milieu du piège. Ce faisant, ils heurtent les plaques de plexiglas transparentes et tombent alors dans l'entonnoir puis dans le flacon collecteur (Figure 3). Une plaquette insecticide a été ajoutée dans le flacon collecteur et renouvelée toutes les quatre semaines. Le choix d'une plaquette insecticide plutôt que d'un mouillant a été justifié par la nécessité de conserver les insectes dans un état permettant les analyses ultérieures de biologie moléculaire. Plus d'informations sur les différentes parties du piège et son montage sont données dans l'Annexe I.II.

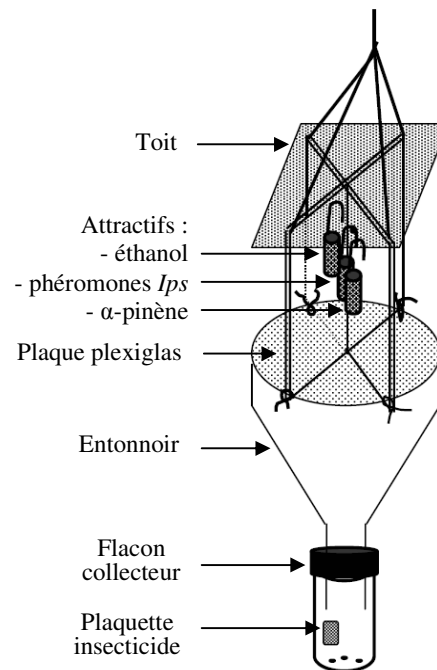


Figure 3. Caractéristiques du piège utilisé pour les captures des *Monochamus* en France. (Photo de l'auteur)

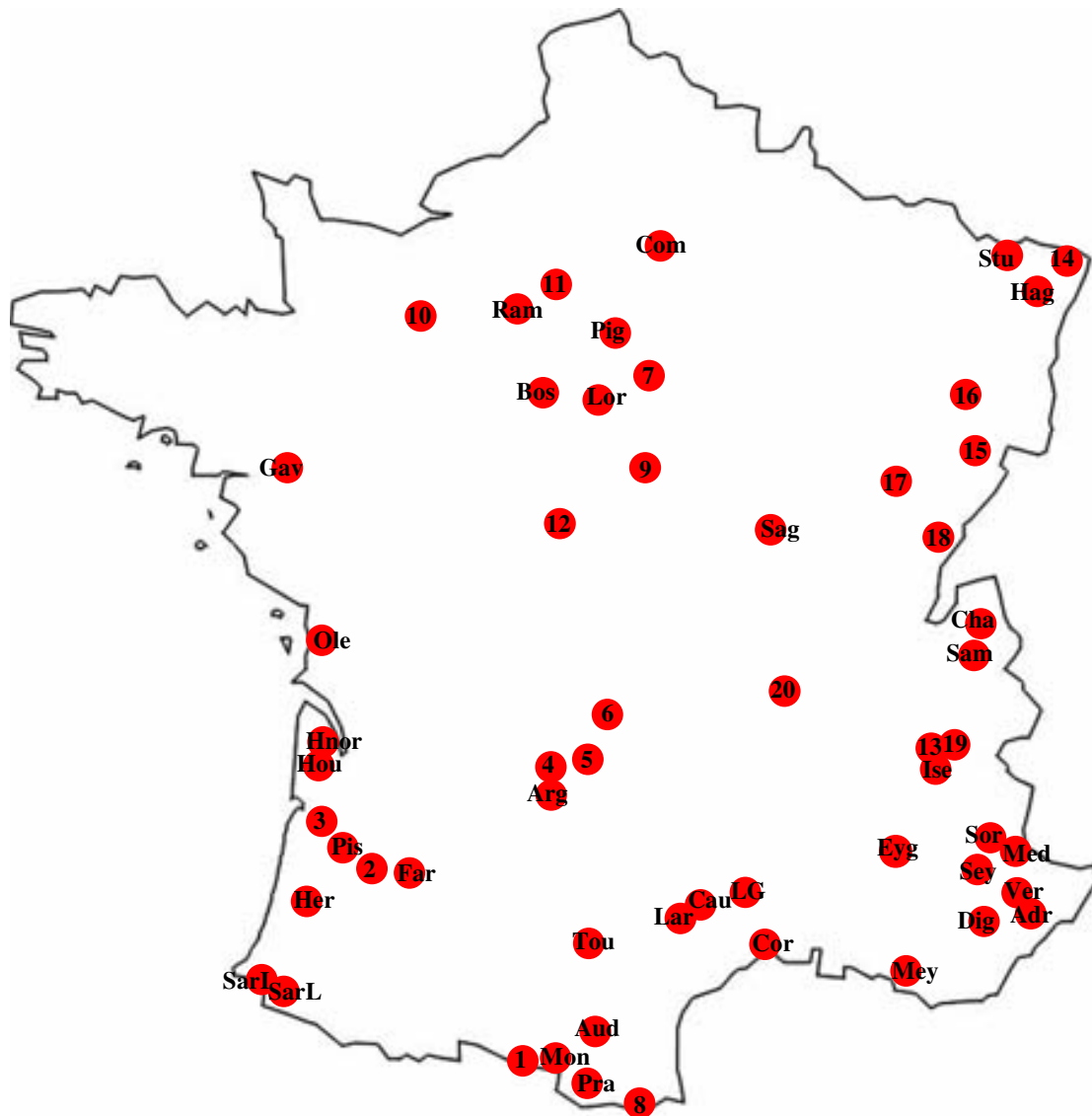


Figure 4. Totalité de sites (56 sites) où les pièges à *Monochamus* ont été installés (2003-2004) et de sites où la chasse à vue a eu lieu. Les sites où il n'a pas eu de captures sont indiqués avec des numéros (plus d'informations annexes I.IV) pour les autres voir tableau 2 chapitre II.

En 2003, l'attractif utilisé a été un mélange de 50% d'éthanol et de 50% d'essence de térébenthine. Un microtube de 2 ml contenant des copeaux de pins imprégnés d'attractif était accroché aux pièges.

Ces pièges ont été disposés durant la première quinzaine du mois de mai en les espaçant les uns des autres de cinquante à cent mètres. Ils ont été suspendus à une branche dans le houppier, à un minimum de 5-6 mètres de hauteur (Annexe I.I). Les récoltes ont été effectuées tous les quinze jours à partir de cette date jusqu'au 15 septembre (c'est-à-dire pendant la période de vol de *M. galloprovincialis*). Chaque correspondant observateur récoltait dans un tube la totalité des insectes par piège et nous les transmettait. Une étiquette

portant la date de la récolte, le numéro de piège et le nom du correspondant observateur suivait chaque envoi. Avec le premier envoi, une fiche contenant des précisions sur la localisation exacte des pièges (fiche d'observation DSF, coordonnées GPS ou autres, voir Annexe I.III) et une carte grossière de leur répartition dans le peuplement, mentionnant l'essence de pin majoritaire, ont été également envoyées par le correspondant observateur. Les coléoptères ont été identifiés au laboratoire jusqu'à la famille et les Cérambycides ont été identifiés jusqu'à l'espèce. Les autres ordres d'insectes ont été conservés pour analyses ultérieures. Les *Monochamus* ont été immédiatement séparés et conservés à -80°C.

En 2004, le choix du site de piégeage a été amélioré. Les sites qui avaient capturé des *Monochamus* en 2003 ont été conservés. Dans les autres sites, il a été demandé aux correspondants observateurs de déplacer les pièges dans des peuplements voisins. Cent trente deux pièges ont été installés sur 33 sites, début Avril pour les régions du Sud-Ouest, mi avril pour les autres régions. Après comparaison avec des dispositifs mis en place en Espagne notamment, ils ont été disposés à hauteur d'homme, sur une corde tendue entre deux arbres ou suspendus à une branche (Annexe I.I). La fréquence des récoltes a été la même qu'en 2003. La modification la plus importante par rapport à 2003 a été le remplacement de l'attractif (Figure 3). Chaque piège était équipé de deux tubes : l'un contenant 5ml d'éthanol 95% et le deuxième 5ml d' α -pinène, attractif mis en place par Ibeas et al. (2007). De plus, dans les trois quarts des pièges, un mélange de phéromones de scolytes du genre *Ips* a été utilisé. Il était constitué de 80 mg/ml d'ipsénol et 40mg/ml d'ipsdienol, à proportion égale des deux isomères optiques + et - dans chaque cas. Ces phéromones étaient conditionnées sous la forme de capsules (« bubble cap ») préfabriquées par la société Phero Tech Inc (Delta, Colombie Britannique, Canada) et permettant une diffusion de 0,2 mg/jour pour l'ipsénol et 0,1 mg/jour pour l'ipsdienol à 25°C. Soixante dix pièges ont été équipés de ce mélange en capsules tandis que 30 autres ont été équipés de ce même mélange de phéromones mais conditionné en tubes eppendorf.

En plus des pièges, des arbres ont été abattus au mois de juin pour servir d'attractif naturel, et laissés sur place tout l'hiver. Ils ont été mis en éclosiers au laboratoire au printemps suivant. Les insectes émergents ont été récupérés en été pour être utilisés dans toutes les expériences de la thèse.

PREMIERE PARTIE :

APPROFONDISSEMENT SUR LA BIOLOGIE DE *M. GALLOPROVINCIALIS*

INTRODUCTION

Les espèces du genre *Monochamus* appartiennent à l'ordre des Coleoptera, famille des Cerambycidae, sous famille des Laminae et tribue des Monochamini (LeConte, 1873). Il s'agit d'une tribu cosmopolite, comptant de très nombreux genres (Dillon and Dillon, 1941). Les Cérambycidés sont aussi connus sous le nom de longicornes grâce à leurs impressionnantes antennes qui souvent dépassent largement la longueur de leur corps.

La plupart des espèces de Cerambycidae vivent dans le bois mort. Les *Monochamus* appartiennent aux espèces lignivores de cette famille et exigent exclusivement du bois mort récemment. Par conséquent, ils ne pondent généralement pas dans la branche où ils se sont développés. La biologie et l'écologie des espèces de *Monochamus* en Europe sont proches de celles des espèces de ce genre retrouvées en Amérique du Nord et en Asie (Akbulut et al., 2004; Hellrigl, 1971; Togashi, 1990d; Villiers, 1978) (Figure 5).

Le temps nécessaire à l'éclosion des œufs varie selon les différentes espèces. Les larves de *Monochamus* comme la plupart des larves de Cerambycidae (ex. *Icosium*, *Deilus*, *Acanthoderes*) creusent des galeries entre l'écorce et l'aubier et vers la fin de leur développement s'enfoncent dans le bois pour y établir leur loge nymphale. La longueur des galeries larvaires est conditionnée par les besoins alimentaires de la larve. En effet on peut dire que celle-ci « mange son chemin » puisqu'elle se nourrit en creusant sa galerie qui augmente en diamètre proportionnellement à la croissance de la larve. Les galeries sont par endroits obstruées par les débris et les excréments rejetés par la larve. Les *Monochamus* figurent dans le groupe de Cerambycidae qui ne sécrète pas de cellulase (enzyme cellulolytique) et cependant se développe aux dépens du liber des arbres. Dans le bois, la loge nymphale se trouve à l'extrémité de la galerie larvaire; elle est constituée par un élargissement de celle-ci et est obturée par des débris de bois agglutinés. Les larves vivant en plein bois se rapprochent de la surface facilitant ainsi l'émergence de l'adulte. Le trou de sortie par où

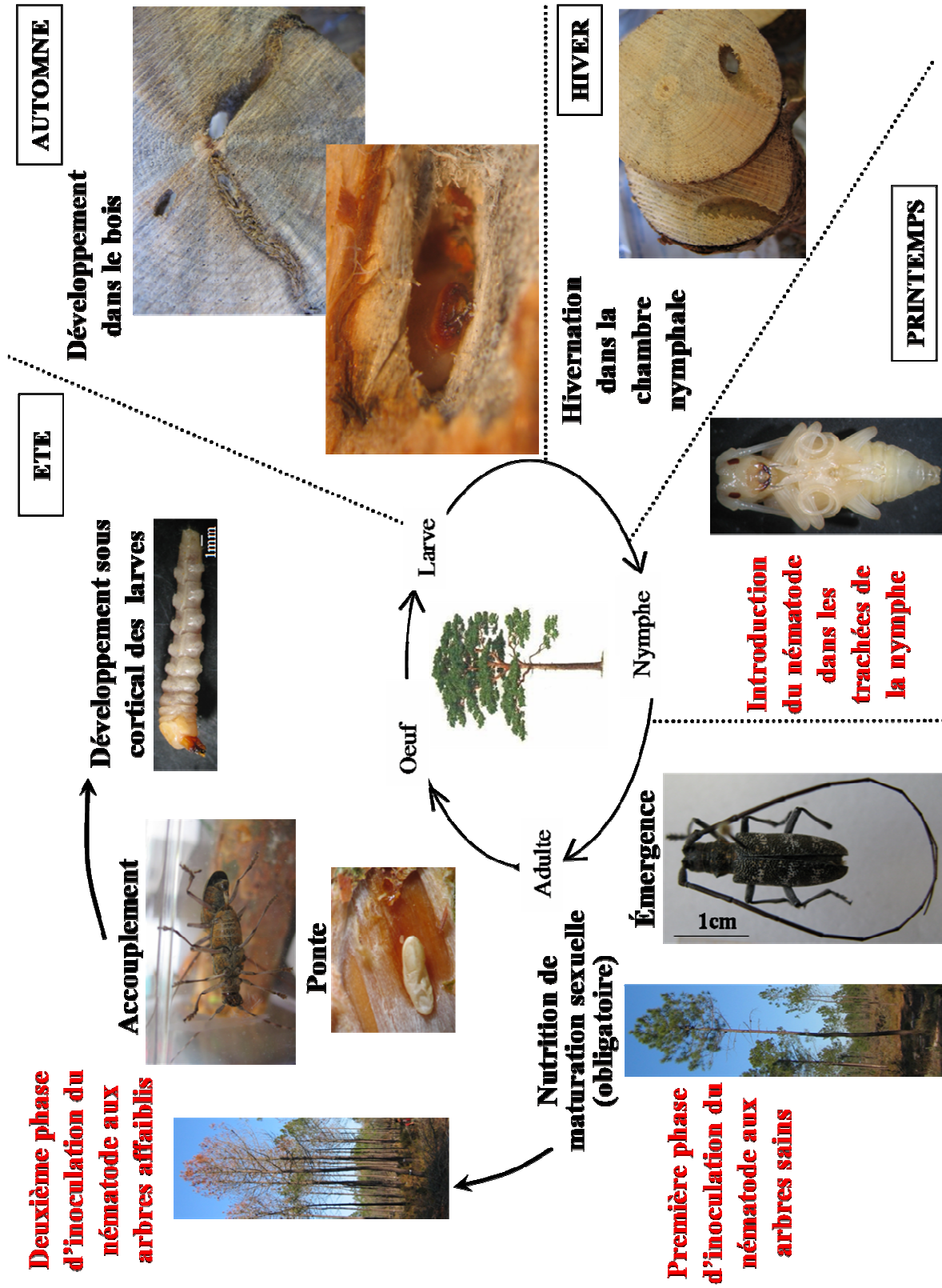


Figure 5. Cycle biologique de *M. galloprovincialis*. (Photos de l'auteur)

émergera l'adulte est fait par l'adulte même et est parfaitement rond. Il faut au moins 24 heures pour que l'adulte soit complètement pigmenté et au moins une semaine avant qu'il entreprenne de ronger avec ses mandibules la cloison qui le sépare de l'air libre et quitte ainsi la loge nymphale (Annexe II.I). La vie des adultes est essentiellement consacrée à la fonction de reproduction. De façon presque constante, les mâles apparaissent avant les femelles. Suite à leur émergence, les adultes effectuent une première nutrition sur les jeunes pousses des pins sains en consommant les aiguilles, les cônes verts et l'écorce des rameaux. Cette nutrition se poursuit pendant 8 à 20 jours selon l'espèce et est obligatoire pour la maturation sexuelle des adultes. Les adultes sexuellement matures vont chercher des arbres hôtes adéquats pour la ponte (arbres affaiblis ou morts récemment) mais ils continuent à se nourrir en grignotant l'écorce des branches. Cette double activité des adultes *Monochamus* les oblige à chercher des hôtes convenables et contribue ainsi à la dispersion de l'espèce.

Chez l'espèce asiatique *M. alternatus*, l'existence de phéromones sexuelles a été démontrée (Fauziah et al., 1987; Kim et al., 1992). Au contraire, aucune phéromone n'a été découverte chez l'espèce d'Amérique du Nord *M. carolinensis* (Edwards and Linit, 1991; Linit, 1988). Il n'existe toujours pas d'étude à ce sujet pour les espèces européennes. Le rapprochement des sexes se fait grâce à leur attirance égale par les émissions des arbres affaiblis ou dépérissant surtout après une attaque de scolytes dont les phéromones attirent apparemment les *Monochamus* (Allison et al., 2001; Ibeas et al., 2007; Miller and Asaro, 2005; Morewood et al., 2003; Pajares et al., 2004). La reconnaissance des femelles par les mâles s'effectue par l'intermédiaire des organes sensoriels des antennes. Lorsque leur antennes sont entrées en contact, le couple se forme (Hellrigl, 1971; Villiers, 1978).

La ponte consiste, pour la femelle, à rechercher le végétal nécessaire à la nourriture de ses larves, un emplacement pour déposer ses œufs et enfin à l'émission de ceux-ci. La femelle se sert de ses mandibules pour préparer le trou dans lequel elle introduit son œuf. Elle émet une substance gélatineuse afin d'obstruer le trou où l'œuf a été déposé. Cette substance sert à protéger l'œuf des champignons et à prévenir les autres femelles de son existence (Anbutsu and Togashi, 1996; Anbutsu and Togashi, 1997; Anbutsu and Togashi, 2000; Anbutsu and Togashi, 2001; Anbutsu and Togashi, 2002). Ainsi son rôle est très important d'autant plus que des phénomènes de cannibalisme sont connus chez les *Monochamus* (Naves, 2007; Togashi, 1990d).

Les conifères-hôtes en France

En Europe, la surface occupée par les pins est de 10 Mha, avec des essences jouant un rôle capital dans l'économie de la filière bois. La forêt française atteint aujourd'hui 15,5 Mha portant le taux de boisement à 28,1 % du territoire. Elle est très diversifiée avec 136 essences représentées par 76 espèces de feuillus et 60 de résineux. La France est le troisième pays forestier d'Europe en surface derrière la Suède (27,5 Mha) et la Finlande (22,5 Mha) (source : Service Central des Enquêtes et Etudes Statistiques, 2003). D'après les données de FAO (Food and Agriculture Organization), en 2007, les résineux occupaient 4,3 Mha (29,8 % des bois) en France avec un taux de variation annuel de 0,1 %. Les espèces hôtes essentiellement attaquées par *Monochamus* en France sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Surfaces occupées par les essences de pins majoritairement attaquées par les *Monochamus* en France (source : FAO, 2007).

	milliers ha	%
<i>P. pinaster</i>	1400	9,8
<i>P. sylvestris</i>	1100	8
<i>P. nigra</i>	347	2,5
<i>P. halepensis</i>	254	1,8
<i>Picea</i>	718	5,1

Les longicornes, presque tous ailés, peuvent aisément se répandre et agrandir leur aire de dispersion. C'est ainsi que les espèces ayant des conifères comme plante hôte et qui étaient jusqu'à des époques récentes reléguées dans les montagnes se sont considérablement répandues en plaine, et jusque dans le Nord et l'Ouest de la France à la faveur des plantations de conifères établies dans ces régions (Villiers, 1978). C'est le cas des *Asemum*, *Arhopalus*, *Tetropium*, *Acanthocinus*, *Rhagium inquisitor*, *Acmaeops marginata* et plein d'autres. C'est aussi le cas de certaines espèces des pinèdes méditerranéennes telles que *Eupogonocherus caroli* et *Monochamus galloprovincialis* (Villiers, 1978). La capacité de vol a été définie pour l'espèce asiatique de *Monochamus*, *M. alternatus*, de 7,1 à 37,6 m pendant la période de nutrition de maturation sexuelle; pendant la totalité de leur vie (à peu près 7 semaines) ils peuvent se disperser de 50 à 260 m (Togashi, 1990a; Togashi, 1990c).

Les Cerambycidae sont rarement strictement inféodés à un végétal et un grand nombre d'entre eux sont susceptibles d'attaquer de nombreux végétaux. Leur polyphagie restant toutefois incomplète, les espèces attaquant les arbres à feuilles caduques se tournent rarement vers les conifères et réciproquement. L'ensemble des espèces européennes de *Monochamus* se nourrissent et se développent sur différentes espèces de conifères. D'après Hellrigl (1971), *M.*

sartor se nourrit principalement sur les épicéas (*Picea excelsa*, Lamark). En dehors de cet hôte, il a été signalé sur le sapin (*Abies alba*, Miller) et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*, Linnaeus). *M. sutor* peut se développer aussi bien sur l'épicéa (*Picea excelsa*, Lamark) que le pin sylvestre ou le sapin. *M. galloprovincialis*, sous sa forme *M. g. galloprovincialis*, en Afrique du Nord est surtout présent sur le pin d'Alep (*Pinus halepensis*, Miller) alors qu'en Europe, de l'Espagne jusqu'au centre de la France, il se nourrit d'avantage sur le pin maritime (*Pinus pinaster*, Sol.), le pin d'Alep et le pin noir (*Pinus nigra*, Arn.). Dans le reste de l'Europe, on le trouve surtout sous sa forme *M. g. pistor* principalement sur le pin sylvestre et le pin noir d'Autriche (*Pinus nigra* var. *austriaca*).

CHAPITRE I

(Article soumis dans *Annals of Forest Science*)

« Fécondité et développement larvaire de *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) en élevage »

« Fecundity and larval development of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) in experimental breeding »

F. A. Koutroumpa, B. Vincent, G. Roux-Morabito, C. Martin, F. Lieutier

La biologie et l'écologie des espèces européennes de *Monochamus* sont très peu connues, parce que jusqu'à présent leurs dégâts étaient secondaires, affectant surtout les arbres affaiblis ou morts depuis peu. Seuls quelques ouvrages comme ceux d'Hellrigl (1971), de Tomminen (1993) et de Starzyk and Hilszczanski (1997) donnent quelques informations sur le cycle biologique des populations nordiques. Ce n'est que depuis la démonstration de son rôle de vecteur du nématode du pin *B. xylophilus*, agent pathogène invasif responsable du dépérissement des pins au Portugal, que *M. galloprovincialis* a attiré l'attention des pays de l'Union Européenne. Au vu de la position géographique de la France et de la présence fréquente de *M. galloprovincialis* dans ses forêts de pins, le risque d'une propagation du nématode en Europe depuis le Portugal, via la France est élevé.

Les récents travaux de Naves (2007) sur *M. galloprovincialis* au Portugal sont les seuls à avoir abordé les différents aspects de la biologie et de l'écologie de cette espèce largement distribuée en France. Cependant, très peu d'informations sont disponibles sur les populations françaises.

Nous avons voulu suivre le développement et le mode de vie de cette espèce en France et comparer nos résultats avec les résultats obtenus au Portugal sur la même espèce et avec ceux obtenus sur d'autres espèces. Le but était d'apporter des informations qui pourraient être utiles dans la construction d'une méthode de surveillance, de suivi et de contrôle d'une éventuelle invasion du nématode, en agissant sur son vecteur.

Un élevage a été mis en place sur rondins de *P. sylvestris*. L'accouplement et la ponte ont eu lieu au laboratoire tandis que le développement larvaire a été suivi sur rondins replacés en conditions extérieures sous abri.

Une fécondité élevée a été observée, avec 138,2 œufs par femelle répartis pendant toute la vie adulte (Juillet à Septembre), laquelle peut durer plus de 113 jours au laboratoire. La fécondité a toutefois été plus élevée et plus constante durant la première moitié de la durée d'oviposition (plus de 62% du total des œufs). La taille de la femelle ne semble pas influencer ce paramètre.

Pour la première fois, le nombre de stades larvaires de *M. galloprovincialis* a été déterminé et estimé à quatre, en se basant sur la fréquence de distribution de la largeur de la capsule céphalique. Les quatre stades larvaires ont été décrits et des précisions sur leur localisation dans les rondins ont aussi été apportées. Ce sont les larves de troisième stade qui pénètrent dans le bois (aubier, puis bois de cœur). Elles sont alors âgées d'au moins 26 jours. Par conséquent, toute intervention visant les insectes serait probablement plus efficace avant ce stade. La durée de développement larvaire a beaucoup varié même à l'intérieur de chaque

stade. La température, la qualité du rondin de développement et le jour d'oviposition ont dû influencer cette variation mais ne peuvent pas l'expliquer et la justifier. Tous les stades larvaires ont été observés en hiver et au printemps suivant l'année de la ponte. Tous les œufs pondus les 30 premiers jours de la période d'oviposition ont atteint le troisième stade avant l'hiver. Malgré ça toutes les larves hivernantes n'étaient pas originaires seulement des pontes tardives et la durée totale de développement a été plus courte pour les individus issus d'œufs pondus à la fin d'été. Tous ces résultats et le fait que très peu de variations d'âge ont été observées lors de l'émergence des adultes, montrent que les larves issues d'œufs pondus tardivement ont la possibilité de rattraper le développement les larves issues de pontes précoces et émergent même avant celles ci. Naves (2007) a démontré l'existence d'une diapause au dernier stade larvaire, ce qui pourrait être un moyen pour l'espèce de réguler son développement, avec comme conséquence une émergence des adultes quand les conditions sont favorables. L'univoltinisme n'est pas total puisque de nombreuses larves de quatrième stade (8,13%) étaient encore vivantes dans le bois à la fin du deuxième hiver suivant la ponte, montrant ainsi que la durée du développement peut s'étaler sur deux ans. Ce résultat a été confirmé par la présence simultanée dans le bois de ces larves et d'un adulte *M. galloprovincialis* prêt à émerger. Le pourcentage des individus dont le cycle dure deux ans semble augmenter avec la latitude puisqu'il est de 5 % pour les populations portugaises (Naves, 2007) et de 90 % au Sud de la Finlande (Tomminen, 1993). Des expérimentations à différentes latitudes et températures devraient pouvoir confirmer cette hypothèse.

La forte mortalité (83,5 %) observée dans l'expérience de 2004 a été attribuée à la petite taille des rondins utilisés pour le développement larvaire, le taux de mortalité (55%) en 2005 étant plus proche de ce qui a été trouvé au Portugal.

Fecundity and larval development of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) in experimental breeding.

Fotini A. KOUTROUMPA, Bruno VINCENT, Géraldine ROUX-MORABITO, Carine MARTIN, François LIEUTIER*.

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES-EA-1207, Université d'Orléans, BP6759, Rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2, France

Corresponding authors: Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, France.

E-mail: francois.lieutier@univ-orleans.fr

or fotini.koutroumpa@univ-orleans.fr

Abstract

Life cycle traits of *Monochamus galloprovincialis*, the vector of *Bursaphelenchus xylophilus*, the causative agent of the Pine Wilt Disease, in Portugal, were investigated during two years for a population from Central France (Orléans, 47°53' N and 02°30' E). Clarification of fecundity, mortality and development of this species was the aim of this study. Mating and oviposition were conducted on *P. sylvestris* logs under laboratory conditions, then larval development was followed outdoors. Fecundity was high, with 138.2 eggs per female. For the first time in *M. galloprovincialis*, the number of larval instars (4) was recognized and instars were described. Information are provided on the shape and size of the larval galleries. Boring of galleries in sapwood and heartwood started at the third instar. All instars could overwinter but adults emerged simultaneously resulting in a univoltine life cycle for the majority of the individuals. An obligatory diapause in the forth instar was assumed. However, 8.1 % of the insects had a two year development. Important differences in mortality were noted between the two experimental years, which could be explained by differences on the size of the breeding logs. Comparisons with similar studies on other *Monochamus* species are given.

Keywords: *Monochamus galloprovincialis*, biology, fecundity, larval instars, mortality

Fécondité et développement larvaire de *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) en élevage.

Résumé

Les caractéristiques du cycle biologique de *Monochamus galloprovincialis*, le vecteur de *Bursaphelenchus xylophilus*, agent responsable pour la maladie du dépérissement du Pin au Portugal, ont été étudiés durant deux années pour une population originaire du Centre de la France (Orléans, 47°53' N et 02°30' E). Caractériser la fécondité, la mortalité et le développement de cette espèce étaient les principaux buts de l'étude. L'accouplement et l'oviposition ont eu lieu sur *P. sylvestris* au laboratoire et le développement larvaire s'est poursuivi en conditions extérieures. La fécondité a été élevée, avec 138.2 œufs par femelle. Pour la première fois chez *M. galloprovincialis*, le nombre de stades larvaires (4) a été défini et ceux-ci ont été décrits. Des informations sur la forme et la taille des galeries sont apportées. La pénétration des galeries dans l'aubier et le bois de cœur commence au troisième stade. Tous les stades sont présents en hiver mais les adultes émergent simultanément ce qui conduit à un cycle d'une année pour la majorité des individus. Une diapause obligatoire a semblé intervenir au quatrième stade larvaire. Néanmoins, 8,1% des insectes ont accompli leur développement en deux ans. Des différences importantes de mortalité ont été remarquées entre les deux années d'expériences, ce qui peut être expliqué par les différences de taille des rondins d'élevage. Des comparaisons avec des études similaires sur d'autres espèces de *Monochamus* sont donnés.

Mots clés: *Monochamus galloprovincialis*, biologie, fécondité, stades larvaires, mortalité

1. Introduction

Longhorn beetles of the genus *Monochamus* (Coleoptera Cerambycidae) are generally recognized as non important secondary pests (Hellrigl, 1971). Nevertheless, because of their association with the Pine Wood Nematode (PWN) *Bursaphelenchus xylophilus* (Nickle, 1970; Steiner and Buhner, 1934) (Nematoda: Aphelenchoididae), the causative agent of the Pine Wilt Disease (PWD) (Kiyohara and Tokushige, 1971), their role as forest pest has been largely reconsidered. A Pest Risk Analysis (PRA) on the European Union territories (as PRA area) recognized five endemic species of *Monochamus* (i.e. *M. galloprovincialis* (Olivier), *M. sutor* (Linnaeus), *M. sartor* (Fabricius), *M. urussovi* (Fischer) and *M. saltuarius* (Gebler)) as

potential vectors of *B. xylophilus* in Europe, and many pine species with frequent occurrence in Europe as susceptible pine hosts (Evans et al., 1996). In 1993, the OEPP/EPPO (Directive 77/93, EEC) declared the PWN a quarantine organism in the European Union territories (Evans et al., 1996).

Seven *Monochamus* species have been reported so far to be vectors of the PWN: (*M. carolinensis* (Olivier), *M. mutator* (LeConte), *M. scutellatus* (Say) and *M. titillator* (Fabricius) in North America, *M. alternatus* (Hope) and *M. saltuarius* (Gebler) in East Asia (Evans et al., 1996) and *M. galloprovincialis* (Olivier) in Portugal where the nematode was discovered in 1999 in *Pinus pinaster*, near the port of Setubal (Mota et al., 1999; Sousa et al., 2001).

A correct evaluation of the risks of damage extension in regions where the nematode has not been introduced yet must consider the vector insect as an essential factor. However, until their association with the PWN was recognized, very little had been known on the biology and ecology of *Monochamus* species. Many studies exist on the Asian and the North American species (Akbulut et al., 2004; Anbutsu and Togashi, 2000; Anbutsu and Togashi, 2002; Togashi, 1995; Togashi, 1997; Togashi et al., 1997). Some aspects of the biology of European species have been presented by Hellrigl (1971), Starzyk and Hilszczanski (1997) and Tomminen (1993) but their observations were made on Northern European populations. According to these authors, after emergence, the beetle's maturation feeding takes place on the twig bark of healthy pine trees. When matured, the females use their mandibles to excavate slits in the bark of recently killed or weakened pine tree and lay one or two eggs in each wound. There are two periods of PWN penetration on pines: during beetle maturation feeding (Hellrigl, 1971; Naves, 2007; Togashi et al., 2004) when both sexes transmit the nematodes to healthy host trees via the feeding wounds, and during oviposition when females transmit them to dying trees via the oviposition wounds (Edwards and Linit, 1992; Mamiya and Enda, 1972; Morimoto and Iwasaki, 1972; Wingfield and Blanchette, 1983). The nematodes enter the beetle's tracheal system via the spiracles during the pupal stage (Hellrigl, 1971; Naves, 2007).

Since *M. galloprovincialis* was proved to be the vector of the PWN in Portugal, several studies have been conducted on this species (Naves et al., 2005; Naves et al., 2006a; Naves et al., 2006b). Nevertheless this insect has not been, so far, the subject of an exhaustive survey in France and details of its biology are still unknown. Even though *B. xylophilus* has not yet been found in France, the risks of its introduction in this country are very serious. France could easily play the role of a bridge to the propagation of the PWN from Portugal to the rest of Europe and, despite the efforts for surveillance, another accidental introduction from another continent cannot be excluded. Furthermore, bioclimatic parameters in France, such as

temperatures, hosts and vectors, seem adequate for the nematode installation and propagation (Evans et al., 1996). Consequently, clarifying in depth all possible aspects of the life of its vector appear essential to evaluate the modalities of extension, the risks of damage, as well as to build survey and control programs in case the PWN would be introduced.

The aim of this paper is to report on a biological study of *M. galloprovincialis*, the most abundant French *Monochamus* species. Laboratory experiments on fecundity, development and mortality were conducted on *Pinus sylvestris*. Questions like larval instars' number, size and duration, as well as parameters influencing fecundity level and frequency, and mortality were investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Insects and breeding logs

All *M. galloprovincialis* adults as well as the oviposition material (*P. sylvestris* trees) were collected from Lorris forest, near Orléans (France).

Laboratory breeding experiments were conducted during two years (2004 and 2005). For 2004, 18 adults (9 males and 9 females) were captured in July. Beetles for the 2005 experiments were either adults that emerged during summer 2005 from the laboratory experiments of 2004 (16 couples), or adults that emerged from trap trees. In that later case, *P. sylvestris* trees were cut down on July 2004 and left in the forest until end of spring 2005. On May 2005, branches of these trees, attacked by *Monochamus*, were cut into logs, brought to the laboratory, and stored in plastic containers (53 cm high, 47.5 cm diameter) covered with tulle, until *Monochamus* adults emerge in summer 2005.

Healthy *P. sylvestris* trees were cut down at the end of June, each year (2 trees in 2004 and 3 trees in 2005) to be used as oviposition substrates. Branches and about 50 cm of the upper part of the trunk were cut into logs and brought to the laboratory. The logs were carefully examined in order to exclude those already infested by *Monochamus* beetles and their ends were sealed with paraffin to slow down desiccation. Logs were kept at 4°C until use.

2.2. Adult maturation, mating and oviposition

Maturation nutrition, mating and oviposition were studied at 23°C in the laboratory. During the maturation feeding period, adults were kept separately in plastic boxes (26.5 x 13.5 x 7.5 cm) containing moistened paper and pierced by a 5 cm diameter aeration hole covered with 1 mm mesh tulle. Newly emerged adults were introduced into the boxes and were supplied

with fresh young twigs every two days for 6 to 38 days. Based on observations by Walsh and Linit (1985), Jikumaru et al. (1994), Togashi (1997), and Nakayama et al. (1998), they were allowed to mature in these boxes during 13 to 24 days before their use in the oviposition experiment.

For the oviposition experiment, mates were chosen within similar emergence dates and size ranges. Adult body length was measured from the pronotum to the end of elytra. The insects were photographed with a Canon PowerShot A80 digital camera through the ocular of a dissecting microscope, and their body length was measured on the pictures by using ImageJ 1.32j. with the same method as for larvae. Couples were placed in plastic boxes, with fresh twigs for feeding and a log for oviposition. Descendants from the same parents were never matched together to prevent consanguinity and males that died during the first week after mating were replaced by new ones, with respect to the emergence date and body size of the female. In 2004, oviposition experiment started the 1st of July and ended in October with the death of females. In 2005, it started the 7th of July and each female was allowed to oviposit for about one month. Then, the experiment had to be stopped because of technical restrictions. For the two years the beginning of the female oviposition depended on their emergence date and the oviposition date of each egg was defined by considering the 1st July as day 0. The logs were checked daily, under a binocular lens, and oviposition slits were recorded. When more than five slits with jelly emitted by the female during oviposition were observed, the log was replaced by a new one. The number of slits with and without jelly was recorded as well as the length, diameter and bark thickness of the logs.

Couples, with both male and female coming from the forest (captures or emergences from trap logs), were grouped for analyses as A4 couples (for 2004, 10 couples) or A5 (for 2005, 3 couples). Couples with both sexes coming from the 2004 breeding were grouped as B couples (8 couples). When males and females were a mix of adults that emerged from the breeding logs and the trap logs coming from the forest, they were grouped as C couples (4 couples).

Fecundity was estimated as the total number of eggs per female, based on the number of slits with jelly, following Anbutsu and Togashi (1997) who proposed, for *M. alternatus*, that jelly was a reliable prediction of egg deposition, and slits without jelly were inspected for the presence of eggs. In order to determine how the fecundity evolved during the oviposition period (between the first and the last egg laid by a female), three females with different total fecundity rates were chosen among the A4 group.

2.3. Larval development

Logs with eggs from the oviposition experiment were placed in containers covered with tulle for aeration and protection and stored outdoor, but sheltered from rain to avoid extensive fungal development. In 2004, no attention was given to the direction of the logs in the containers, but in 2005, logs with eggs were placed vertically with respect to their natural position.

Every 15 days from July 15 to October, one to three larvae from each couple were extracted from the oviposition logs, in order to follow the larval development. For instars located inside the phloem, logs were debarked, but when larvae started to bore into the sapwood, logs had to be sliced to extract them. The extractions stopped in October and started again in February (with one month intervals) until June when adults began to emerge. Depending on the total number of logs used by each couple to complete their oviposition, 12.5 to 45.5 % of the logs were kept intact during the whole developmental period and used as control logs. The control logs were opened only at the end of the developmental period. This final extraction occurred end of February 2007. Dead and alive specimens were counted and measured. This period corresponded to the third year of development for the 2004 ovipositions and to the second for the 2005.

Head capsule width and length, as well as body weight and length were measured with the same method as for adults' body size, to later characterize larval instars. Body color and presence of fecal materials in the intestine were noted. Larvae with milky white body color and with fecal materials in the intestine were considered to be in feeding activity, whereas those yellowish white to yellow with empty intestine were considered to be in diapause (Naves, 2007; Togashi, 1991a; Togashi, 1991b). When all larvae had been extracted from a log, this log was sliced in order to determine the size and shape of the galleries.

Size limits of each larval instar were determined from a histogram of head capsule widths. These results were subsequently used to determine the number of larvae in each instar. The minimum durations of larval instars were approached by plotting, for each stage separately, the age of each larva at extraction against the day of oviposition. In these conditions, for a given oviposition day, the lowest age value gives the closest approximation of the minimum development duration from oviposition day to the end of the previous stage.

Daily minimum and maximum temperatures during 2004-2005 for Orléans were obtained from Bricy meteorological station (25km NW from the experimental site).

2.4. Mortality

Mortality was studied only for the control logs, because those logs had not been disturbed by larval extractions during development. The total survival was obtained by dividing the number of adults by the number of eggs laid. In these calculations, the fourth instar larvae that were found alive the second spring of their development were also taken into account (as adults) because they would probably have emerged as adults on the following summer.

2.5. Statistical treatments

Means were compared with the GLM procedure followed by a Sheffe's test. When the data distribution was not normal, the non parametric test of Wilcoxon was used. Linear regressions were calculated. Differences were considered significant for $P \leq 0.05$. Values are presented with their standard error. All statistical tests and calculations were performed with the SAS statistical program package (SAS Institute, 1987).

3. Results

3.1. Fecundity

Eggs were always laid in the subcortical area. 71.55% of the slits excavated by the females were sealed with jelly and were considered to include at least one egg. Only 5.5% of the slits not plugged with jelly contained eggs. Two eggs were found in the same slit at only three occasions and, even though checking all slits was incompatible with the rest of the experiments, number of larvae found at the end corresponded to no more than one egg per slit. Fecundity did not differ significantly between the four groups (A4, A5, B and C) built according to their emergence conditions, considering that only A4 females were allowed to oviposit during their whole life (Tab. 1). The 25 females used laid a total of 1700 eggs in total but nine of them died after mating or few days later (10 to 39 days in total) and laid between 0 and 32 eggs only. The remaining sixteen females lived at least 75 days and laid 85 to 196 eggs (mean 138.2 ± 14.7) most of them laying 100 to 115 eggs, at the exception of one female captured in the field (A4 group) that laid more than 300 eggs during its lifetime that lasted more than 113 days in the laboratory. Duration of the preoviposition period and female size were not correlated with fecundity. Mean body size of females was 17.1 ± 0.6 mm. Significant linear correlation was found between the fecundity and the duration of the oviposition period for 2004 experiment (Fig. 1). A similar trend was observed in 2005 but the correlation was not significant.

Table 1: Total mean fecundity and mean fecundity for each of the four groups of females. Groups made according to the emergence conditions of these females and their partners: forest (A4 for 2004 and A5 for 2005, laboratory breeding (B) or mix of the two (C).

Female group	Fecundity
A4	74,30 ± 33,45
A5	114,33 ± 8,11
B	110,75 ± 17,44
C	90,50 ± 37,78
Total	93,36 ± 15,42

The three A4 females used for the oviposition survey laid a total of 318, 196 and 115 eggs for the high, medium and low fecundity levels, and their total oviposition duration was 90, 88 and 52 days, respectively (Fig. 2). Two oviposition phases could be distinguished for each female. In the first phase, corresponding respectively to 48, 49 and 42 % of the total oviposition duration, eggs were laid every day to every other day, and fecundity was 62, 68 and 80 % of the total fecundity. In the second phase (the remaining oviposition period), oviposition days were much less frequent. For each female, the number of eggs laid per oviposition day was very variable during the whole oviposition period, but there was no significant relationship between oviposition day and the number of eggs laid per oviposition day.

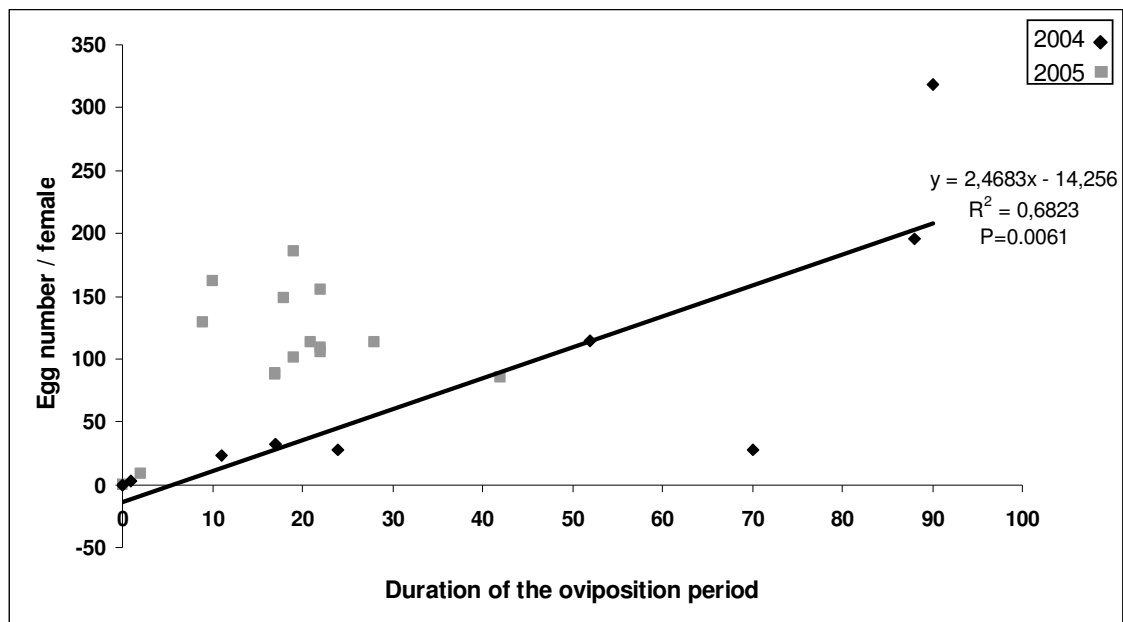


Figure 1 : Total fecundity of females in relation to the duration of the oviposition period. Curve and equation are given for 2004

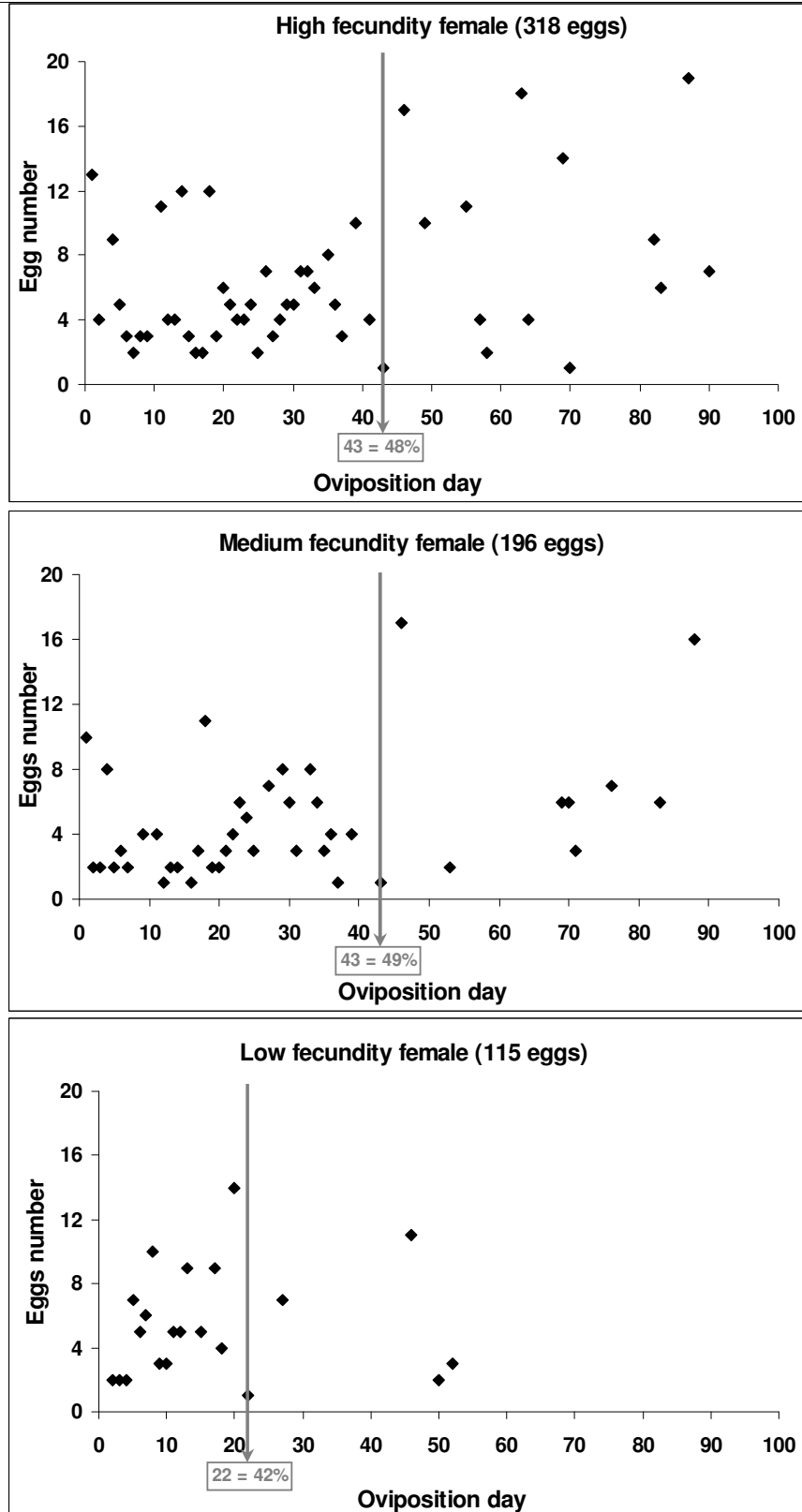


Figure 2 : Egg distribution with time for three females of the A4 group.

3.2. Development

Eggs were 4.03 ± 0.12 mm long and 1.22 ± 0.04 mm wide (12 measurements), and average length of pupae and adults were 19.97 ± 0.93 mm (3 measurements) and 18.19 ± 0.26 mm (121 measurements), respectively.

3.2.1. Characterization of larval instars

Head capsule width and length were measured for 797 larvae. Frequency of these measurements showed four separate maxima for both width and length, corresponding to four larval instars (L1, L2, L3 and L4) (see figure 3 for the width as an example). Size limits between instars were not very accurate, probably as a consequence of overlapping between the upper size limit of an instars and the lower size limit in the following one. When head capsule width did not indicate the same instar as the head capsule length, we followed the indication of the head capsule width to define the larval instar because head capsule width gave less overlapping between instars. These extreme values were then used to define the instars of each larva. Based on these observations, larval measurements and developmental stages characteristics are given in table 2.

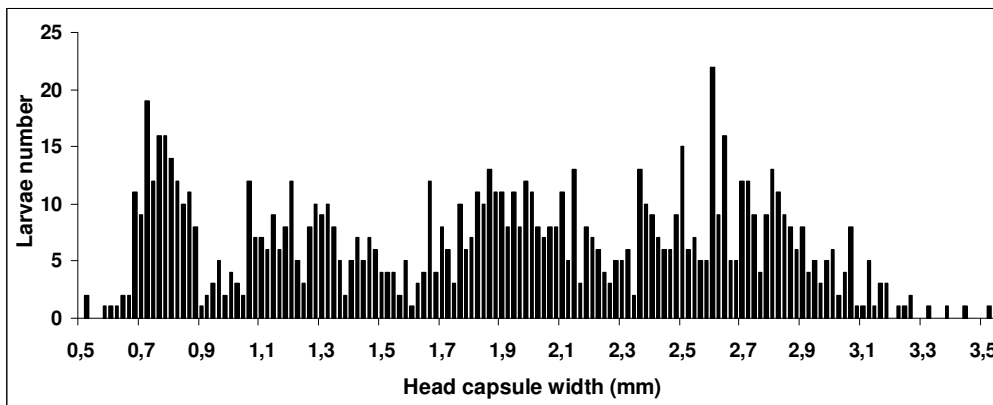


Figure 3: Frequency distribution of head capsule width for 797 larvae of *M. galloprovincialis*.

Table 2: Size characteristics of *M. galloprovincialis* larval stages.

	Larvae			
	Body length (mm)	Weight (g)	Head capsule length (mm)	Head capsule width (mm)
L1	2.1 to 9.5-10.4	0.001 to 0.014-0.018	0.9 to 1.7-1.75	0.5 to 0.89-1.03
L2	3.7-4.3 to 19-21.4	0.003 to 0.07	1.7-1.75 to 2.76-2.87	0.89-1.03 to 1.55-1.62
L3	7.0 to 29.3-32.0	0.005 to 0.21	2.76-2.87 to 4.5-4.6	1.55-1.62 to 2.25-2.33
L4	12.5-13.6 to 42.3	0.08 to 0.71	4.5-4.6 to 6.38	2.25-2.33 to 3.51

Depending on their instar, larvae could be located in all parts of the log (Tab. 3 and Fig. 4). Sapwood and heartwood begun to be bored at the third larval instar. Gallery shape was noted for 87 galleries in both 2004 and 2005 and two shapes of galleries were observed (Fig. 4). 58.6% were U shaped, 36.8% were S shaped, and 4.6%, located near the ends of the log, had no special shape and were short. Gallery orientation was noted for 128 galleries in 2005. 79.7 % went up, following the natural direction of the log whereas 10.9 % were oriented in the opposite direction. 9.4 % started with a down going direction (most of the times the beginning of these gallery was at the upper end of the log) but then they turned so that they could finally have an up going direction. Galleries size is given in table 4. Pupae were only found in pupal chamber in the sapwood from which adults emerged through a circular hole in the bark.

Table 3. *M. galloprovincialis* localization in the logs.

	Bark	Sapwood	heartwood	Pupal chamber (sapwood)
Egg	100%			
L1	100%			
L2	100%			
L3	78.7%	4.8%	16.4%	
L4	28.1%	5.9%	62.6%	3.4%
Pupae				100%
Adult				100%

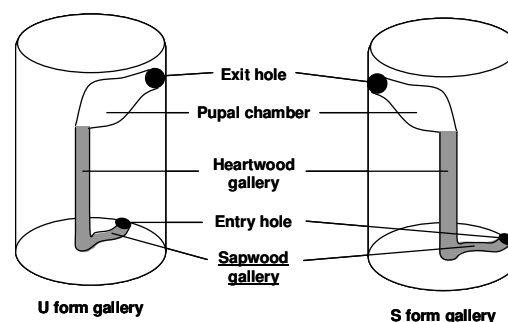


Figure 4: *M. galloprovincialis* gallery shapes.

Table 4. Galleries size for *M. galloprovincialis*. All measures are given in cm.

Species		Sapwood gallery (1)	Heartwood gallery (2)	Total (1) + (2)	Pupal chamber length	Pupal chamber width	Exit hole diameter
<i>M. galloprovincialis</i>	min	1,00	1,00	3,00	1,50	0,50	0.40
	max	4,50	13,70	16,10	6,40	1,60	1.00

3.2.2. Head capsule size distribution

Head capsule width distribution according to the age of larvae at extraction was the same for the two years and did not differ among parents' emergence origin (forest, trap logs and breeding logs) (data not shown). There were four groups of age corresponding to the periods of larval extraction (Fig. 5). Larvae that lived through a second and a third winter were mainly fourth instar larvae. They did not especially correspond to eggs laid at the end of the first summer (data not shown), but developed in significantly bigger logs than larvae extracted

after the first winter. Log mean surface was $539.8 \pm 56 \text{ cm}^2$ for the larvae extracted after the first winter and $836.1 \pm 121.9 \text{ cm}^2$ for the larvae extracted after the second winter ($P = 0.0150$) while log mean volume was respectively $969.1 \pm 175.1 \text{ cm}^3$ and $2109.5 \pm 527.9 \text{ cm}^3$ ($P = 0.0163$).

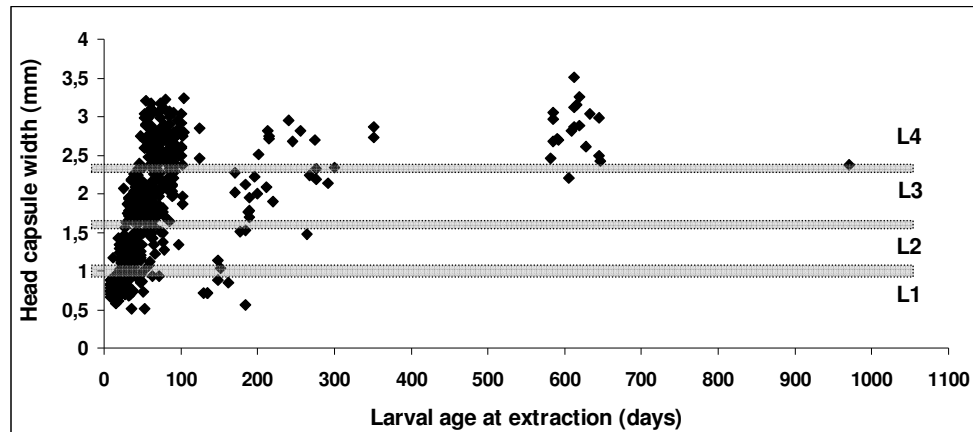


Figure 5: Head capsule width distribution in different larval extraction periods during *M. galloprovincialis* development. The first group of points corresponds to the summer extractions, and the second group to the spring extractions of the first year of larval development, with a gap due to the lack of extractions during winter. The two other groups of points correspond to larval extractions during spring of the second (2005 breeding only), and the third (2004 breeding only) years of larval development. Horizontal lines separate larval instars.

3.2.3. Development duration

Figure 6 represents the relation between age at extraction (larvae) or at emergence (adults) and oviposition day, for each larval instar and for adults. Only the larvae of which the instar number was certain were taken into account. Minimum development duration from the oviposition day was 8 days for egg hatching in 2005 (9 in 2004) (Fig. 6a), 12 days for L1 termination in 2005 (19 in 2004) (Fig. 6b), 26 days for L2 termination in 2005 (33 in 2004) (Fig. 6c), and 46 days for L3 termination in 2005 (53 in 2004) (Fig. 6d), while L4 larvae changed into pupae during spring and to adults the following summer (Fig. 6e). For most stages, when oviposition day increased, the minimum development duration from eggs first slightly decreased and then increased. All L1 larvae reached the L2 instar before winter in 2005, but not in 2004 (Fig. 6a). All eggs laid during the first 30 days of the oviposition experiment reached at least the L3 instar before winter since no L1 or L2 from these eggs was found in spring (Fig. 6a and 6b). Similarly, all eggs laid during the first 10 days of the oviposition experiment reached the L4 instar before winter since no L3 from these eggs was found in spring (Fig. 6c). Eggs laid after the 30th day could be at any stage during winter, and

all larval instars were still present in spring. Among those eggs, overwintering larvae of any stage did not preferably originate from eggs laid at the end of the first summer. Similarly, L4 larvae coming from eggs laid during the whole oviposition period except the first 10 days were obtained at all three larval extraction periods (summer, first spring and second spring after oviposition). Those from eggs laid during the first 10 days were found at the first and second period only (Fig. 6d). 8.1% of the L4 larvae were still alive in the heartwood at the last larval extraction period, after two breeding years (Fig. 6d).

Insect age at adult emergence (Fig. 6e) (indicating the total duration of development from oviposition to adult) varied very little compared to variations in age at any larval stage, whatever the date of oviposition. In addition, a significant negative regression indicated that total development from eggs to adults was shorter for the eggs laid in late summer than for those laid at the beginning of summer. One pre-emerging adult was found the second spring, indicating that its total larval development took two years. At the emergence 42 % of the adults were females and 58 % males.

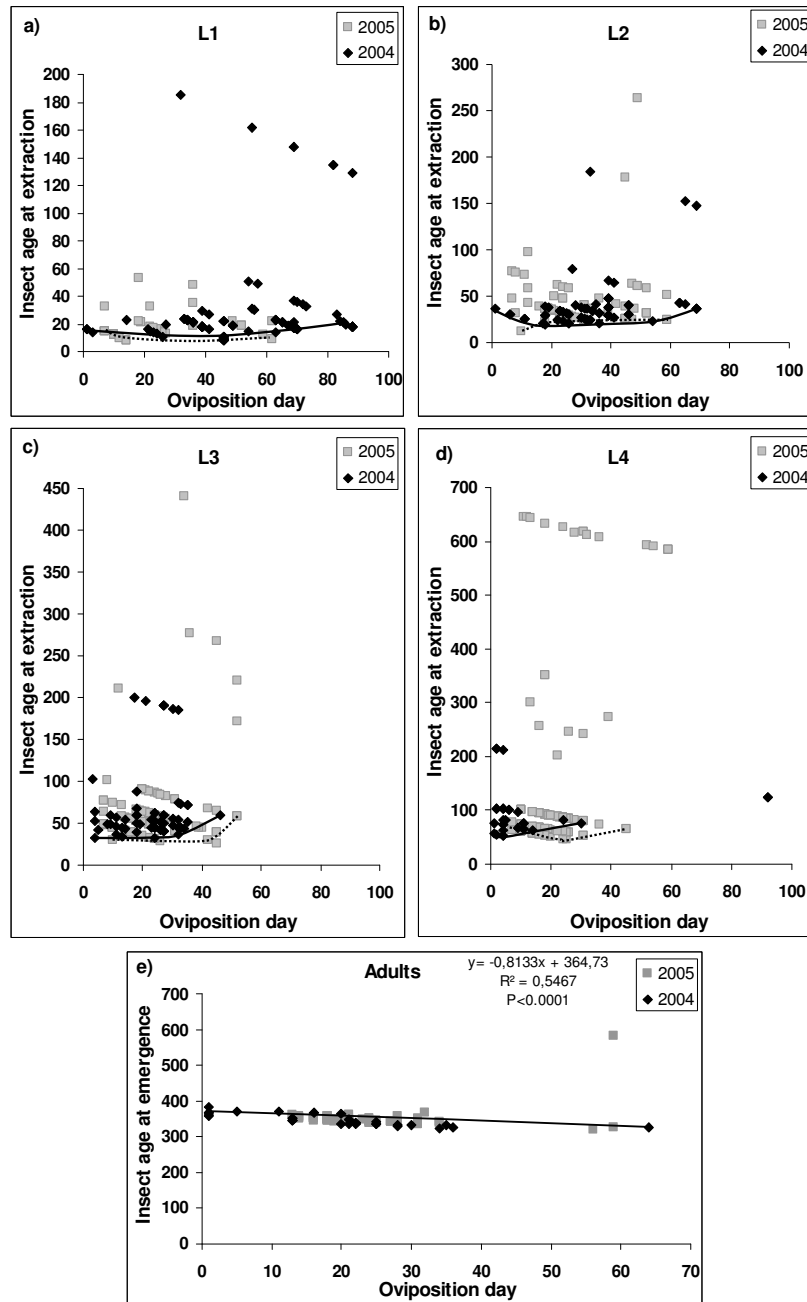


Figure 6: Insect age at extraction of the four *M. galloprovincialis* larval instars and at the emergence of the adult stage. For all the graphics values of 2004 are shown in black and those of 2005 in grey. Groups of points along the axis of insect age correspond to periods of extractions from logs. Curves with continue lines correspond to 2004 values and interrupted lines correspond to 2005 values. Curves in the first four graphics joint minimum values obtained for each larval instar and indicate minimum limits of the development of the previous instar. Curve in 6e corresponds to the regression line.

Temperatures were higher at the end of July and fell progressively during this period (Fig. 7).

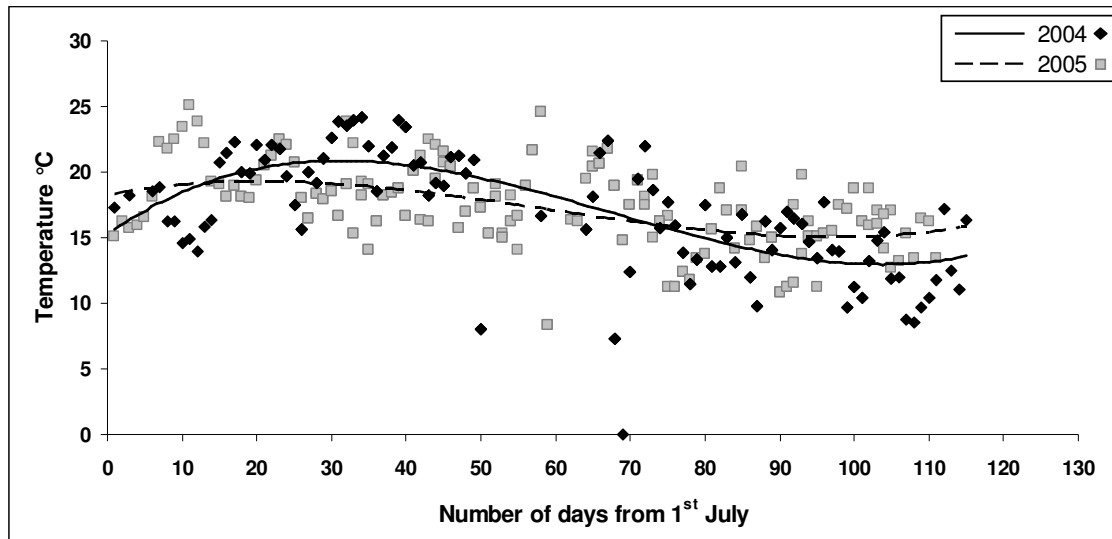


Figure 7: Mean daily temperature ($^{\circ}\text{C}$) variations between July and October in 2004 and 2005. Curves were adjusted to a third order polynomial.

3.2.4. Mortality

The mean total mortality rate differed between years ($83.5 \pm 4.0\%$ in 2004; $55.2 \pm 5.0\%$ in 2005; $P < 0.0001$). Logs used for mortality estimations (control logs) differed significantly between years regarding their surface ($P < 0.0001$) and volume ($P < 0.0001$). Mean log surface was $306.5 \pm 17.8\text{ cm}^2$ in 2004 and $528.9 \pm 21.9\text{ cm}^2$ in 2005. Mean log volume was $411 \pm 47.1\text{ cm}^3$ in 2004 and $791.5 \pm 67.6\text{ cm}^3$ in 2005. The smallest logs thus corresponded to the highest mortality rate. Total mortality was also significantly and negatively correlated with log surface and volume in 2004 ($r = -0.43$ in both cases, with $P = 0.0034$ for surface and $P = 0.0036$ for volume) but not in 2005. It was not significantly correlated to egg density but was positively correlated to oviposition day during both years of experiment ($r = 0.42$ with $P = 0.0027$ in 2004; $r = 0.31$ with $P = 0.0427$ in 2005). It was not possible to evaluate the mortality at larval instars because of the influence of frequent larvae extractions, but we never found dead pupae. 5.7% of the adults died while trying to bore their exit holes.

4. Discussion

4.1. Fecundity

In our experiment, the fecundity of *M. galloprovincialis* females from the forest of Orléans (138.2 eggs per female) largely exceeds previous records in other European populations. Hellrigl (1971) gave a range of 45 to 87 eggs per female on *P. sylvestris*, Francardi and Pennacchio (1996) mentioned 37 eggs per female and Portuguese specimens laid in average 67 eggs in *P. pinaster* (Naves, 2007). Host trees may influence fecundity rates but Naves (2006a) did not find significant differences between fecundity in *P. sylvestris* and *P. pinaster*. Genetic differences between populations may also interfere. However, our results were obtained in laboratory, in better conditions than in nature where females have to search for adequate hosts and avoid predation, which could explain a higher fecundity. Our results with *M. galloprovincialis* also exceed the fecundity value given for its sister species *M. sutor* (Starzyk and Hilszanski, 1997). Nevertheless, they approach the values reported for Asian congeners (91.7 eggs for *M. saltuarius* and 124.1 for *M. alternatus*) (Jikumaru et al., 1994; Togashi, 1997) and for *M. carolinensis* (200 eggs) from North America (Akbulut and Linit, 1999; Walsh and Linit, 1985).

According to the three females used in our experiment, and as for the Portuguese *M. galloprovincialis* (Naves, 2007), the oviposition rhythm was higher during the first part of the oviposition period, but there was no relation between daily fecundity and oviposition day, as observed for *M. saltuarius* (Jikumaru et al., 1994) and *M. alternatus* (Togashi, 1997) in Japan. The relative duration of the intense oviposition period appeared not to depend on total fecundity of the female. However, total fecundity and total duration of oviposition may have been underestimated in our study since the females used came from field captures and might thus have already started ovipositing in the forest.

Females that lived longer laid more eggs, in agreement with the findings by Naves et al. (2006b) in Portugal for the same species, and Jikumaru et al. (1994) for *M. saltuarius*. The very weak fecundity of some females was therefore probably due to their early mortality. Female size and duration of the pre-oviposition period were not significantly correlated with fecundity. This disagrees with Portuguese observations on *M. galloprovincialis* (Naves et al., 2006b), but observations on *M. saltuarius* and *M. alternatus* are consistent with our results (Jikumaru et al., 1994; Togashi and Magira, 1981).

4.2. Longevity and mortality

Excluding females with very weak longevity, *M. galloprovincialis* bred in our experimental conditions lived longer than what has been observed in previous experiments, probably because they were in laboratory conditions. Values of 75 to 113 days exceed the 65 to 80 days given by Hellrigl (1971) for this species, even though this author mentions the exceptional case of some specimens that lived 147 days. The minimum longevity found for females from the Orléans population was near the average value (78 days) found for this species in Portugal (Naves et al., 2006b) while *M. alternatus* specimens described by Togashi (1997) lived in average 82.8 days with a maximum of 145 days and *M. saltuarius* (Jikumaru et al., 1994) lived an average of 57.3 days (maximum 80 days).

Pupae zero mortality was evidently the lowest mortality observed among the different developmental stages. Even though it was close to the 0.8 % found at this stage for the Portuguese populations (Naves, 2007). It seems however underestimated, especially when compared with the 6.2 % found for *M. alternatus* (Togashi, 1990). On the other hand 5.7 % mortality of adults is only slightly higher than the 2% found for the Portuguese population, while 33.1% was reported for adult *M. alternatus* (Togashi, 1990). Discrepancies among studies could result from differences in experimental designs (laboratory conditions *M. galloprovincialis* versus natural conditions for *M. alternatus*).

The higher total mortality in the 2004 than in the 2005 experiment was certainly caused by too small a size of the breeding logs in 2004. This is confirmed by the fact that total mortality was significantly correlated with log size only in 2004, although among logs variations were comparable between years. Moreover, egg density in the logs was controlled and was not correlated to mortality. The 55.2 % mortality found in 2005 is fully comparable to the 53% reported for the Portuguese populations of *M. galloprovincialis* (Naves, 2007). In *M. alternatus*, Togashi (1990) indicates a total mortality ranging from 43% to 75% depending on the populations. Nevertheless, a high mortality (88 %) has been reported for *M. carolinensis* in North America (Akbulut et al., 2004).

4.3. Larval development

The number of larval instars had not been previously established in *M. galloprovincialis*. Our results clearly indicate that they are four, and we give their size characteristics. The number of larval instars may differ between field and laboratory conditions (Naves, personal communication). *M. sutor*, the sister species of *M. galloprovincialis*, has five larval instars (Starzyk and Hilszczanski, 1997), but *M. alternatus* is also known to have four

larval instars (Togashi, 1990). All individuals of the two younger instars and most larvae of the third instar fed under the bark. Galleries in the sapwood and heartwood were initiated by the third larval instar, and most larvae of the fourth instar live in the heartwood, similarly to what has been found in *M. sutor* (Starzyk and Hilszczanski, 1997). The old larvae still need to feed under the bark when they retire in the pupal chamber (Hellrigl, 1971), probably explaining that up to 28 % of the fourth instar larvae were under the bark.

In agreement with Hellrigl (1971), we found that *M. galloprovincialis* galleries can be U shaped or S shaped. By contrast, galleries of *M. sutor* are always U shaped (Starzyk and Hilszczanski, 1997). Those one are also bigger since gallery size in the wood ranged from 8 to 28 cm for *M. sutor*, against 3 to 16.1 cm for *M. galloprovincialis* (our results). Similarly, pupal chamber of *M. galloprovincialis* was 1.5 to 6.40 cm long (our study) compared to 3.2 to 6.5 cm for *M. sutor* (Starzyk and Hilszczanski, 1997). Using breeding logs for the former may have however influenced gallery length.

The duration of larval development varied greatly between larvae, even in a same stage. Temperature certainly played a role. Indeed, the decrease followed by an increase of the minimum development duration from eggs to the beginning of most larval stages, when day of oviposition increase, might be explained, at least in 2004, by the increase followed by the decrease of the daily mean temperature between July and October. Log quality may also interfere. Since they had been stored a longer time, log used at the end of summer might have been of lesser quality than those used at the beginning. However, temperature and log quality, combined with day of oviposition, cannot explain the huge variations in insect age observed among each larval stage. All larval instars were found both before and after winter, indicating that larval development was interrupted by winter. However, although eggs laid before day 30 of oviposition all reached the third larval instar before winter, overwintering larvae did not especially originate from eggs laid at the end of summer, contrary to what could have been expected from previous observations (Hellrigl, 1971). Moreover, the duration of the total development was shorter for eggs laid in late summer than for those laid in the beginning of summer. Much less age variations were also observed among insects at emergence than at any larval stage, even when considering the first year of development only. All these results indicate that in terms of development larvae issue from late eggs can catch up with those issue from early eggs. This is in agreement with the suggestion by Naves (2007) of a genetically-induced and obligatory period of dormancy/diapause during winter. Naves (2007) proved that this dormancy/diapause was associated with the last larval instar. Our findings agree and indicate that it occurs at the fourth one. Diapause has already been described in other

Monochamus species, namely *M. saltuarius* and *M. alternatus* (Jikumaru and Togashi, 1996; Togashi, 1991a; Togashi, 1991b; Togashi, 1995; Togashi et al., 1994) but seems to be absent in *M. carolinensis* (Pershing and Linit, 1986). According to Naves (2007), *M. galloprovincialis* diapause is influenced by photoperiod, even though no critical values could be determined, and no chilling seems necessary for diapause termination (Naves, 2007). On the contrary *M. saltuarius* and *M. alternatus* depend more from temperature for diapause termination (Jikumaru and Togashi, 1996; Togashi, 1991a; Togashi, 1991b; Togashi, 1995; Togashi et al., 1994) while food quality must also interfere (Togashi, 1991a; Togashi, 1995). Our results do not allow concluding on these aspects.

We observed that quite a high proportion (8.1%) of fourth instar larvae were still observed at this stage after a second winter. They would probably have emerged as adults the following summer, which is corroborated by the finding of a pre-emerging adult at the same period. That these larvae were found in bigger logs than those extracted after the first winter suggests that food abundance and therefore food quality would slow down larval development, while low food quantity and quality would incite larvae to accelerate their development so that they are able to become adult before food deficiency. Such a possibility has already been proposed for *M. alternatus* (Togashi, 1991a; Togashi, 1995). Experimental conditions have thus certainly interfered, but our observations suggest that, at least in certain conditions, larval diapause could be prolonged for at least one year. A two year development for some specimens of *M. galloprovincialis* has already been reported (Hellrigl, 1971; Naves, 2007; Tomminen, 1993). The percentage of such individuals is 5% in Portugal (Naves, 2007) and 90% in Southern Finland (Tomminen, 1993). Our findings of 8.1% for the Orléans specimens suggest a latitudinal influence on the frequency of individuals with a two year development.

The sex ratio at emergence (0.42) was in advantage of males, and slightly lower than in Portugal (0.48) for the same species (Naves, 2007) and than in Japan (0.49) for *M. alternatus* (Togashi and Magira, 1981).

5. Acknowledgments

The study was part of a research program granted by the Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité (MAAPR). The Foundation Korialenio (Greece) contributed to the stay of F. Koutroumpa in France. The authors also thank INRA Orléans for providing space for outdoor breeding experiments and J. Garcia (INRA) for its technical assistance in the field.

6. References

- Akbulut, S., Linit, M.J., 1999. Seasonal effect on reproductive performance of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) reared in pine logs. *Forest Entomol.* 92, 631-637.
- Akbulut, S., Stamps, W.T., Linit, M.J., 2004. Population dynamics of *Monochamus carolinensis* (Col., Cerambycidae) under laboratory conditions. *J. Appl. Entomol.* 128, 17-21.
- Anbutsu, H., Togashi, K., 1997. Oviposition behaviour and response on the oviposition scars occupied by eggs in *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32, 541-549.
- Anbutsu, H., Togashi, K., 2000. Deterred oviposition response of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) to oviposition scars occupied by eggs. *Agr. Forest Entomol.* 2, 217-223.
- Anbutsu, H., Togashi, K., 2002. Oviposition deterrence associated with larval frass of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect Physiol.* 48, 459-465.
- Edwards, O., Linit, M., 1992. Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through oviposition wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Nematol.* 24, 133-139.
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J., Magnusson, C., 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *Bull. OEPP* 26, 199-249.
- Francardi, V., Pennacchio, F., 1996. Note sulla bioecologia di *Monochamus galloprovincialis galloprovincialis* (Olivier) in Toscana e in Liguria (Coleoptera Cerambycidae). *Redia* 79, 153-159.
- Hellrigl, K.G., 1971. La bionomie des espèces de *Monochamus* (Coleoptera, Cerambycidae) et leur importance pour la sylviculture et l'économie du bois. *Redia* 52, 367-511.
- Jikumaru, S., Togashi, K., 1996. Effect of temperature on the post-diapause development of *Monochamus saltuarius* (Gebler) (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 31, 145-148.
- Jikumaru, S., Togashi, K., Taketsune, A., Takahashi, F., 1994. Oviposition biology of *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) at constant temperature. *Appl. Entomol. Zool.* 29, 555-561.
- Kiyohara, T., Tokushige, Y., 1971. Inoculation experiments on a nematode, *Bursaphelenchus* sp., on pine trees. *J. Jpn. For. Soc.* 53, 210-218.
- Mamiya, Y., Enda, N., 1972. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica* 18, 159-162.
- Morimoto, K., Iwasaki, A., 1972. Role of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Aphelenchoididae) as vector of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *J. Jpn. For. Soc.* 54, 177-183.
- Mota, M.M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa, E., 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1, 727-734.
- Nakayama, Y., Jikumaru, S., Togashi, K., 1998. Reproductive traits and diel activity of adult *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) at two different temperatures. *J. For. Res.* 3, 61-65.

- Naves, P., 2007. Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) and its role as vector of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda, Parasitaphelenchidae) in Portugal Doutoramento em Biologia (Biologia Populacional), Faculdade de Ciências.
- Naves, P.M., Kenis, M., Sousa, E.M., 2005. Parasitoids associated with *Monochamus galloprovincialis* (Oliv.) (Coleoptera: Cerambycidae) within the pine wilt nematode-affected zone in Portugal. *J. Pest Sci.* 78, 57-62.
- Naves, P.M., Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2006a. Feeding and oviposition preferences of *Monochamus galloprovincialis* for certain conifers under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 120, 99-104.
- Naves, P.M., Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2006b. Reproductive traits of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions. *Bull. Entomol. Res.* 96, 289-294.
- Nickle, W.R., 1970. A taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). *J. Nematol.* 2, 375-392.
- Pershing, J.C., Linit, M.J., 1986. Development and seasonal occurrence of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) in Missouri. *Environ. Entomol.* 15, 251-253.
- Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifacio, L., Mota, M.M., 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3, 89-91.
- Starzyk, J.R., Hilszczanski, J., 1997. Bionomics, ecology, and economic importance of *Monochamus sutor* (L.) (Coleoptera, Cerambycidae) in mountain stands of *Picea abies* (L.) Karst. *Zesz. Nauk. AR w Krakowie* 326, 121-145.
- Steiner, G., Buhner, E.M., 1934. *Aphelenhoides xylophilus*, n. sp. a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *J. Agric. Res.* 48, 949-951.
- Togashi, K., 1990. Life table for *Monochamus alternatus* (Coleoptera, Cerambycidae) within dead trees of *Pinus thunbergii*. *Jpn. J. Ent.* 58, 217-230.
- Togashi, K., 1991a. Different developments of overwintered larvae of *Monochamus alternatus* (Coleoptera, Cerambycidae) under a constant temperature. *Jpn. J. Ent.* 59, 149-154.
- Togashi, K., 1991b. Larval diapause termination of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) under natural conditions. *Appl. Entomol. Zool.* 26, 381-386.
- Togashi, K., 1995. Interacting effects of temperature and photoperiod on diapause in larvae of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Jpn. J. Ent.* 63, 243-252.
- Togashi, K., 1997. Lifetime fecundity and body size of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) at a constant temperature. *Jpn. J. Ent.* 65, 458-470.
- Togashi, K., Akita, Y., Nakane, I., Shibata, Y., Nakai, I., 1997. Relatively larger eggs produced by smaller females of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32, 264-266.
- Togashi, K., Chung, Y.J., Shibata, E. (2004) Spread of an introduced tree pest organism - the pinewood nematode. In: *Ecological Issues in a Changing World. Status, Response and Strategy* (eds. Hong, S.K., Lee, J.A., Ihm, B.S., Farina, A., Son, Y., Kim, E.S., Choe, J.C.), pp. 173-188. Kluwer Academic Publishers.
- Togashi, K., Jikumaru, S., Taketsune, A., Takahashi, F., 1994. Termination of larval diapause in *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) under natural conditions. *J. Jpn. For. Soc.* 76, 30-34.

- Togashi, K., Magira, H., 1981. Age-specific survival rate and fecundity of the adult japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera : Cerambycidae), at different emergences times Appl. Entomol. Zool. 16, 351-361.
- Tomminen, J., 1993. Development of *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) (Coleoptera, Cerambycidae) in cut trees of young pines (*Pinus sylvestris* L.) and log bolts in southern Finland. Entomol. Fennica 4, 137-142.
- Walsh, K., Linit, M., 1985. Oviposition biology of the pine sawyer, *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). Ann. Entomological Soc. Am. 78, 81-85.
- Wingfield, M., Blanchette, R., 1983. The pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Minnesota and Wisconsin: insect associates and transmission studies. Can. J. For. Res. 13, 1068-1076.

CHAPITRE II

Dans ce chapitre on se propose de rassembler les résultats quantitatifs et qualitatifs obtenus au cours de l'échantillonnage de *Monochamus* en France afin d'essayer de comprendre leur distribution géographique et leurs préférences bioécologiques. Dans la deuxième partie de ce chapitre les préférences de *M. galloprovincialis* pour deux espèces d'hôte, *P. sylvestris* et *P. pinaster*, sont testées au laboratoire et les résultats sont comparés avec ceux sur le terrain.

II.I Distribution géographique et arbres hôtes

Les résultats de la campagne de piégeage (2003 et 2004) effectuée sur 40 sites en France ont montré la présence de *Monochamus* sur 38 sites. La répartition des captures est présentée dans la Figure 6. *M. galloprovincialis* a été capturé sur 24 sites, 31,17% des individus ont été capturés en chasse à vue et 68,83% à l'aide de pièges attractifs (Tableau 2). Tous les individus (25) de *M. sutor* ont été capturés en chasse à vue sur 10 sites (Tableau 2). Aucun *M. sartor* n'a été piégé lors de cette campagne. Ces arbres pièges ainsi que la chasse à vue nous ont aidé à compléter les résultats de pièges mais n'ont pas pu être interprétés par eux même parce que les captures issues de ces méthodes dépendent beaucoup des circonstances et les conditions locales.

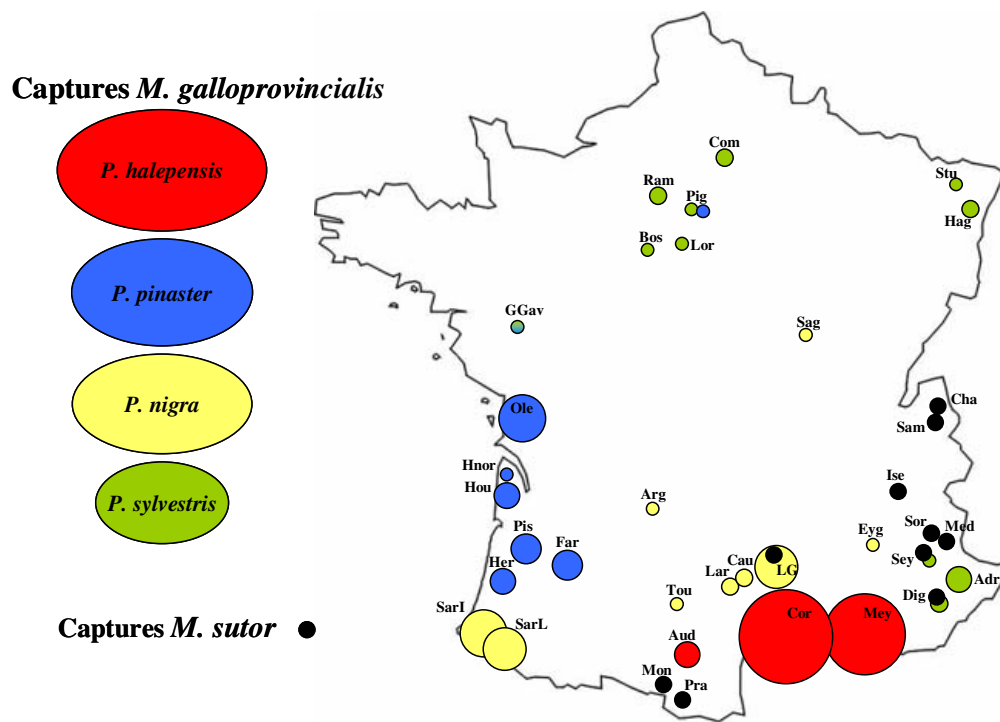


Figure 6. Carte de répartition des captures de *Monochamus* en France chasse à vue et pièges attractifs confondus (campagne de piégeage 2003-2004). Les essences hôtes ne sont pas représentées pour les captures en chasse à vue.

Tableau 2. Échantillonnage de *Monochamus* en 2004, avec les pièges et en chasse à vue (CàV). Les codes correspondent à ceux donnés sur la carte Figure 6.

Collecteurs	Commune	Nbre <i>M. g</i> (pièges)	Nb individus (CàV)	Essence	Code
Ansaunaud	St-Jean-de-Bruel (12)	2		<i>P.nigra</i>	Cau
Ansaunaud	Larzac		2 <i>M. galloprovincialis</i>	<i>P.nigra</i>	Lar
Delpont	Houeillès (47)	5		<i>P.pinaster</i>	Far
Coste	Hourtin (33)	1		<i>P.pinaster</i>	Hou
Hautlock	Herm (40)	4		<i>P.pinaster</i>	Her
Ninosque	Pissos (40)	5		<i>P.pinaster</i>	Pis
Van Meer	Sare (64)	4	10 <i>M. galloprovincialis</i>	<i>P.laricio</i>	SarI
Van Meer	Sare (64)	2		<i>P.laricio</i>	SarL
Belloir	Le Gavre (44)	1		Autres	Gav
Germain	Arbonne-la-Forêt (77)	1		<i>P.sylv/P.pinas</i>	Pig
Jarsaillon	Rambouillet (78)	1		<i>P.sylvestris</i>	Ram
Mure	Compiègne (60)	1	1 <i>M. galloprovincialis</i>	<i>P.sylvestris</i>	Com
Pelloquin	St-Georges-d'Oléron (17)	6		<i>P.pinaster</i>	Ole
auteurs	Lorris (45)	1	22 <i>M. galloprovincialis</i>	<i>P.sylvestris</i>	Lor
Mouthiez	Prenouvellon (41)		1 <i>M. galloprovincialis</i>	-	Bos
Huttinger	Savigny-les-Beaune (21)	1		<i>P.nigra</i>	Sag
Schmuck	Sturzelbronn (57)	1		<i>P.sylvestris</i>	Stu
Dorfer	Haguenau	1		<i>P.sylvestris</i>	Hag
Fee	Rosans (05)	1		<i>P.nigra</i>	Eyg
Fee	Rosans (05)		1 <i>M. sutor</i>	<i>P.nigra</i>	Sor
Girard	St-Jean-de-Cornies (34)	37		<i>P.halepensis</i>	Cor
Hintzy	Meyrargues (13)	26		<i>P.halepensis</i>	Mey
Micas et					
Rougon	St-André-les-Alpes (04)	1	5 <i>M. galloprovincialis</i>	<i>P.sylvestris</i>	Adr
Rougon	Verdaches (04)		5 <i>M. galloprovincialis</i>	<i>P.sylvestris</i>	Ver
	Seyne (04)				
Rougon	(Le Faut 1360m)		20 <i>M. sutor</i>	<i>P.sylvestris</i>	Sey
Rullière	Le Vigan (30)	5	1 <i>M. sutor</i>	<i>P.nigra</i>	LG
Simon	Chatel (04) (Près la Joux)		2 <i>M. sutor</i>	Grumes d'épicéa	Cha
Brustel	Foufroide (11)		4 <i>M. galloprovincialis</i>	<i>P.halepensis</i>	Aud
	Toulouse		1 <i>M. galloprovincialis</i>	<i>P.nigra</i>	Tou
Micas	Meollans Revel (04)		2 <i>M. sutor</i>	<i>P.sylvestris</i>	Med
Micas	Sorbiers		1 <i>M. sutor</i>	<i>P.sylvestris</i>	Sor
Micas	Digne (Les Bains)		1 <i>M. sutor</i>	<i>P.sylvestris</i>	Dig
Simon	2		Chatel (Près la Joux)	<i>Picea abies</i>	Cha
	Samoens		2 <i>M. sutor</i>		Sam
	Montels, Midi-Pyrénées		1 <i>M. sutor</i>		Mon
	Prades		1 <i>M. sutor</i>		Pra
	Isere 1260m		1 <i>M. sutor</i>		Ise
	Digne (Les Bains)		1 <i>M. sutor</i>		Dig

L'efficacité des pièges (analyses B. Vincent) a été significativement plus élevée avec les attractifs éthanol, α -pinène et mélange de phéromones d'*Ips* (ipsénol et ipsdiénol) qu'en l'absence de ces phéromones ($H_{kruskal-wallis}=10,98$; $ddl=2$; $p=0,004$). En moyenne $0,07\pm 0,05$ spécimens ont été capturés par piège sans phéromones, contre $0,90\pm 0,29$ par piège avec phéromones en tube et $1,46\pm 0,60$ par piège avec phéromones en capsule.

D'après les analyses de B. Vincent, sur l'ensemble des sites, le nombre moyen d'individus capturés par piège (analyse portant uniquement sur les pièges contenant des phéromones d'*Ips*) a été corrélé positivement et de manière significative aux températures annuelles (2003 - 2004) moyennes (Pearson : $r = 0,67$; $p < 0,001$), minimales ($r = 0,69$; $p < 0,001$) et maximales ($r = 0,62$; $p < 0,001$) (Figure 7). En revanche, aucune corrélation n'a été obtenue avec les précipitations totales de l'année et l'âge du peuplement.

Le nombre d'individus capturés par piège a été significativement plus faible dans les peuplements en bon état sanitaire que dans les peuplements en moyen ($H_{\text{kruskal-wallis}} = 13,02$; ddl = 1 ; $p = 0,0003$) et en mauvais état sanitaire ($H_{\text{kruskal-wallis}} = 7,97$; ddl = 1 ; $p = 0,005$). Il a été aussi significativement différent entre essences hôtes ($H_{\text{kruskal-wallis}} = 15,17$; ddl = 6 ; $p = 0,019$), les captures étant majoritaires avec *P. halepensis*, *P. pinaster* et *P. nigra* (*nigra* et *laricio*) (Figure 7).

Les résultats sont similaires si l'on ne considère que les sites où les insectes *M. galloprovincialis* étaient présents (capturés au moins une fois dans la localité), et si les points extrêmes correspondant aux 2 seules localités présentant *P. halepensis* sont retirés.

La campagne de piégeage en France a donc confirmé l'efficacité des pièges contenant des phéromones d'*Ips* ce qui est en accord avec des études similaires menées en Espagne et aux Etats-Unis (Allison et al., 2001; Ibeas et al., 2007; Miller, 2006; Pajares et al., 2004). Ce résultat reflète la situation naturelle où les *Monochamus* sont attirés par les arbres préalablement attaqués par différentes espèces d'*Ips* (Allison et al., 2001; Sousa et al., 2002). Nous avons utilisé les captures par piégeage pour apprécier la distribution de l'espèce *M. galloprovincialis* en France en nous basant sur un critère présence/absence. En revanche les résultats quantitatifs ont été difficiles à utiliser. Le nombre de captures variait en particulier selon la proximité des coupes forestières, celles-ci exerçant un fort effet de concurrence vis-à-vis des pièges. En effet, ravageurs secondaires, les *Monochamus* sont attirés par les odeurs des pins affaiblis ou blessés (Fan et al., 2007; Hellrigl, 1971; Miller, 2006; Saint-Germain et al., 2004).

M. galloprovincialis a été trouvé sur tout le territoire français à l'exception du Centre (Massif Central) alors que l'échantillonnage portait sur quatre sites (voir figure 4 dans matériel et méthodes) avec trois à quatre pièges par site comme pour le reste de localités échantillonnées en France. L'espèce s'est confirmée oligophage (se nourrissant et se développant sur des hôtes de genres différents appartenant à une seule famille, (Lindelöw and Björkman, 2001)) (Hellrigl, 1971; Picard, 1929; Piscart et al., 2005; Portevin, 1934; Villiers, 1978; Vives, 2000). On l'a trouvé sur *Pinus nigra* (var. *nigra* et var. *austriaca*), *P. sylvestris*, *P. halepensis* et *P. pinaster*,

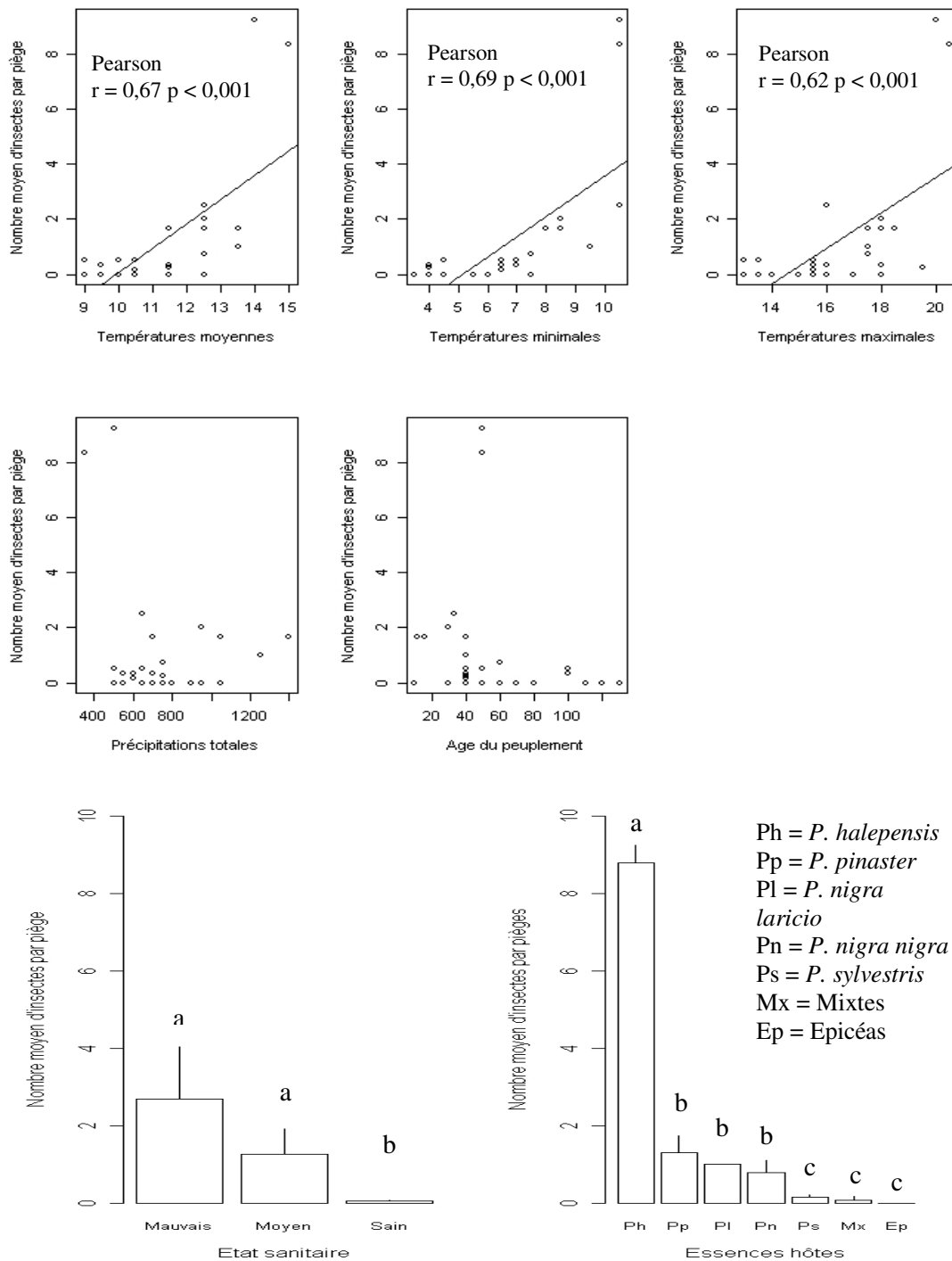


Figure 7. Relations entre, d'une part le nombre moyen d'insectes capturés par piège, au cours de l'été 2004 sur l'ensemble des localités étudiées, et d'autre part les moyennes des températures (de septembre 2003 à septembre 2004) (moyennes, minimales, maximales), les précipitations totales (septembre 2003 à septembre 2004), l'âge du peuplement, l'état sanitaire du peuplement et les essences hôtes. Les barres verticales correspondent à l'erreur standard. Les histogrammes affectés des mêmes lettres correspondent à des valeurs qui ne diffèrent pas significativement ($p \geq 0,05$) les unes des autres (Analyses B. Vincent).

avec toutefois des récoltes plus abondantes sur *P. pinaster* et *P. halepensis*. Cependant Naves et al. (2006a) ont suggéré, dans une étude de préférence d'hôtes, que *M. galloprovincialis* préférait se nourrir et pondre sur *P. sylvestris* mais leurs résultats concernant l'oviposition n'étaient pas significatifs. La majorité des adultes a été capturée dans le Sud Ouest et le Sud Est de la France, régions où *P. pinaster* et *P. halepensis* sont majoritaires, alors que les localités étaient réparties partout en France sauf le Nord Ouest. D'après nos observations, la température influence positivement la distribution de l'espèce. Selon Picard (1929), les Cerambycidae ont besoin d'une assez grande chaleur estivale tandis qu'ils supportent sans beaucoup de difficultés les hivers froids. C'est probablement pour cela que les départements français du Nord Ouest à hivers doux et étés peu chauds possèdent une faune pauvre tandis que ceux de l'Est, à climat continental en abritent une bien plus riche (Villiers, 1978).

La répartition géographique des arbres hôtes est aussi conditionnée par les facteurs climatiques (température notamment). La distribution des températures explique donc sans doute l'abondance plus grande des insectes dans les forêts de *P. pinaster* et *P. halepensis*. Dans ces conditions, le réchauffement climatique pourrait donc rapidement élargir vers le Nord l'aire de distribution de *M. galloprovincialis*, même si celle de *P. halepensis* et *P. pinaster* s'étend plus lentement. Des expériences de préférence d'hôte au laboratoire sous différentes températures permettraient d'analyser plus précisément l'influence des conditions bioclimatiques sur la flexibilité d'adaptation de cet insecte.

II.II « Préférences de nutrition et de ponte de *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) entre ses deux principaux hôtes *Pinus sylvestris* et *P. pinaster*. »

« *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) feeding and oviposition preferences between its main hosts *Pinus sylvestris* and *P. pinaster*. »

F.A. Koutroumpa, A. Sallé, F. Lieutier, G. Roux-Morabito.

(Article en préparation)

Les *Monochamus* sont des espèces oligophages, c'est-à-dire qu'elles peuvent se développer sur des hôtes de genres différents mais appartenant à une même famille botanique, (Lindelöw and Björkman, 2001). En Europe on les trouve majoritairement sur les arbres du genre *Pinus*. En France l'espèce la plus commune est *M. galloprovincialis*. On la trouve dans le Sud de l'Europe sur plusieurs espèces méditerranéennes de pins, majoritairement *P. pinaster*, tandis qu'au Nord de l'Europe, elle est trouvée essentiellement sur *P. sylvestris* et occasionnellement, sous sa forme *M. g. pistora*, sur *Picea abies*.

La présente étude s'insère dans la problématique générale de la mise au point d'une méthode de surveillance, de suivi et de contrôle d'une invasion éventuelle du nématode du Pin et se focalise sur les vecteurs de ce dernier. L'étude précédente ayant permis de constater que *M. galloprovincialis* se trouvait majoritairement dans les peuplements de *P. pinaster* du Sud de la France, on s'est intéressé aux préférences de *M. galloprovincialis* vis-à-vis de cette essence, en comparaison avec le Pin sylvestre, essence majoritaire dans la partie nord de la France et en altitude. Les paramètres testés ont été la nutrition de maturation des adultes et la ponte. Le développement larvaire a aussi été suivi. Les expérimentations ont été réalisées au laboratoire sur des rameaux (nutrition de maturation) ou sur des rondins (ponte et développement larvaire).

Les jeunes adultes en maturation ont consommé une plus grande surface d'écorce de *P. sylvestris* que de *P. pinaster*. Ce résultat est semblable à ceux rapportés pour les populations portugaises (Naves et al., 2006a).

Le nombre d'œufs pondus était plus élevé sur *P. sylvestris* que sur *P. pinaster*, alors que Naves et al. (2006a) n'avaient pas trouvé de différences significatives au Portugal. Le taux de survie n'est pas apparu différent entre les deux essences. Bien que les larves aient survécu aussi bien sur *P. sylvestris* que sur *P. pinaster*, un retard de développement a été observé sur les rondins de *P. pinaster* alors qu'aucune différence n'avait été observée au Portugal en ce qui concerne le nombre de jours nécessaires pour l'émergence des adultes (Naves et al., 2006a). Cependant, nos précédentes expériences sur le cycle biologique ont montré des possibilités de rattrapage pour les larves tardives, conduisant à une émergence groupée des adultes. Les différences de poids et de taille des larves (larves plus grosses et plus grandes chez *P. pinaster*) seraient plutôt dues à des différences de dimensions des rondins d'élevage qu'à l'essence.

Une meilleure adéquation de *P. sylvestris* à la nutrition et à la ponte a donc été observée. Toutefois, comme les adultes utilisés dans les tests provenaient de forêts de Pin sylvestre, on ne peut exclure leur conditionnement par leur substrat d'évolution larvaire. Toutefois, Naves et al. (2006a) ont obtenu des résultats similaires pour des populations

portugaises issues de forêts de Pin maritime. Des expérimentations complémentaires avec des populations françaises issues de Pin maritime devraient permettre d'apporter des précisions.

***Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) feeding and oviposition preferences between its main hosts *Pinus sylvestris* and *P. pinaster*.**

F.A. Koutroumpa, A. Sallé, F. Lieutier, G. Roux-Morabito.

Abstract

Considering the role of *Monochamus galloprovincialis* in the dispersion of the pine wood nematode, defining the host spectrum and preference of *M. galloprovincialis* is of primary importance for forest management. Therefore, bioassays aiming at defining the feeding and oviposition preferences were performed and larval development was studied, on *P. sylvestris* and *P. pinaster*, under laboratory conditions. Both nutrition and oviposition were statistically more important on *P. sylvestris* but no difference was found with larval survival. Larvae developed more rapidly in *P. sylvestris* than in *P. pinaster* but they were bigger in *P. pinaster*, this result depending more on log size than on host tree species. Results are discussed regarding the relations between larval optimal host and adults' choice.

1. Introduction

Monochamus galloprovincialis (Olivier, 1795) (Coleoptera: Cerambycidae), widely known as the pine sawyer, feeds and develops mainly on *Pinus* tree species (Hellrigl, 1971; Picard, 1929; Portevin, 1934; Sama, 2002; Villiers, 1978). This species was considered as a secondary forest pest. Nonetheless, a Pest Risk Analysis on the European Union territory recognized *M. galloprovincialis* as potential vector for the Pine Wood Nematode (PWN) *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Bühner) Nickle (Nematoda: Aphelenchoidea) in Europe (Evans et al., 1996). This nematode is responsible of the Pine Wilt Disease (PWD) and has already devastated hundreds of millions of hectares of pine stands in Asia (Mamiya, 1988). Following the introduction of *B. xylophilus* in Portugal in 1999 in *Pinus pinaster* stands, early records mentioned its association with *M. galloprovincialis* confirming its role as a vector of the nematode (Sousa et al., 2001; Sousa et al., 2002). *Monochamus galloprovincialis* adults transport and transmit the PWN during their obligatory maturation nutrition on healthy pine trees and during their oviposition on weakened or recently dead trees. These two periods of the vector's life cycle correspond to two different dispersal periods conditioned by research of adequate hosts and consequently favour the nematode's dispersion.

Considering its role in the dispersion of the nematode, defining host spectrum and preference of *M. galloprovincialis* is of primary importance for forest management. In Portugal only *P. pinaster* has been found to be infested by the nematode, although other *Pinus* species (*P. pinea* and *P. halepensis*) grow in the infested zone (Mota et al., 1999; Naves et al., 2006). *P. sylvestris* is the most frequent host of *M. galloprovincialis* in Northern and Central Europe while its Southern and Mediterranean populations are more frequently collected on *P. pinaster* Aiton and *P. halepensis* Miller (Francardi et al., 2000; Hellrigl, 1971). A recent host choice experiment under laboratory conditions showed that Portuguese populations of *M. galloprovincialis* exhibit preferences for *P. sylvestris* among several pine species for nutrition, although the absence of preference among host species tested as oviposition substrates demonstrated that multiple hosts can be adequate for oviposition (Naves et al., 2006).

The southern limit of the *P. sylvestris* range is on the Iberian Peninsula (Mirov, 1967; Richardson and Rundel, 1998) while *P. pinaster* is a Western Mediterranean species occurring up to the Atlantic coasts of France and its Northern limits are beneath Northern France. The majority of conifer trees composing the French forests are *P. pinaster* (1.4 Mha) and *P. sylvestris* (1.1 Mha) (FAO, 2007). Furthermore, in France both the Mediterranean form, *M. g. galloprovincialis*, and the more Northern European form, *M. g. pistora*, exist (Villiers, 1978; Vives, 2000) generating a great risk for the country in case of an eventual introduction of the PWN on its territory. The adequate climatic conditions for all three partners of the PWD (nematode, hosts and vectors) in France would make it a pathway allowing the propagation of the PWD from the Iberian Peninsula to the rest of Europe. Therefore, a surveillance network and management strategies, with particular attention on the areas where the insect and its preferable hosts exist, should be developed.

In order to improve the PWN surveillance campaign in Europe, we investigated whether French individuals of *M. galloprovincialis* exhibit significant preferences between the two most common *Pinus* species in France, *P. pinaster* and *P. sylvestris*, when given the choice for nutrition and oviposition. Experiments under laboratory conditions were conducted in order to gather information on the insects' ability to adapt to other host species than their larval host during feeding and oviposition. We also compared the larval performances between the two pine species.

2. Materials and methods

2.1. Experimental device

All *M. galloprovincialis* adults used in this study originated from a laboratory population bred on *P. sylvestris*. It was not possible to obtain a sufficiently high number of insects originated from *P. pinaster* so interpretations of the results of this paper were discussed in comparison with those of Naves (2006) on insects coming from *P. pinaster*. All beetles emerged in June 2006. Pine branches and logs used for nutrition and oviposition essays were collected from the Trois Pignons forest (Fontainebleau France, 48°24' N and 02°33' E). Larger branches (diameter: 5 ± 0.1 cm) of healthy-looking *P. sylvestris* and *P. pinaster* (trees about 40years old) were collected at the end of June 2006 cut into logs and brought to the laboratory as oviposition substrates (Table 2). Young shoots and thinner branches (up to 3 cm diameter) were also brought to the laboratory as feeding substrates. Branches for nutrition were put in containers whose bottom was filled with water. Extremities of logs were sealed with paraffin to prevent desiccation and kept at 4°C until use. Both nutrition and oviposition experiments occurred at 21°C in the laboratory.

For the feeding preference test, between *P. sylvestris* and *P. pinaster*, 38 adults (21 males and 17 females), which body length was previously measured, were placed in plastic boxes (26.5 x 13.5 x 7.5 cm) in which a 5 cm diameter hole had been prepared and covered with 1 mm mesh tulle. Each adult was provided with about the same quantity of *P. sylvestris* and *P. pinaster* branches, needles and sometimes cones. The two pines material was placed separately at the two extremities of the box. Moistened paper was also added in the boxes. After 36 h (36hA) branches, needles and cones were replaced by new ones and were checked out for feeding wounds. The number of needles cut down and the total length of needles eaten was recorded. The feeding activity on the new substrate was also checked by measuring bites surface after another 36 h (36hB).

Test for oviposition preference between *P. sylvestris* and *P. pinaster* was performed with females that had fed either only on *P. sylvestris* or on both *P. sylvestris* and *P. pinaster* (females from the previous feeding preference test) during their maturation nutrition for about twenty days. Each female was kept with one male in a plastic box (89 x 38 x 29 cm) covered in its whole surface by a plastic net (1 mm mesh) in the presence of a *P. sylvestris* and a *P. pinaster* log as oviposition substrate. Some shoots of both *Pinus* species were also added for nutrition. The logs were placed to the opposite ends of the box, separated by the shoots. The adults were placed in the middle of the box and were allowed to circulate freely in it and lay eggs during 48 h. Logs were finally removed and checked for the occurrence of oviposition

scars. Oviposition scars with jelly, secreted by the females during oviposition procedures, were considered to contain at least one egg according to and Anbutsu and Togashi (1997). The logs supporting eggs were placed in plastic containers (53 cm high and 47.5 cm in diameter) covered with tulle for aeration and protection from other woodborers attacks. Containers were stored outdoor during larval development, and sheltered from rain to avoid excessive fungal development. At the end of February, when most larvae had completed their development (Naves, 2007; Togashi, 1991; Togashi et al., 1994), logs were debarked and sliced to check for the occurrence of the different larval instars. Live larvae were also weighted and their body length was measured. After dissection the head capsule length and width were measured and, according to Koutroumpa et al. (submitted), used to determine the larval instar. The number of all larvae found alive in a previous from the L4 (final instar) was withdrawn from the total number of eggs laid (1) and the larval survival for the last instar (L4) was calculated dividing the number of larvae found alive as L4 by this number (1) and this separately by *Pinus* species.

2.2. Statistical analyses

The effect of sex and tree species on the adult nutrition (consumption of bark surface and quantity of needles eaten as well as number of needles cut down) was tested with a 2 way ANOVA. The effect of tree species on oviposition rates and on the larval size and survival was also investigated with a Kruskal-Wallis test. Pearson's correlation test was used to check for relationships between adult size and consumption parameters. It was also used to check for relationships among logs' parameters (surface and volume) and oviposition rate, larval survival and size variation among the different instars. Differences were considered significant for $P \leq 0.05$. Values are presented with their standard error. All statistical tests and calculations were performed with *R* statistical program (*R* Development Core Team, 2006).

3. Results

3.1. Feeding preference test

Fifteen individuals (41.7 %) fed only on *P. sylvestris* the first 36 h, thirteen (36.1 %) fed only on *P. pinaster* and seven (19.4 %) fed on both species. One individual did not try to feed. In 36hB most insects continued to feed on the same host as in the 36hA. However, the percentage was higher for those that had started their nutrition on *P. sylvestris*; 73.3 % continued feeding on *P. sylvestris* versus 38.5 % that continued to feed on *P. pinaster*. 42.8 % of the adults that had no special preference for a host species, at 36hA, continued their nutrition on both of them. The rest of the insects consumed either *P. sylvestris* or *P. pinaster* (28.6 %

each). When the first contact with a host species was not considered almost half of the adults fed on *P. sylvestris* (47.2%) while about the same number fed on *P. pinaster* or both pine species (25% and 27.8% respectively). Two males did not feed at all during the 72 h and were excluded from analyses. For the two sets of experiments (36hA and 36hB), no significant difference between *P. sylvestris* and *P. pinaster* was found for males and females that fed on *P. sylvestris* and *P. pinaster*, considered together or separately. The 2 way ANOVA (sex x essence) showed no effect of the sex on any of the tested parameters (bark surface, quantity of needles eaten and number of needles cut down) and this for any of the two pine species tested and for the two experiments (36hA and 36hB). On the contrary significantly more needles of *P. sylvestris* than of *P. pinaster* were cut down for the two experiments, while there was not significant difference on the bark surface and the quantity of needles eaten from the two pine species (Table 1).

Table 1. Mean consumption on the two conifers *P. sylvestris* and *P. pinaster* for the 36 *M. galloprovincialis* adults tested every 36h.

Species	Bark surface (cm ²)		Needles cut down		Needles length eaten (cm)		Cones bark surface (cm ²)	
	36hA	36hB	36hA	36hB	36hA	36hB	36hA	36hB
<i>P. sylvestris</i>	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.4	11 ± 3.2	22.2 ± 5.2	3.6 ± 1.1	7.3 ± 1.9	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0
<i>P. pinaster</i>	0.1 ± 0,1	0.2 ± 0,1	3.1 ± 0.7	4.6 ± 1.3	8.4 ± 2.8	5.3 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>P</i> value	NS	NS	0.0237	0.0017	NS	NS	NS	NS

P values are given for statistically significant results (NS=non significant)

Male and female adults had similar sizes (males: 18.0 ± 1.42 mm and females 19.5 ± 1.66 mm) and were, therefore, grouped for the following analyses. No correlation was evident between the adult size and the consumption of the different parameters tested (bark surface, quantity of needles eaten and number of needles cut down), for the two consecutive 36h and for the two pine species.

3.2. Oviposition preference test

A total of 601 eggs were laid, 202 on *P. pinaster* and 399 on *P. sylvestris*. No significant differences of oviposition rate and larval survival were found between the females that fed only on *P. sylvestris* or on both pine species during their maturation nutrition. Data were then pooled for further analyses.

A significant difference, in favor of *P. sylvestris*, was found for the number of eggs laid (66.6% on *P. sylvestris* and 33.4% on *P. pinaster*) and for the number of larvae found alive, but no significant difference was found for the larval survival per log between *P. sylvestris* and *P.*

pinaster (Table 2). The number of eggs laid was correlated with the number of larvae found alive (Figure 1). The survival was negatively related to the egg density in the logs (Figure 2) but the density did not vary with the *Pinus* species. Furthermore, significant difference was found for the surface and the volume of the logs corresponding to the two hosts (Table 2). Surface and volume of the logs were not related to the number of eggs laid and of larvae found alive in the two host species.

Table 2. Mean and *P* values of log parameters, eggs laid, number of larvae found alive and their survival per *Pinus* spp.

	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. pinaster</i>	<i>P</i>
Log surface	610.8 ± 17.4	560.7 ± 21.0	0.004
Log volume	822.9 ± 49.9	696.9 ± 59.9	0.0006
Eggs laid	9.3 ± 1.2	4.8 ± 1	0.0006
Larvae alive	3.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.0004
Survival	0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.06	NS

P values are given for statistically significant results (NS=non significant)

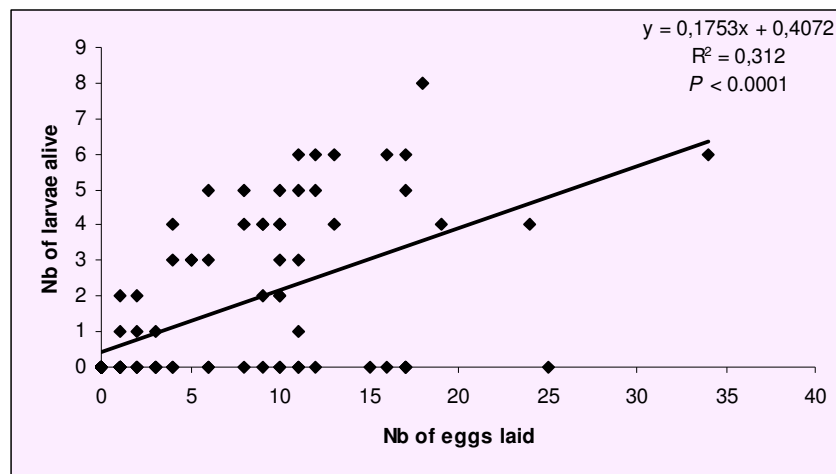


Figure 1. Correlation of number of eggs laid per log and of the number of larvae found alive in each of these logs.

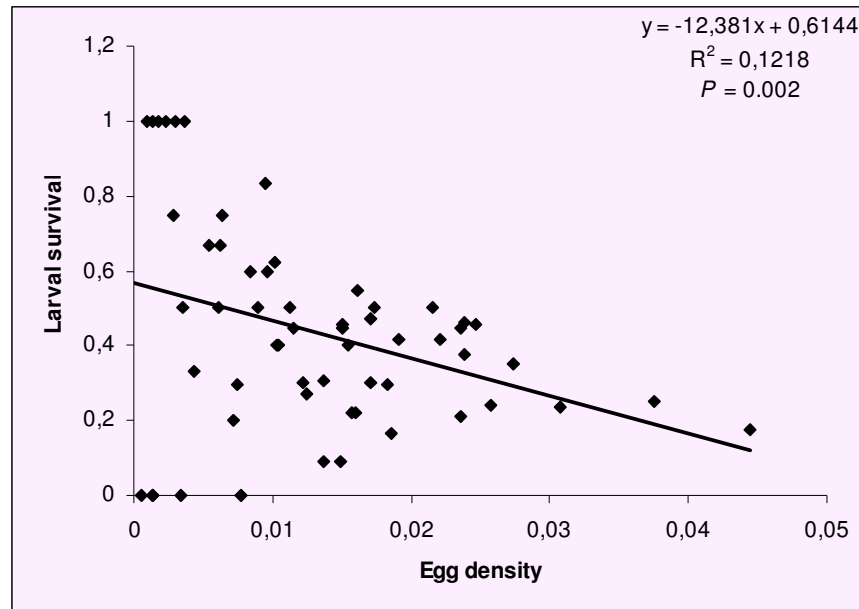


Figure 2. Correlation of egg density on the logs and survival rate per log.

No significant difference was found between the L3 and L4 larvae head capsule width between the two pine species. However, a difference in the body length and the weight of the L4 was found in favor of *P. pinaster* (Table 3). As a *P. pinaster* log was found to be much bigger than the rest of the logs, and contained only big L4 larvae, it was withdrawn from the analyses. The differences between logs were then not significant and no correlation was found between logs size and the length and weight of the L4 larvae.

Table 3. Mean values of last instar (L4) larvae body length and weight when developed in two different hosts *P. sylvestris* and *P. pinaster*.

L4	Length	Weight
<i>P. sylvestris</i>	25.17 ± 0.52	0.25 ± 0.01
<i>P. pinaster</i>	28.67 ± 1.16	0.35 ± 0.03
<i>P</i> value	0.0026	0.0014

P values are given for statistically significant results

Larvae developing in *P. sylvestris* and *P. pinaster* differed in their development speed (Figure 3). More larvae reached the L4 instar when developed in *P. sylvestris* than larvae in *P. pinaster*. The survival ratios for the L4 instar were 0.28 and 0.18 for *P. sylvestris* and *P. pinaster* respectively.

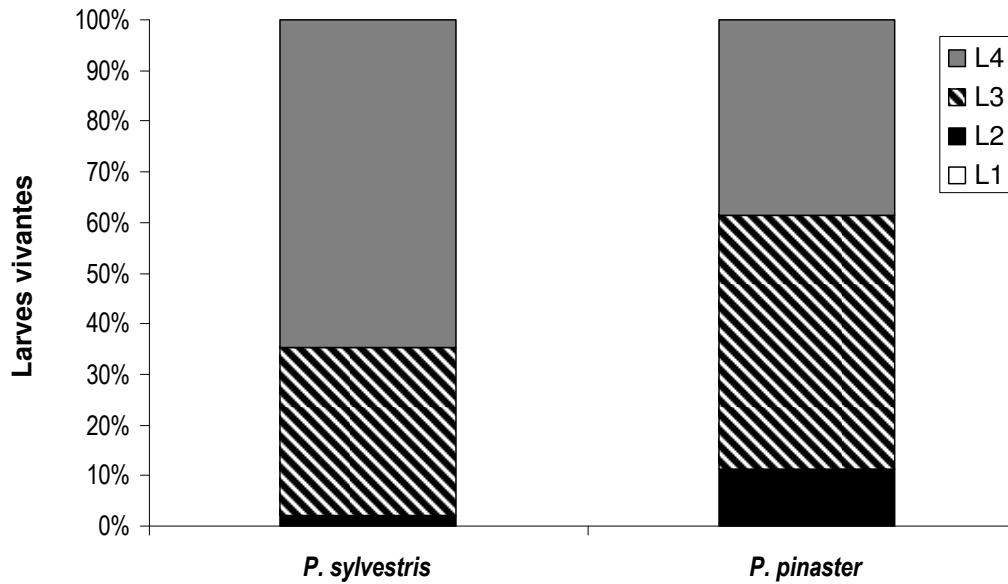


Figure 3. Percentage of *M. galloprovincialis* larvae found alive in *P. sylvestris* and *P. pinaster* for each larval instar (L1, L2, L3 and L4).

4. Discussion

Our experiment showed that although adults of *M. galloprovincialis* consumed both *P. sylvestris* and *P. pinaster*, they cut down more needles from *P. sylvestris*. Consequently they preferred feeding and laying eggs on the pine species on which they developed. This follows the Hopkins (1917) general rule according to which adult insects should show preference for feeding and oviposition for the host on which they developed as larvae. However, Naves et al. (2006) found also a feeding preference for *P. sylvestris* even though their adults had emerged from *P. pinaster* while no significant difference existed in the choice of oviposition substrate. Therefore, *P. sylvestris* might be the preferred host for maturation feeding of *M. galloprovincialis* and the oviposition might have been influenced by the larval host species. However, attention should be given when these results are reflected on natural environment.

Concerning larval final instar survival in the two pine species logs, at the end of winter that corresponds to the end of the diapause (Naves, 2007; Togashi, 1991; Togashi et al., 1994), we found no differences in survival rates between larvae developing in *P. sylvestris* and in *P. pinaster*. As the number of eggs laid was correlated with the number of larvae found alive, the number of alive larvae was higher in *P. sylvestris* than in *P. pinaster* since the number of eggs laid was higher in this species. Furthermore, retarded development was obvious for larvae developing in *P. pinaster*. This result suggests that development of the *M. galloprovincialis* individuals studied here was more affected by the host than development of the Portuguese

individuals of this species that showed no difference in their emergence time between the two conifers (Naves et al., 2006). However, it has been shown that adult emergence occurs within a narrow period (61 days) even though all four larval instars are present in spring (Koutroumpa et al., submitted; Naves, 2007). Therefore, maybe delayed larvae in *P. pinaster* logs would have emerged as adults at the same time as larvae in *P. sylvestris*.

The Portuguese *M. galloprovincialis* that emerged after developing in *P. pinaster* logs had a significantly more important size compared to those that developed in *P. sylvestris* (Naves et al., 2006a). In contrast, French *M. galloprovincialis* last instar larvae size, even if it appeared bigger when developed in *P. pinaster* logs, it was not significantly different between the *P. sylvestris* and *P. pinaster* and seemed to be more influence by the size of the log.

Our findings, under laboratory conditions and those of Naves et al. (2006) on the same species, differ from observations in the field (personal observations; Hellrigl, 1971) that indicate preference of Southern populations of *Monochamus* on *P. pinaster* and Northern ones on *P. sylvestris*. Therefore, certainly other parameters than tree species can interfere in the distribution of a species, for example temperature. According to Villiers (1978) the Cerambycidae beetles need rather hot summers for their development and they can easily support cold winters. This is probably the reason why the North-East of France has a more diversified fauna than the North-West (Villiers, 1978). *M. galloprovincialis* found most abundantly in France is the low altitude Mediterranean form *M. g. galloprovincialis* (form found in altitude and in Northern Europe *M. g. pistor*) (Hellrigl, 1971). Naturally the geographical distribution of this form coincides more with the one of its Mediterranean hosts, explaining the more abundant occurrence on *P. pinaster* populations even though when in contact with *P. sylvestris* (ex laboratory tests) its preference is clearly declared. Furthermore, no genetic structure by host species has been proved for this species populations while geography seemed to influence more the genetic relations between the populations (Koutroumpa et al., submitted). Consequently, even though a preference for *P. sylvestris* was evident by our results, host does not seem to restrict this species and the global warming could have dangerous influence on its geographical expansion, from Mediterranean populations to more Northern ones. Similar pattern has already been observed for other insects like the *Thaumetopoea pityocampa* (Battisti et al., 2005). The impact of the climate change has been studied for 67 forest tree species in France and it has been found that the extension of the Atlantic and the Mediterranean species is possible while a regression of the mountain species range is expected (CARBOFOR project 2004).

References

- Anbutsu, H., Togashi, K., 1997. Oviposition behaviour and response on the oviposition scars occupied by eggs in *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 32, 541-549.
- Battisti, A., Stastny, M., Netherer, S., Robinet, C., Schopf, A., Roques, A., Larsson, S., 2005. Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures. Ecol. Appl. 15, 2084-2096.
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J., Magnusson, C., 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. Bull. OEPP 26, 199-249.
- Francardi, V., Pennacchio, F., Roversi, P.F., Binazzi, A., Leccese, A. (2000) Distribution and abundance of *Monochamus* species in Italy. XXI International Congress of Entomology, 484.
- Hellrigl, K.G., 1971. La bionomie des espèces de *Monochamus* (Coleoptera, Cerambycidae) et leur importance pour la sylviculture et l'économie du bois. Redia 52, 367-511.
- Hopkins, A.D., 1917. A discussion of HG Hewitt's paper on "insect behaviour". J. Econ. Entomol. 10, 92-93.
- Koutroumpa, F.A., Vincent, B., Roux-Morabito, G., Martin, C., Lieutier, F., submitted. Fecundity and larval development of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) in experimental breeding. Ann. For. Sci.
- Mamiya, Y., 1988. History of Pine Wilt Disease in Japan. J. Nematol. 20, 219-226.
- Mirov, N.T., 1967. The genus *Pinus*, New York, NY, USA
- Mota, M.M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa, E., 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. Nematology 1, 727-734.
- Naves, P., 2007. Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) and its role as vector of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda, Parasitaphelenchidae) in Portugal Doutoramento em Biologia (Biologia Populacional), Faculdade de Ciências.
- Naves, P.M., Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2006. Feeding and oviposition preferences of *Monochamus galloprovincialis* for certain conifers under laboratory conditions. Entomol. Exp. Appl. 120, 99-104.
- Picard, F. (1929) Coléoptères Cerambycidae. In: *Faune de France* (ed. LeChevalier, P.), Paris.
- Portevin, G. (1934) Tomme III. Polyphaga : Heteromera, Phytophaga. In: *Histoire naturelle des Coléoptères de France* (ed. LeChevalier, P.F.), Paris.
- R Development Core Team (2006) *R* : a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Richardson, D.M., Rundel, P.W. (1998) Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. In: *Ecology and biogeography of Pinus* (ed. Richardson, D.M.), pp. 3-46, Cambridge, UK.
- Sama, G., 2002. Atlas of the Cerambycidae of Europe and the Méditerrananean Area. Vit Kabourek, Zlín, 173pp.
- Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifacio, L., Mota, M.M., 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. Nematology 3, 89-91.

- Sousa, E., Naves, P., Bonifacio, L., Bravo, M.A., Penas, A.C., Pires, J., Serrao, M., 2002. Preliminary survey for insects associated with *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal. *Bull. OEPP* 32, 499-502.
- Togashi, K., 1991. Larval diapause termination of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) under natural conditions. *Appl. Entomol. Zool.* 26, 381-386.
- Togashi, K., Jikumaru, S., Taketsune, A., Takahashi, F., 1994. Termination of larval diapause in *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) under natural conditions. *J. Jpn. For. Soc.* 76, 30-34.
- Villiers, A. (1978) I. Cerambycidae. In: *Faune des Coléoptères de France* (ed. LeChevalier, P.), p. 611, Paris.
- Vives, E. (2000) Coleoptera Cerambycidae. In: *Fauna Iberica* (ed. Cientificas, M.N.d.C.N.C.S.d.I.), Madrid.

DEUXIEME PARTIE :

SYSTEMATIQUE ET STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS DE
MONOCHAMUS SPP.

INTRODUCTION

L'histoire de la taxonomie

La taxonomie est une science ancienne qui a débuté au temps des philosophes grecs, notamment avec Aristote qui a été le premier à essayer de classer les différents organismes et à utiliser le mot « γένος » (genre en grec) pour définir un groupe d'organismes similaires. Depuis cette époque, plusieurs scientifiques ont essayé d'améliorer la classification des organismes en utilisant des caractères fixes de leur anatomie. Le plus important d'entre eux est Carl Linnaeus qui est considéré comme le père de la taxonomie grâce aux deux innovations qu'il a apporté dans ce domaine. La première a été la création d'un système simple de nomenclature binomial. Ce système est basé sur un premier nom latin désignant le genre et un deuxième désignant le nom de l'espèce. Il a été publié dans la dixième édition du *Systema Naturae* (1758) et a été accepté par l'ensemble des scientifiques et est toujours utilisé à ce jour. La deuxième innovation a été la classification des organismes en les hiérarchisant dans trois Règnes divisés ensuite en Classes, Ordres, genres, espèces et « variétés » (taxa de plus bas rang). Fabricius, Lamarck, Buffon, Cuvier, Latreille et beaucoup d'autres ont continué son œuvre qui a considérablement changé depuis. A l'origine, la taxonomie était basée sur la description des caractères externes (morphologie, écologie) communs entre les organismes les plus proches et avait comme promoteur la curiosité humaine et l'envie de connaître son environnement. Aujourd'hui, cette science évolue encore et son évolution est loin d'être terminée. L'accumulation des connaissances et les nouvelles techniques moléculaires ont permis d'approfondir les premières observations qui dans certains cas ont été reconsidérées. Toutes ces innovations ont permis non seulement de délimiter les espèces mais aussi de répondre à des énigmes concernant leur évolution et leurs relations génétiques, démontrant que la taxonomie est un outil de grande valeur pour la compréhension et la protection de la vie.

Rubinoff et Sperling (2004) ont souligné l'importance de la taxonomie pour l'identification et la conservation des espèces menacées, comme par exemple la sous espèce *Hemileuca electra electra* (Lepidoptera Saturniidae) dont l'habitat a été sérieusement réduit suite au développement urbain. D'autres publications insistent sur le fait que l'identification des écotypes ou des races d'hôtes d'une espèce nuisible est essentielle pour lutter efficacement contre ces espèces (Bourguet et al., 2000; Conord et al., 2006). L'identification taxonomique est rendue plus compliquée chez les insectes phytophages du fait qu'ils sont le

plus souvent oligophages ou polyphages (inféodés à plusieurs essences d'hôtes) et que l'on dénombre souvent des complexes d'espèces sœurs (espèces proches génétiquement) ou des espèces cryptiques (espèces différentes génétiquement mais morphologiquement semblables) (Kandul et al., 2004; Oliver et al., 2007; Pizzo et al., 2006; Rees et al., 2003; Rubinoff and Sperling, 2004). De plus, des facteurs anthropogéniques et le changement climatique, à l'origine de nombreuses invasions d'espèces exotiques, ont été partiellement responsables de certains cas de « pollution génétique » (Barilani et al., 2007; Rhymer and Simberloff, 1996) et par conséquent rendent difficile le travail du taxonomiste. Par exemple, la modification de l'habitat provoque l'augmentation des phénomènes d'hybridation et d'introgession et fissure l'isolement reproducteur entre les populations et les espèces. Ce mélange des différents taxons perturbe la procédure naturelle du flux génique; ainsi les caractères morphologiques spécifiques de chaque taxon sont maintenant partagés entre eux (Barilani et al., 2007; Du et al., 2005) pouvant aboutir à un autre type d'extinction, « l'extinction génétique » (Barilani et al., 2007; Rhymer and Simberloff, 1996).

Enfin, il est évident que de nos jours, les caractères morphologiques et écologiques ne sont pas, à eux seuls, suffisants pour résoudre les problèmes d'identification qui deviennent de plus en plus compliqués. Il est donc nécessaire d'étudier en complément d'autres marqueurs comme les marqueurs moléculaires qui se sont avérés des outils indispensables pour l'identification d'espèces à tous les niveaux de la classification et qui, de plus, sont capables de répondre à des questions évolutives pour les taxons considérés.

L' ADN mitochondrial, un outil indispensable pour la taxonomie ?

Les mitochondries occupent une position centrale dans la biologie des cellules et sont cruciales pour la vie comme on la connaît. La plupart des cellules eucaryotes contiennent un grand nombre de mitochondries lesquelles renferment leur propre ADN (ADNmt). Dans la cellule les mitochondries bougent, fusionnent et se divisent. Elles occupent en moyenne 25 % du volume total du cytoplasme. Trente sept gènes forment l'ADNmt. Vingt quatre de ces gènes sont impliqués dans la machinerie de traduction de l'ADNmt (22 ARNt et 2 ARNr) et les treize restant codent pour les sous-unités de la chaîne de transport des électrons où les carbohydrates et les acides gras sont oxydés pour donner du dioxyde de carbone, de l'eau et de l'ATP. L'ADN de ces organelles est également constitué d'une région non codante : la région de contrôle ou D-loop ; il s'agit de la partie du génome mitochondrial qui évolue le plus vite.

L'ADNmt a été utilisé pendant 25 ans pour des études d'écologie et de phylogéographie. Il s'agit d'une molécule unique avec des caractéristiques spécifiques, très différentes de ceux de l'ADN nucléaire (ADNnc) et qui l'ont rendue très attractive pour les chercheurs (Avisé et al., 1987; Ballard and Whitlock, 2004; Kerdelhué and Rasplus, 2002; Simon et al., 1994). Des caractéristiques comme son abondance, sa structure génétique simple (i.e. haploïdie) due à sa transmission uniparentale (maternelle pour la plupart des taxons), sa petite taille et l'absence d'introns et de recombinaison facilitent son isolement, son amplification et son séquençage. L'arrangement de ses gènes apparaît très stable entre les différentes classes taxonomiques ou phylla, permettant des comparaisons et l'utilisation d'amorces universelles (fragments de séquences identiques pour la majorité des organismes et qui facilitent l'amplification et le séquençage des spécimens même si aucun élément sur leurs séquences n'est au départ connu ; Simon et al. (1994), Bogdanovitz (1993)). De plus son évolution rapide (5 à 10 fois plus rapide que l'ADNnc) (Hewitt, 2001) est un avantage pour les études intraspécifiques ou entre espèces qui ont évolué très récemment. Dernièrement, quelques unes de ces différences avec l'ADNnc, qui jusqu'à présent ont été acceptées comme des règles pour les études moléculaires, ont été remises en cause par plusieurs auteurs qui ont mis en évidence qu'une seule molécule (ex ADNmt) ne suffit pas à répondre à toutes les questions concernant l'évolution (Roe and Sperling, 2007a). Le temps est venu de ré-évaluer le rôle de l'ADNmt, car même s'il reste un marqueur très utile pour les études évolutives, il est aujourd'hui nécessaire de favoriser l'utilisation de plus de marqueurs afin d'apporter des réponses plus proches de la réalité.

Malgré ses nombreuses qualités, l'ADNmt présente quelques inconvénients majeurs qui peuvent conduire à des biais significatifs dans les analyses phylogénétiques et perturber l'interprétation des résultats sur la démographie des populations et/ou l'histoire évolutive des espèces.

Deux de ces inconvénients sont :

- L'hétéroplasmie
- Les pseudogènes

L'hétéroplasmie

L'hétéroplasmie représente la coexistence de plus d'un génome dans une cellule ou dans une mitochondrie (Avisé et al., 1987; Ballard and Whitlock, 2004; Harry, 2001) (Figure 7).

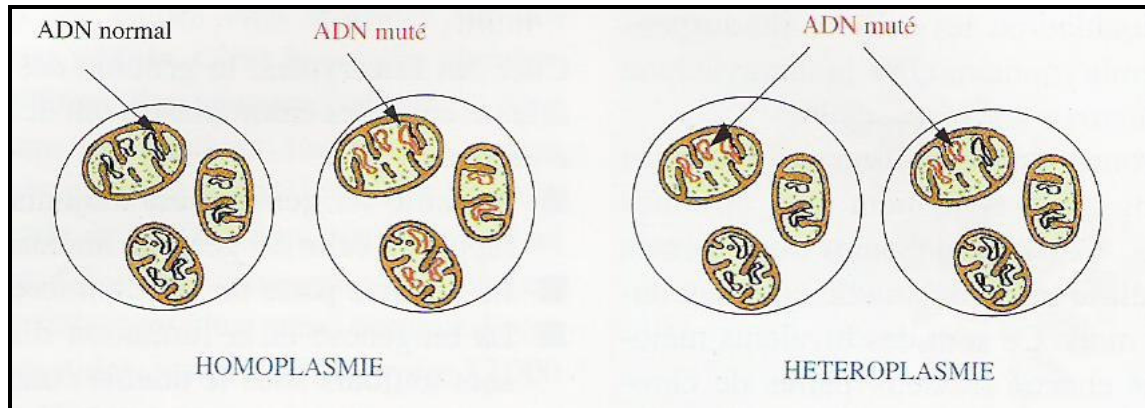


Figure 7. Une même cellule ou une même mitochondrie peut contenir des génomes identiques (homoplasme) ou différents (hétéroplasmie) (d'après Harry 2001).

Le phénomène d'hétéroplasmie semble contredire une des principales caractéristiques de l'ADNmt : l'hérédité uniparentale (=haploïdie). Ceci est possible par le processus de recombinaison (*a priori* absent de l'ADNmt, Birky 2001) et d'hybridation des différentes lignées. Normalement le linkage paternel est très rare ; les mitochondries proviennent presque exclusivement de l'ovocyte car les mitochondries des spermatozoïdes sont placées dans le flagelle et celui-ci, en général, ne pénètre pas dans l'ovocyte (Figure 8) (Chesser, 1998). Il a été démontré que, même quand les mitochondries arrivent à entrer dans l'ovocyte, elles disparaissent au cours de l'embryogenèse, éliminées par des protéines codées par le noyau (Chesser, 1998; Rand, 2001; Shitara et al., 2000). Cependant, chez certains animaux, une petite contribution mitochondriale paternelle (de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4}) peut être observée (Kondo et al., 1990; Rokas et al., 2003a; Schwartz and Vissing, 2002). Ceci reste controversé; dans la nature il a été démontré que chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, la recombinaison mitochondriale est possible dans un cadre de double transmission uniparentale de l'ADNmt (Cao et al., 2004a; Cao et al., 2004b; Ladoukakis and Zouros, 2001; Mizi et al., 2005; Rawson and Hilbish, 1995; Rawson et al., 1996; Zouros et al., 1994). La recombinaison est aussi considérée comme responsable de l'hétéroplasmie observée chez le poisson plat, *Platichthys flesus* (Hoarau et al., 2002). Sous conditions contrôlées au laboratoire, l'hérédité biparentale a été démontrée aussi chez la Drosophile (Kondo et al., 1990) et la souris (Kaneda

et al., 1995; Shitara et al., 1998; Shitara et al., 2000). Kvist et al. (2003) ont montré que l'hétéroplasmie trouvée dans la nature chez *Parus major* était d'origine paternel à cause d'hybridation.

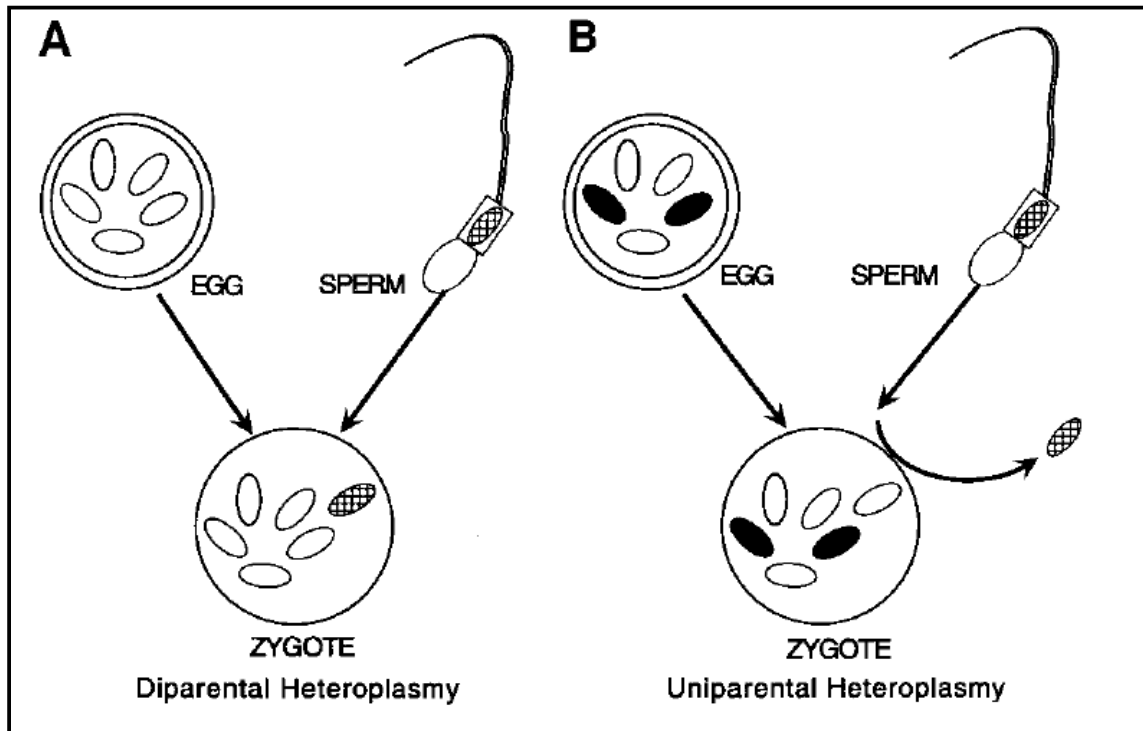


Figure 8. Diagramme représentant l'hétéroplasmie comme le résultat d'une hérédité biparentale (A) et comme le résultat d'une hérédité uniparentale (B). (d'après Cheeser 1998)

D'après Rand (2001), une autre cause d'hétéroplasmie serait tout simplement les mutations ponctuelles. Elles représenteraient une phase normale, obligatoire et transitionnelle pendant l'évolution de l'ADNmt. Roze et al. (2005) considèrent qu'une fois que la mutation apparaît dans l'ADNmt, la cellule devient hétéroplasmique car elle contient différents types alléliques mitochondriaux. Cependant la fréquence des mutations étant plus importante pour l'ADNmt que pour l'ADNnc, il apparaît étonnant que l'hétéroplasmie reste un évènement rare, au moins chez les mammifères (Lightowers et al., 1997).

Chez les humains, l'hétéroplasmie provoque la plupart du temps des maladies musculaires comme les MERF (myoclonus epilepsy with ragged red fibers) et MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes) et elle est souvent impliquée dans des diabètes et dans la maladie d'Alzheimer (Chinnery et al., 2000a; Chinnery et al., 2000b; Dimauro and Schon, 2001; Du et al., 2003; Sato et al., 2004; Schwartz and Vissing, 2002; Wang et al., 2004).

La majorité des cas d'hétéroplasmie concernent une variation du nombre de répétitions en tandem retrouvées le plus souvent dans la région non codante de contrôle (D-loop). Ce type d'hétéroplasmie est assez facilement détectable grâce à la longueur variable des différentes molécules d'ADNmt impliquées. Quelques exemples sont observés chez les insectes comme la Drosophile (Kann et al., 1998; Solignac et al., 1983) et le coléoptère *Pissodes* spp. (Boyce et al., 1989) ; les poissons (Brown et al., 1996; Buroker et al., 1990 ; Lothe Nesbø et al., 1998) ; les lézards *Cnemidophorus* spp. (Densmore et al., 1985) ; et les mammifères comme la chauve-souris (Wilkinson and Chapman, 1991; Wilkinson et al., 1997), le chien et le loup (Savolainen et al., 2000), le lapin (Casane et al., 1994) et le rhinocéros (Xu and Arnason, 1997).

Beaucoup plus rares sont les cas d'hétéroplasmie qui ne concernent pas la longueur de l'haplotype mais la composition de celui-ci, c'est-à-dire la présence d'une ou plusieurs mutations ponctuelles. Il semblerait que, par rapport à l'hétéroplasmie de longueur, ce type d'hétéroplasmie est moins persistant à travers les générations. Elle a été signalée chez les oiseaux, *Parus major* (Kvist et al., 2003) et *Leucopternis lacernulatus* (Raposo do Amaral et al., 2006) ; l'algue *Fucus serratus* (Coyer et al., 2004) ; le pingouin *Alca torda* (Moum and Bakke, 2001) ; les poissons *Oncorhynchus keta* et *Paralichthus olivaceus* (Shigenobu et al., 2005) ; les mammifères dont la vache Holstein (Ashley et al., 1989; Hauswirth and Laipis, 1982; Wu et al., 2000) et la souris *Mus* sp. (Kaneda et al., 1995; Shitara et al., 1998; Shitara et al., 2000) et la moule *Mytilus* sp. (Cao et al., 2004a; Cao et al., 2004b; Ladoukakis et al., 2002; Ladoukakis and Zouros, 2001; Mizi et al., 2005). L'hétéroplasmie nucléotidique ponctuelle s'avère très difficile à détecter dans une séquence d'ADN. Sur l'électrophorégramme, les sites ambigus sont caractérisés par des doubles pics qui peuvent être assimilés à des erreurs de PCR ou des pseudogènes (voir paragraphe suivant). Souvent ces ambiguïtés se trouvent au niveau de sites déjà polymorphes. Une grande vigilance est nécessaire pour reconnaître ces doubles pics. Etant des sites polymorphes, ils peuvent, en effet, s'avérer très utiles pour des études phylogénétiques. Cependant, les analyses de ces jeux de données ne sont pas faciles et souvent des étapes de clonage sont obligatoires afin de séparer les différents haplotypes impliqués. Malheureusement cette difficulté conduit trop souvent les chercheurs à rejeter ces séquences problématiques, sacrifiant une partie de leurs données potentiellement d'une grande valeur d'un point de vue évolutif. C'est peut être d'ailleurs la raison pour laquelle très peu d'études concernant l'hétéroplasmie sont publiées.

Les pseudogènes

Une des plus importante révolution dans le domaine de la génétique des populations a été la découverte et l'application avec la méthode de la PCR de couples d'amorces conservées et universelles (Bogdanowicz et al., 1993; Simon et al., 1994). Parmi leurs nombreux avantages, elles permettent une amplification aisée de l'ADN d'un très grand nombre de taxons différents. Par conséquent, elles ont été largement utilisées ces dernières années dans des études de génétique des populations et de systématique moléculaire. Toutefois, les amorces universelles ne sont pas exemptes de défauts. L'amplification préférentielle de pseudogènes, copies de gènes mitochondriaux transposées dans le génome nucléaire (ou numts, Lopez 1994) en est un. D'après Perna and Kocher (1996) et Sorenson and Fleischer (1996) les numts évoluent moins vite que leurs homologues fonctionnels mitochondriaux. Il est donc possible qu'ils soient plus conservés et ainsi plus facilement amplifiés avec des amorces universelles, qui ont été *à priori* construites à partir de séquences plus anciennes et plus conservées (Sorenson and Quinn, 1998).

L'étude de l'ADNmt sans séparation préalable pendant l'extraction peut conduire à la contamination de l'ADNmt authentique par une amplification accidentelle de pseudogènes (Sorenson and Quinn, 1998; Sunnucks and Hales, 1996). Cette contamination ressemble beaucoup à l'hétéroplasmie nucléotidique ponctuelle. En effet les pseudogènes sont aussi représentés par des doubles pics sur les électrophorogrammes. Ces doubles pics ne sont rien d'autre que les sites variables entre les pseudogènes et le vrai ADNmt. Les pseudogènes peuvent être originaires de tous les types de séquences d'ADNmt et se rencontrent à des tailles et des degrés de similarité variables avec leurs homologues mitochondriaux (Zhang and Hewitt, 1996).

L'origine et le mode d'évolution des pseudogènes sont très mal connus. Ils ressemblent beaucoup aux gènes dont ils dérivent mais pendant leur transposition nucléaire, l'information génique peut s'altérer sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux (Bensasson et al., 2001b) ce qui les rend non fonctionnels. De plus, les pseudogènes n'étant plus soumis à la pression de sélection, ils accumulent des mutations au hasard comme par exemple des codons stop. Leur nouvelle structure empêche ainsi leur traduction complète en protéines fonctionnelles (Mighell et al., 2000; Zhang and Hewitt, 1996). Dans ce cas, il est relativement facile de les détecter. Néanmoins, il existe des numts ayant un taux d'évolution similaire à leurs homologues mitochondriaux ou qui ont été formés récemment. Ils n'ont pas encore accumulé assez de mutations pour former des codons stop ou pour engendrer un décalage du cadre de lecture (comme chez les aphides *Sitobion* (Sunnucks

and Hales, 1996), et le locuste *Schistocerca gregaria* (Zhang and Hewitt, 1996). Ainsi leur séparation de l'ADNmt authentique, à partir de leurs séquences nucléotidiques, est difficile voire impossible. Évidemment la confusion entre les mutations des pseudogènes et les mutations mitochondriales peut entraîner des erreurs qui impliqueraient de fausses estimations dans les études d'histoire évolutive et de génétique des populations. Différentes méthodes sont proposées pour éviter les numts ou séparer les différents homologues. Ces méthodes sont : le clonage, l'utilisation d'amorces internes présentes dans le fragment initialement amplifié ou d'amorces dégénérées ou encore designer des amorces spécifiques pour chaque haplotype et enfin la digestion par des enzymes de restriction. Les pseudogènes font très rarement plus de 4 kb (Zhang and Hewitt, 1996), il est donc envisageable d'éviter leur amplification avec une longue PCR. Ainsi des amorces capables d'amplifier 5 à 16 kb devraient suffire pour les éviter. L'utilisation du procédé de Southern blot est une manière de détection plus directe mais techniquement plus compliquée. Toutes ces méthodes sont proposées par Sorenson and Quinn (1998) et Ibaruchi et al. (2006) mais elles ne garantissent pas l'exclusion totale de pseudogènes du produit amplifié. De plus elles permettent simplement la séparation des différents homologues mais elles n'identifient pas l'origine des séquences (mitochondriale ou nucléaire). Cependant, il existe des méthodes de purification de l'ADNmt comme la lyse alcaline proposée par Tamura and Aotsuka (1988) et modifiée par Sunnucks and Hales (1996). Ces méthodes sont longues, assez coûteuses et ne garantissent pas la disparition des numts (Collura et al., 1996).

Comme pour l'hétéroplasmie nucléotidique ponctuelle, les pseudogènes sont souvent éliminés du jeu de données. Néanmoins, la plupart du temps, ce sont des séquences anciennes qui cachent de nombreuses informations sur les ancêtres d'une espèce et son évolution. Ils peuvent être utilisés pour étudier le taux d'évolution relatif entre les séquences mitochondriales et nucléaires surtout chez les insectes où le sujet est très controversé (Sorenson and Fleischer, 1996; Zhang and Hewitt, 1996). Les pseudogènes peuvent même être utilisés comme des groupes externes dans les études phylogénétiques grâce à leur lente évolution qui leur a valu le surnom de « fossiles moléculaires » (Perna and Kocher, 1996).

Jusqu'à présent, les numts sont plus souvent rencontrés chez les plantes que chez les animaux (Bensasson et al., 2001b; Richly and Leister, 2004). Chez ces derniers, ils ont été retrouvés chez le chat (Lopez et al., 1994), les oiseaux (Pereira and Baker, 2004; Sorenson and Quinn, 1998) et les insectes (Bensasson et al., 2000; Sunnucks and Hales, 1996). Seules trois observations de numts existent dans la littérature pour les Coléoptères : chez les Scolytinae (Jordal, 2007), chez *Tribolium brevicornis* (Coleoptera, Tenebrionidae) (Mestrovic

et al., 2006) et chez *Rivacindela* spp de la famille des Cicindelidae pour lesquels Pons et Vogler (2005) ont révélé un grand pourcentage de pseudogènes. D'après eux, l'absence de description de pseudogènes chez les Coléoptères est plutôt due à leur rareté qu'à leur ignorance par les chercheurs. De plus, il est généralement admis que des organismes tels que les Coléoptères présentent un génome de petite taille cachant rarement des pseudogènes en comparaison avec d'autres organismes présentant un génome plus grand (Bensasson et al., 2000; Pereira and Baker, 2004; Pons and Vogler, 2005; Richly and Leister, 2004). Jusqu'à présent, aucun pseudogène n'a été observé chez les Cerambycidae.

CHAPITRE III

(Article soumis à «Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research»)

« Incorporation de fragments mitochondriaux dans le génome nucléaire (*Numts*) du longicorne *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae). »

« Incorporation of mitochondrial fragments in the nuclear genome (*Numts*) of the longhorned beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae). »

Fotini A. Koutroumpa, François Lieutier, Géraldine Roux-Morabito

La diversité génétique, par le biais de la sélection naturelle, est la base de la capacité des individus à s'adapter aux changements environnementaux. Il est en général admis que les populations ou espèces présentant une variabilité génétique élevée sont moins vulnérables aux changements survenant dans leur environnement (arrivée de nouveaux parasites, destruction de l'habitat, changements climatiques). Evaluer la variabilité génétique d'une espèce apparaît aujourd'hui indispensable dans des perspectives de recensement des espèces, de reconnaissance des barrières interspécifiques, de conservation de la biodiversité ou de maîtrise des invasions.

Dans le cadre de l'étude de la diversité et de la différenciation génétique des populations Européennes de *Monochamus galloprovincialis*, un grand nombre de sites ambigus ont été observés sur les séquences d'ADNmt, surestimant fortement la diversité génétique de cette espèce. Afin de pouvoir évaluer correctement la variabilité génétique au niveau de l'ADNmt, la nature et l'origine de ces ambiguïtés ont été étudiées. Les hypothèses de la présence d'hétéroplasmie ou de pseudogènes mitochondriaux ont été envisagées. La séparation de l'ADNmt par la méthode de la lyse alcaline a conforté l'hypothèse de l'origine non mitochondriale de ces séquences ambiguës et a permis de valider, pour la première fois chez un Cérambycidé, la présence de pseudogènes (transpositions de fragments de l'ADNmt dans l'ADNnu).

Le séquençage de l'ADNmt correspondant à 792pb du gène de la cytochrome oxydase I (COI) et 521pb du gène de la cytochrome oxydase II (COII) a été réalisé sur 43 populations européennes de *M. galloprovincialis*. Près de la moitié des individus analysés présentaient des ambiguïtés (51,4% pour le COI et 44,8% pour le COII) sur plusieurs sites nucléotidiques (0,2% et 0,5% de sites ambigus en moyenne par individus sur COI et COII respectivement), se qui témoigne de la présence de pseudogènes dans les séquences analysées. La majorité des sites polymorphes étaient des mutations synonymes (ne changeant pas l'acide aminé). On a pu observer 5 fois plus de mutations synonymes dans les séquences d'ADNmt, (séquences supposées sans pseudogènes) (10/1 contre 20/10 dans les séquences présentant des ambiguïtés). La majorité des substitutions sur les séquences mitochondriales se trouvaient sur la 3^{ème} position du codon (90%), 10% sur la 2^{ème} position et aucune sur la 1^{ère} position. Les substitutions sur les séquences ambiguës étaient également positionnées plutôt sur la 3^{ème} position (67,7%), 12,9% sur la 2^{ème} position et près de 20% apparaissaient sur la 1^{ère} position. Un test de χ^2 a montré que la position des substitutions sur le codon était significativement différente entre les séquences ambiguës et mitochondriales à $P=0,05$ mais pas à $P=0,025$. Néanmoins, une différence significative a été observée entre la distribution des substitutions

sur les séquences ambiguës et une distribution au hasard des substitutions sur le codon (1 :1 :1), (χ^2 test à $P=0,01$).

Ce phénomène, encore inconnu chez les Cérambycides et rare chez les Coléoptères (Pons and Vogler, 2005), est certainement un phénomène apparu récemment chez *M. galloprovincialis* puisque la majorité des mutations étaient synonymes, situées sur la 3^{ème} position du codon pour les deux gènes étudiés. De plus, aucune ambiguïté n'ayant été observée chez l'espèce sœur *M. sutor*, la transposition a probablement eu lieu après la séparation des deux espèces, donc très récemment si on considère les faibles distances génétiques, de l'ordre de 4%, qui séparent les deux espèces. Les pseudogènes de *M. galloprovincialis* sont certainement non fonctionnels puisque la traduction des séquences ambiguës avec le code génétique nucléaire déduit des codons stops. D'après nos résultats, le taux de divergence des séquences ambiguës est proche du taux des séquences mitochondriales, ce qui nous conduit à avancer deux hypothèses. Soit ces substitutions sont apparues sous contrainte mitochondriale avant la transposition soit elles sont apparues après la transposition, avec un taux de divergence similaire à celui de l'ADNmt.

Les pseudogènes observés dans les populations de *M. galloprovincialis* présentaient une large distribution géographique. Cependant, les individus pour lesquels aucun pseudogène n'a été observé étaient présents uniquement (dans la limite de notre échantillonnage) au Sud de l'aire de distribution de cette espèce à l'exception de l'Autriche. La question de l'apparition et de l'évolution de ces séquences transposées a alors été soulevée. Il a été décrit que des facteurs environnementaux non favorables au développement de l'espèce pouvaient être à l'origine d'un stress mitochondrial favorisant la fuite de l'ADNmt dans le cytoplasme (Bensasson et al., 2001b; Woischnik and Moraes, 2002). *M. galloprovincialis* est considéré comme une espèce d'origine méditerranéenne (Hellrigl, 1971; Sama, 2002) et des conditions environnementales dans les régions situées plus au Nord de son aire de distribution d'origine (comme la baisse de la température et /ou l'absence de ses hôtes d'origine, ex *P. pinaster* and *P. halepensis*) pourraient être à l'origine de la présence de pseudogènes chez cette espèce. Toutefois, des analyses complémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Incorporation of mitochondrial fragments in the nuclear genome (*Numts*) of the longhorned beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae).

Fotini A. Koutroumpa¹, François Lieutier¹ and Géraldine Roux-Morabito²

¹Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES-EA-1207, Université d'Orléans, BP6759, Rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2, France

²INRA, Centre d'Orléans, Unité de Zoologie Forestière, BP20619 Ardon, 45166 Olivet cedex, France

Abstract

A mtDNA study, based on 43 European populations of *Monochamus galloprovincialis*, vector of the pinewood nematode, and 13 populations of its sister species *M. sutor* was realised. Sequencing of 792bp of the COI and 521bp of the COII genes revealed numerous ambiguities on multiple nucleotide sites for half of *M. galloprovincialis* specimens studied (44.8%). Hypotheses of heteroplasmy and pseudogenes (*Numts*) were examined. MtDNA isolation by alkaline lysis and cloning both supports the hypothesis that the ambiguous sequences amplified were not of mtDNA nature and validates the presence of *Numts* in the nuclear genome of *M. galloprovincialis*. Multiple copies of mtDNA-like were found paralogous to COI, tRNA leucin and COII regions. Phenetic analysis places different recently diverged mtDNA-like sequences as a close relative of mtDNA haplotypes, and groups ten closely related mtDNA-like sequences as a more basal clade, closer to ancestral states and to *M. sutor*. This result supports that this nuclear family of pseudogenes arose independently of the other events and may represent mitochondrial haplotypes sampled from *M. galloprovincialis* ancestral populations. This is the first time that *Numts* are proved for a longhorned beetle, whereas no *Numts* were found within its sister species *M. sutor*. The incorporation mechanism of *Numts* is unknown for *M. galloprovincialis*, however, excess of ambiguous sites corresponding to synonymous mutations placed on third codon position as well as the absence of *Numts* in *M. sutor*, conducted to the hypothesis of a recent transfer of these *Numts* in the nuclear genome of *M. galloprovincialis*.

Key words: *Monochamus*, mitochondrial DNA, *Numts*.

Introduction

Accurate species delimitation is crucial in biodiversity studies, especially for invasive species recognition and for biological control (Godfrey, 2002). Among molecular markers used to test species boundaries, mitochondrial DNA (mtDNA) genes became very popular, through projects such as the global biodentification mtDNA-based system, namely the “DNA barcode project” (Hebert et al., 2003). MtDNA has numerous remarkable characteristics like i) small size followed by simple structure and organization, ii) high copy number that makes amplification easier, iii) effective haploidy in DNA sequences, uniparental inheritance (in most cases maternal), iv) absence of recombination, although some cases of recombination have been found (Hoarau et al., 2002; Ladoukakis and Zouros, 2001; Rokas et al., 2003a) and v) important variability in evolution rates of its regions providing the possibility to conduct studies on various taxonomic levels (Avice et al., 1987; Moritz et al., 1987). Nevertheless, it is considered to be a controversial molecular marker because it is also prone to incomplete lineage sorting, retained ancestral polymorphisms and introgression which could lead to species misidentifications (Funk and Omland, 2003). Moreover, application of percent DNA sequence difference widely used for the identification of species could overestimate sequence divergence because of heteroplasmy and pseudogenes. Heteroplasmy is the existence of more than one mtDNA type in a single individual and can be expressed as length or single nucleotide polymorphism. The origins of heteroplasmy can be recombination somatic mutations, doubly uniparental inheritance, paternal leakage or/and hybridization. Many cases of heteroplasmy are reported in insects, birds, fish, mussels and seaweeds, lizards and mammals including humans (Boyce et al., 1989; Coyer et al., 2004; Crochet and Desmarais, 2000; Katsares et al., 2003; Kondo et al., 1990; Kvist et al., 2003; Ladoukakis and Zouros, 2001; Sekiguchi et al., 2003; Solignac et al., 1983). Knowledge about nuclear integrations of mtDNA fragments (mitochondrial DNA pseudogenes or *Numts*, Lopez, 1994) is particularly poor, especially when their origin and evolutionary patterns are considered. It is generally admitted that *Numts* are non functional mitochondrial gene copies transported into the nuclear genome under both genetic and environmental influence (Bensasson et al., 2001b). As heteroplasmy, *Numts* amplified simultaneously with mtDNA during PCR procedures can bias results of evolutionary studies since most of the time similarity between these sequences makes their identification difficult or even impossible. Numerous cases of *Numts* on fungi, plants and metazoan have been listed by Bensasson et al. (2001b, see also <http://www.pseudogene.org>, Karro et al., 2007). *Numts* were most commonly found in plants than in animals (Bensasson et al., 2001b; Richly and Leister, 2004). In insects few studies

have been reported, e.g. on Homoptera (Sunnucks and Hales, 1996), Hymenoptera (Rokas et al., 2003b) and most commonly on Orthoptera (Bensasson et al., 2001a; Bensasson et al., 2000; Keller et al., 2007). Lately Coleoptera have been added to in the list (Jordal, 2007; Mestrovic et al., 2006; Pons and Vogler, 2005), but no *Numts* have been reported in Cerambycidae beetles so far. When such mtDNA gene duplications were considered, their origin, evolution, geographical dispersion and population or species dynamics were rarely developed.

The genus *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) includes about 150 different species spread all around the world, besides South America. Seven *Monochamus* species are reported so far to be vectors of the Pine Wood Nematode (PWN) *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner 1934; Nickle 1970) (Nematoda: Aphelenchoididae), causative agent of the Pine Wilt Disease (PWD). Among them *M. galloprovincialis* (Olivier 1795) has been recently proved as a vector in Portugal (Sousa et al., 2001).

In the course of studying phylogeographic structure and molecular systematics of two European sister species of *Monochamus* (*M. galloprovincialis* and *M. sutor* Linnaeus 1758) using mtDNA as genetic marker, high number of ambiguous sites was encountered in *M. galloprovincialis* sequences. To overcome the bias of the ambiguities interference in the phylogenetic analyses their nature and origin are precised in this paper. In addition the rate and patterns of numt sequence evolution in this species as well as numt geographic distribution are discussed.

2. Materials and Methods

2.1 Specimens examined

One hundred and forty adults (71 males and 69 females) and eight larvae of *M. galloprovincialis* were examined in this study. The sampling was performed between May and October for three consecutive years, 2003-2005, using 150 cross van traps placed in 40 localities in France. Three to four traps fitted with ethanol, α -pinene and a mixture of Ips-enol and Ips-dienol were installed in each locality (Vincent et al. in prep.). A total of 117 specimens were sampled in France. In addition, 17 *M. galloprovincialis* captured in Greece, five in Spain, five in Portugal, two in Morocco and two in Austria were added to this study (Table 1). Trapped insects were frozen at -80°C alive or in absolute ethanol until DNA extraction. The totality of the individuals was sampled from 43 geographic populations. For each population, one to eleven individuals were examined and body parts and DNA were kept as vouchers in the laboratory (Laboratoire de Biologie et des Grandes Cultures, L.B.L.G.C.)

Table 1. *M. galloprovincialis* population characteristics and collectors' names

Code	COI haplotypes codes : GI-	COII haplotypes codes : GII-	♂	♀	Country	Location	Colector	Host species	Date	Latitude	Longitude
GCom	29, 38	7, 45	1	1	France	Compiègne	D. Mure	<i>P. sylvestris</i>	2004	49°22' N	02°54' E
GBos	38	22	0	1	France	Prénouvellon	J. Mouthiez	No forest	2004	47°58' N	01°32' E
GPigA	53	38	1	0	France	FD 3 Pignons (Villeneuve St Denis)	B. Germain	<i>P. pinaster</i>	2003	48°24' N	02°33' E
GPigB	35	31	1	0	France	FD 3 Pignons (Villeneuve St Denis)	B. Germain	<i>P. sylvestris</i>	2004	48°25' N	02°30' E
GRam	52	41, 42	0	2	France	Rambouillet (St Leger en Yvelines)	A. Jarsaillon	<i>P. sylvestris</i>	2003,2004	48°38' N	01°49' E
GLor ^{1,2}	4, 5, 24, 25, 27, 38, 44, 45, 53	1, 5, 7, 8, 13, 17, 25, 39	7	4	France	Lorris	Authors	<i>P. sylvestris</i>	2003,2004	47°53' N	02°30' E
GSag	38	43	0	1	France	Savigny	B. Huttinger	<i>P. nigra (laricio)</i>	2004	47°03' N	04°49' E
GStu	43	2	1	0	France	Sturzelbronn	H. Schmuck	<i>P. sylvestris</i>	2004	49°03' N	07°35' E
GHag	52	28, 47	0	2	France	Haguenau	F. Dorffer	<i>P. sylvestris</i>	2003	48°49' N	07°47' E
GEyg	11	19	0	1	France	FD Eygues (com. Rosans)	P. Fee	<i>P. nigra</i>	2004	44°24' N	05°28' E
GAdr	6, 38, 39, 45	26, 27, 49	0	4	France	St André les Alpes	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2004	43°59' N	06°30' E
GDig	4, 49	7, 49	1	1	France	Digne (Les Bains)	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2005	44°05' N	06°13' E
GSeY	4	4	0	1	France	Seyne (Maison Forestière 1600m)	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2003	44°21' N	06°23' E
GpFau	11	3, 20	2	0	France	Seyne (Le Faut 1350m)	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2004	44°19' N	06°24' E
GpVer	55	49	3	2	France	Verdaches 1100m	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2005	44°15' N	06°20' E
GpAdr	55	49	2	3	France	L'Ergatiere (St André les Alpes 1100m)	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2005	43°59' N	06°30' E
GMey ¹	7, 46, 48, 50, 51, 53, 54, 55	5, 49	4	6	France	Meyrargues	J. Hintzy	<i>P. halepensis</i>	2003,2004	43°28' N	05°38' E
GCor ¹	11, 18, 32, 43, 47, 51, 53	29, 8, 41, 47, 48, 50, 52, 53, 55	4	5	France	St Jean de Cornies	P. Girard	<i>P. halepensis</i>	2003,2004	43°44' N	04°00' E
GLG	9, 11, 44, 46, 55	7, 14, 49, 51	3	3	France	Puechagut le Vigan	C. Rulliere	<i>P. nigra</i>	2003,2004	44°01' N	03°34' E
GCau	22, 51	6, 54	2	0	France	FD Grands Causses	J-P. Ansonnaud	<i>P. nigra (laricio)</i>	2004	43°58' N	03°15' E
GLar	16, 55	49	2	0	France	Larzac	J-P. Ansonnaud	<i>P. nigra (laricio)</i>	2005	43°58' N	03°11' E
GAud ²	19, 28, 30, 41	15, 30, 37, 46	3	1	France	FD de Foufroide (com. Peyriac de Mer)		<i>P. halepensis</i>	2004	43°17' N	01°48' E
GTou	55	48	1	0	France	Toulouse		<i>P. nigra</i>	2003	43°36' N	01°26' E
GArg	21	6	0	1	France	Argentat		<i>P. nigra</i>	2004	45°05' N	01°56' E
GHer	40, 51, 53	21, 23, 41, 48	2	2	France	Herm (Léon)	J-L. Hautclocq	<i>P. pinaster</i>	2004	43°51' N	01°14' W
GPis	10, 26, 42, 53	10, 16, 18, 41, 48	3	2	France	Pissos	P. Ninosque	<i>P. pinaster</i>	2004	44°18' N	00°46' W
GFar	23, 38, 50, 53	12, 40, 41, 42	3	2	France	Fargues	R. Delpont	<i>P. pinaster</i>	2004	44°11' N	00°11' E
GSarI	20, 22, 31, 32, 53	33, 34, 35, 41	5	3	France	Sare (St Ignace)	C. Van-Meer	<i>P. nigra (laricio)</i>	2004	43°20' N	01°36' W
GSarL	30, 32, 53	32, 34, 35, 36	2	3	France	Sare (Lizarieta)	C. Van-Meer	<i>P. nigra (laricio)</i>	2004	43°16' N	01°37' W
GHou	53		1	2	France	Hourtin	J-P. Coste	<i>P. pinaster</i>	2004,2005	45°12' N	01°04' W
GHnor	35	9	1	0	France	Hourtin (NORD)	Authors	<i>P. pinaster</i>	2005		
GOLE	8, 32, 36, 38, 44, 53	7, 11, 34, 35, 41, 42, 44	4	4	France	St Pierre d' Oléron	R. Pelloquint	<i>P. pinaster</i>	2003,2004	45°58' N	01°19' W
GGav	38	24	1	0	France	Gavre	J. Belloir	<i>P. pinaster</i>	2004	46°39' N	00°44' W
GP	3, 13	64, 65, 66	2	3	Portugal	Lisbon Troie	P. Naves	<i>P. pinaster</i>	2003	38°22' N	08°47' W
GEspM	1, 2, 3	60, 61, 62	2	3	Spain	Murcia	D. Gallego	<i>P. pinaster</i>	2004	37°59' N	01°07' W
GMarA	17	63	1	1	Morocco	Atlas mountain		<i>P. pinaster</i>	2003	32°21' N	06°24' W
GGrEr	14	57, 59, 69, 70	4	larvae	Greece	Erithres	A. Koutroumpas	<i>P. brutia</i>	2005	38°13' N	23°19' E
GGrB	12, 14	56, 67, 71	4	larvae	Greece	Bilia	A. Koutroumpas	<i>P. brutia</i>	2005	38°10' N	23°20' E
GGrA	14, 15, 33, 37	58, 67, 68	4	3	Greece	Afete (Magnesia) 300m	A. Koutroumpas	<i>P. brutia</i>	2004,2005	39°22' N	22°56' E
GGrP	34	72	0	1	Greece	Patitiri, Alonissos island	S. & N. Eustathiou	<i>P. brutia</i>	2005	39°09' N	23°51' E
GGrF	53	73	1	0	Greece	Frakto, Mt Rodopi 1200m	A. Koutroumpas	<i>Picea abies</i>	1997	41°15' N	25°30' E
GpAuCa	28	7	1	0	Austria	Carinthia	U. Tomiczek	<i>P. sylvestris</i>	2006	46°45' N	13°51' E
GpAuSo	53	27	0	1	Austria	Sollenuau	U. Tomiczek	<i>P. sylvestris</i>	2006	47°53' N	16°14' E

^{1,2}Populations from which individuals used for the alkaline lysis and/or cloning respectively came from. For haplotypes nucleotide variable sites see table 3

Table 2. *M. sutor* population characteristics and collectors' names

Population Code	No of individuals	Country	Location	Colector	Host species	Date	Latitude	Longitude
SuSor	1	France	Sorbiers	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2003	44°33' N	06°06' E
SuDig	1	France	Digne (Les Bains)	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2003	44°05' N	06°13' E
SuCha	2	France	Chatel (Près la Joux)	M. Simon	<i>Picea abies</i>	2004	46°13' N	06°46' E
SuSam	2	France	Samoens			1992	46°05' N	06°43' E
SuAdr	2	France	St André les Alpes	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2005	43°59' N	06°30' E
SuLG	1	France	Puechagut le Vigan	C. Rulliere	<i>P. nigra</i>	2003	44°01' N	03°34' E
SuMon	1	France	Montels, Midi-Pyrenées			2004	43°00' N	01°28' E
SuIse	1	France	Isere 1260m			2005	45°05' N	05°50' E
SuMed	2	France	Meolans-Revel			2004	44°24' N	06°31' E
SuSeyF	10	France	Seyne (Le Faut) 1350m	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2004	44°19' N	06°24' E
SuSeyM	11	France	Seyne 1600m	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2003	44°21' N	06°23' E
SuSeyC	1	France	Seyne (Col Bas) 1700m	Schmit		2005	44°20' N	06°21' E
SuPra	1	France	Prades			2005	42°47' N	01°52' E
SuGrE	6	France	Elatia Mt Rodopi 1550m	A. Koutroumpas	<i>P. nigra</i>	2005	41°15' N	25°30' E
SuGrX	5	France	Elatia Mt Rodopi 1400m	A. Koutroumpas	<i>Picea abies</i>	2005	41°15' N	25°30' E
SupAuNa	2	Austria	Nasswald			2003, 2004	47°45' N	15°41' E

in Orleans University in France. In addition, 49 specimens sampled from 14 populations of *M. sutor* species were equally analyzed. 10 of the 14 populations were sampled in France, 2 in Greece and 2 in Austria (Table 2).

2.2 PCR amplification and sequencing of mtDNA

Both *Monochamus* species' DNA was extracted from one leg (two legs when specimens were small) to permit subsequent morphological observations and to avoid contamination from organisms like the PWN which is found in the tracheas of *Monochamus* (Mamiya, 1976).

Extraction and isolation of genomic DNA was performed with the GenElute Mammalian Genomic DNA miniprep kit (Sigma-Aldrich, St Quentin, France) with final elution to 100µl. A part of the cytochrome oxydase I (COI) and II (COII) genes was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the Sigma Red Taq package. One microliter of DNA extraction, in 50µl reaction volumes, was used as template for 35 cycles of mtDNA amplification. The reaction was performed in a gradient Peltier Thermal Cycle (PTC-200) under the following conditions: denaturation at 94°C for 1min, annealing at 45°C for 1min and extension at 72°C for 1min30. The initial cycle employed a 3min denaturation at 95°C and the final cycle had an extension of 72°C for 5min. PCR products were examined via agarose gel electrophoresis and purified using GenElute PCR Clean-Up kit (Sigma-Aldrich, St Quentin, France). Sequencing of purified PCR products was performed using BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). All samples were sequenced, on both strands, over an 878-bp fragment of COI gene, with primers C1-J-2183a (5'-CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG-3'; Simon et al., 1994) and TL2-N-3014 (5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3'; Simon et al., 1994), and equally over a 693-bp of COII with primers C2-J-3138a (5'-AGA GCC TCT CCT TTA ATA GAA CA-3'; Simon et al., 1994) and TK-N-3782 (5'-GAG ACC ATT ACT TGC TTT CAG TCA TCT-3'; Bogdanowicz et al., 1993). Sequencing reactions were purified using Sephadex G-50 (Amersham; Sigma-Aldrich) and detected with an ABI 3100 automatic sequencer. For all individuals, fragments of 792 continuous nucleotides of COI and 521 of COII could be reliably amplified. These fragments of COI and COII genes correspond to base pair positions 441-1319 and 1397-2090, respectively, of the *Drosophila yakuba* reference sequence (Simon et al., 1994).

Sequence electropherograms were examined and corrected using Sequence Navigator 1.0.1 (Applied Biosystems) and were aligned with CLUSTAL W version 1.4 (Thompson et

al., 1994) as implemented in BioEdit version 4.7.8. Sequences are available in GenBank under the accession numbers EU556542 to EU556700.

2.3 Determination of nuclear integrations (*Numts*)

A mixture of two bases was observed at several sequence positions represented by two overlapped peaks on the electropherograms. This phenomenon was confirmed on both strands and by numerous assays of amplifying and sequencing the ambiguous sequences. DNA Strider 1.4f3 (software for DNA and Protein Sequences Analysis) was used to analyse the nucleotide sequences in order to clarify the changes of the amino acids due to these mutations and their codon positions. Codon position bias was tested with a χ^2 test. To investigate on the origin of these double peaks, we performed an isolation of mtDNA by using the Tamura and Aotsuka (1988) alkaline lysis protocol modified by Sunnucks and Hales (1996). Ten individuals were used for this analysis (two fresh larvae, one fresh adult and seven dead adults frozen at -80°C) (for collection sites see table 1). Fifty micrograms of tissue were taken from each sample tested (three last larval abdominal segments and five legs from adults). After the alkaline lysis, we proceeded in a classic extraction with the Sigma kit, skipping the first part of cell lysis. PCR and sequencing followed, with the mitochondrial primers previously defined. In addition we proceeded into a PCR with nuclear primers to verify that there was no nuclear contamination. Primers D1F (5'-ACC CGC TGA ATT TAA GCA TAT-3'; Harry et al., 1996) and D3R (5'-TAG TTC ACC ATC TTT CGG GTC-3'; Lopez-Vaamonde et al., 2001) of the 28S gene were used for this verification.

To check whether longer PCR fragment yielded to amplification of both nuclear and mitochondrial DNA, a 1600 bp fragment corresponding to a part of the COI, tRNA^{leucine} and COII genes was amplified and sequenced for eight individuals using a combination of the two more external primers (C1-J-2183a and TK-N-3782). In addition, three resulted amplified individuals were cloned using the StrataCloneTM PCR Cloning Kit (STRATAGENE, Amsterdam Zuidoost, Netherlands). Clones were screened for inserts of the expected size by PCR amplification with the universal primers M13 and T7. Selected PCR products were purified and sequenced directly for both strands as detailed previously. Clones to be sequenced were taken in random.

3. Results

Only mtDNA from fresh material could be unambiguously separate from nuclear DNA using the alkaline lysis protocol. For the three fresh individuals submitted to the

alkaline lysis for mtDNA isolation, amplification with nuclear primers failed and double peaks totally disappeared when sequencing with mtDNA primers, whereas double peaks persist for the seven remaining ethanol preserved or frozen individuals .

For the three individuals (GLor3, GLor6, GAud4 see table 1 and supplementary data for details) whose part of the COI, tRNA leucin and COII genes were amplified, cloning resulted in multiple mtDNA-like sequences, 7 , 8 and 5 clones respectively. Pairwise comparison of the mtDNA-like sequences showed 2 to 44 differences, when the complete data set (COI, tRNA leucin and COII) were considered. In the case of two clones of the individual GLor6 (GCL2.4 and GCL2.3), we obtained clean reads which exhibited a deletion of 13 nucleotides at the beginning of the COII gene.

Among the 148 *M. galloprovincialis* individuals analyzed for the two separate genes, 146 and 136 were successfully amplified and sequenced for a 792bp fragment of the COI and a 521bp fragment of the COII genes respectively. The alignment of the sequences obtained revealed no deletions or insertions but 19 polymorphic sites for the COI and 24 for the COII gene (Tables 2 and 3). Ambiguities were found in 14 and 17 of these polymorphic sites, for each gene respectively. Ambiguous sites were observed in half of the *M. galloprovincialis* individuals; 75 and 61 (51.4% and 44.8%) individuals showed ambiguities for the COI and the COII, respectively. Mean ambiguous sites number found per individual was 1.72 (0.2%) and 2.77 (0.5%) for the two genes, respectively. No ambiguities were observed in the *M. sutor* sequences obtained, whatever the gene studied.

For substitution location and event as well as for ambiguity frequency on each position and transition/transversion rate see table 3 (see also supplementary data). Most of the polymorphic sites, i.e. 12 (63.2%) and 18 (75%) for the COI and the COII, respectively, correspond to synonymous mutations. Even though sequence analysis revealed that 6 (31.6%) of the ambiguous positions for the COI fragment and 6 (25%) for the COII were non synonymous mutations, no codon stops were formed for any of the ambiguous positions in the two fragments when they were translated with the mitochondrial genetic code. Synonymous to non synonymous substitutions bias is five times more important for ambiguous sequences than for mitochondrial ones (10/1 for mtDNA and 20/10 for ambiguous sequences) Transitions were more abundant than transversions for both genes studied. MtDNA substitutions were predominantly observed at third codon positions (90%), less at second positions (10%) and never at the first ones. Considering the ambiguous sequences, most of the substitutions were also found at third positions (67.7%), sometimes at first positions (19.4%) and rarely at second positions (12.9%). When examining the codon position bias in ambiguous sequences,

the deficit of second position and excess of third positions led to a pattern significantly different from *M. galloprovincialis* mtDNA codon position pattern ($\chi^2 = 6.37$, 2 df) at $P = 0.05$ but not significantly different at $P = 0.025$. When random codon position bias (1: 1: 1) was tested significantly different pattern was observed ($\chi^2 = 16.71$, 2 df, $P = 0.01$).

Substitutions states of *M. sutor* sequences equivalent to each of the polymorphic sites (ambiguous or not) found for *M. galloprovincialis* were also added in table 3, for comparison and further discussion on the evolutionary events.

Five of the 43 substitutions (positions 632, 751, 1122, 1478 and 1537) were observed in both *M. galloprovincialis* and *M. sutor* species. Consequently, as no *Numts* were found for *M. sutor*, the ancestral mitochondrial origin is reinforced, these changes may have occurred prior to the transposition.

Five other ambiguities (positions 1100, 1149, 1165, 1178 and 1179) were always observed at polymorphic sites in *M. galloprovincialis* sequences but only one of the two possible states was found in *M. sutor* sequences. So the former hypothesis is invalid for these cases. These mutations could be considered as real *Numts*' mutations because, even though no codon stops are formed, four out of five mutations changed the amino acid and three of these changes implemented biochemical change as well. Moreover, they were found only in one or two sequences and so they could be occasional Taq polymerase misincorporation.

The 33 remaining substitutions (Table 3) appeared on polymorphic sites, and for a large number of *M. galloprovincialis* sequences they were characterized by double peaks, contrary to *M. sutor* sequences that were monomorphic (presenting only one of the two states proposed for *M. galloprovincialis*). In this case it is difficult to generate hypotheses on the time of their apparition but we could say that they seem to appear after the separation of the two species.

Figure 1 presents the geographical distribution of individuals with and without ambiguous sites observed in each gene fragment, COI and COII, for each sampled population of *M. galloprovincialis*. A great variability was observed within populations of *M. galloprovincialis*. Distinct haplotypes reached the number of 9 per population (in the average, 1.2 for the COI and 1.7 for the COII). It is shown that *Numts* have a large and heterogeneous repartition. Interestingly, populations from which individuals did not exhibit *Numts* are located in the south of the sampling area, beneath the latitude of 45°58', with the exception of Austrian populations found at maximum latitude of 47°53'. For each haplotype, in both COI and COII genes, variable nucleotide positions were showed (Table 3).

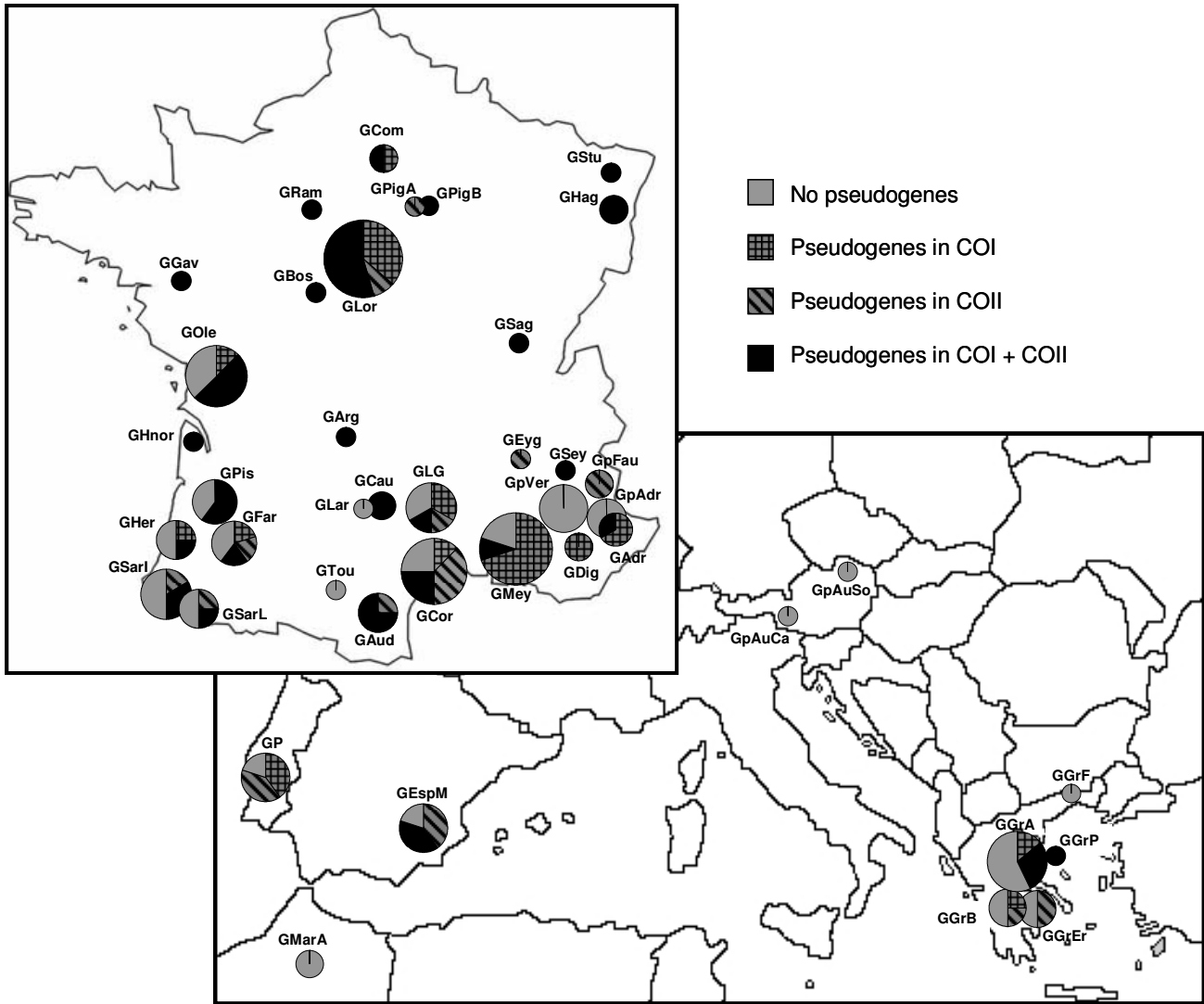


Figure 1. Sampling localities of *M. galloprovincialis* and presentation of *Numts* geographic distribution according to their presence in the COI, COII or both genes. Population codes were given in table 1.

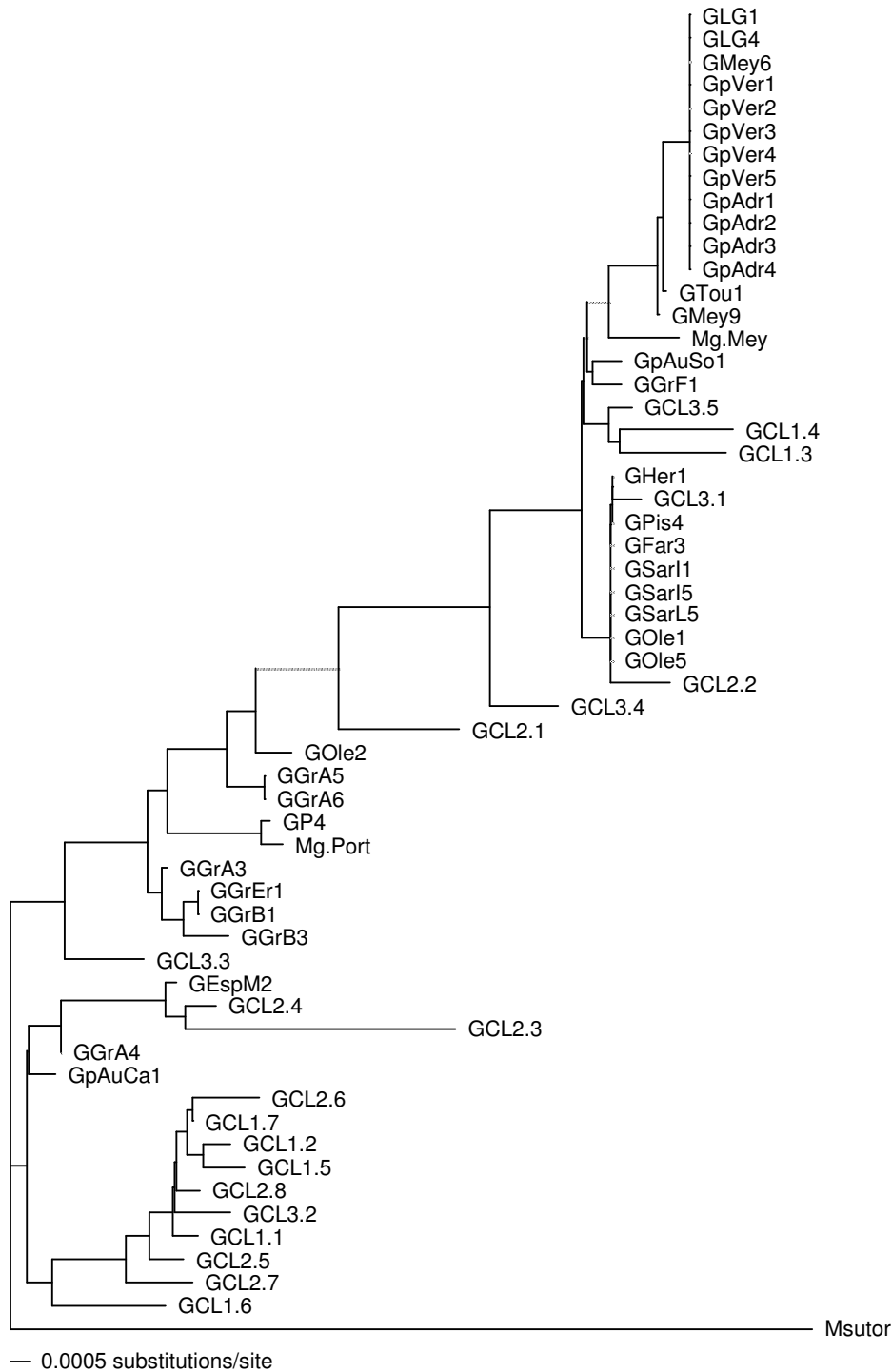


Figure 2. Neighbor-joining tree of mtDNA-like sequences and mtDNA haplotypes of *M. galloprovincialis*, with *M. sutor* as outgroup based on Kimura 2-P distances. The mt-DNA haplotypes are underlined, and mtDNA-like sequences are labelled as the individual they were taken from (individuals number 1=GLor3, number 2=GLor6 ; number 3=GAud4) followed by the number of the clone that was sequenced, e. g. GCL1.6 is a sequence found in GLor3, and its sequence is given by clone 6.

Figure 2 presents a phenetic analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. Eight different mtDNAlike sequences were grouped together with *M. galloprovincialis* mtDNA sequences, whereas a large group of more closely related mtDNA-like sequences formed a separate clade. This nuclear family of pseudogenes are basal to all *M. galloprovincialis* mtDNA haplotypes and branched off after the split with *M. sutor*.

4. Discussion

Our findings, especially after mtDNA isolation by alkaline lysis, support the hypothesis that the multiple sequences amplified for *M. galloprovincialis* individuals are not of mtDNA nature. The fact that for fresh individuals only one sequence was amplified after mtDNA isolation argues against heteroplasmy and confirms the existence of mtDNA transpositions to the nucleus (i.e. *Numts*). Nevertheless heteroplasmy cannot be definitively excluded because seven individuals tested with this method maintained the double peaks in their sequences, even if we could consider this fact as a contamination. Using purified mtDNA has been recommended to check that amplified sequence is not of nuclear origin, especially for recent transfer events (Smith et al., 1992), but despite the fact that more fresh individuals would better support our findings, testing the totality of the individuals sampled had to be abandoned due to inadequate conditions of material conservation for alkaline lysis procedures. Bensasson et al. (2000) and Ibaraguchi et al. (2006) reported that mitochondria of specimens conserved in alcohol are not well preserved and consequently chromosomal contamination is possible during alkaline lysis. As also proved by our results material preservation is indeed of great importance for the success of the mtDNA isolation

Other cause of double peaks on sequence electropherograms cannot be neglected such as error produced during PCR and sequencing. We are aware that no polymerase is error-free, but technical artifacts cannot occur almost exclusively on point mutation sites (hot spots, 57% COI and 100% COII). Besides, artifacts cannot be responsible for all of the observed ambiguities, because error produced by using the TaqRed polymerase is insignificantly small (Frey and Frey, 2004) and we used the BigDye Terminator for sequencing which is considered as one of the most performing. The results were reproducible and similar outcomes occur in both strands sequenced. For more information on the evaluation of PCR and automated DNA sequencing components see Hancock et al. (2005), Keohavong and Thilly (1989), Nollau and Wagener (1997) and Brandstätter et al. (2005).

Unexpected was the extremely high number of *M. galloprovincialis* individuals exhibiting *Numts* and the high number of different mtDNA like clones within individuals.

Interestingly, no *Numts* have been found in the Cerambycidae so far. Only three reports of *Numts* in Coleoptera were found in the literature, one from Scolytinae beetles (Jordal, 2007), one sequence from *Tribolium brevicornis* (LeConte, 1859) (Mestrovic et al., 2006) and finally, Pons and Vogler (2005), revealed a very high percentage of mitochondrial rRNA pseudogenes in the tiger beetles (Coleoptera, Carabidae, Cicindelinae). According to these authors, the lack of pseudogene descriptions from Coleoptera is probably due to their paucity, rather than to the scanty attention paid to them. Furthermore, it is generally admitted that organisms with small genomes, like Coleoptera (Pons and Vogler, 2005) and chicken (Pereira and Baker, 2004), rarely harbor *Numts* or other pseudogenes compared to organisms with large nuclear genomes, like grasshoppers (Bensasson et al., 2000) and humans (Mourier et al., 2001; Woischnik and Moraes, 2002). But, Richly and Leister (2004) showed that there is no correlation between abundance of *Numts* and size or density of the genomes. Anyhow, even if the whole genome sequence and size are not yet known for *M. galloprovincialis*, its *Numts* pattern seems to fit the one proposed for the Coleoptera mentioned above.

M. galloprovincialis *Numts* have all the characteristics of a very recent event. The majority of the ambiguous sites correspond to synonymous, third codon position, mutations for both mitochondrial fragments. No *Numts* were found for *M. sutor*, the sister species of *M. galloprovincialis*, whereas the genetic distance between the two species is very small (3.7% at most, Koutroumpa et al. submitted), suggesting recent speciation. Moreover, a recent phylogenetic study of the genus *Monochamus* using the COI gene did not mention any paralogous sequences of mtDNA, even in other closely related species (Cesari et al., 2005) but only few specimens per species were considered in this study. When closely related species were studied for pseudogenes, heterogeneity in the percent divergence between *Numts* and current mtDNA sequences has already been noticed. For example, the ND5 like *Numts* diverged at 1,4% from mtDNA sequences in *Schistocerca gregaria*, while the divergence reached 12,5% in *Podisma pedestris* (Bensasson et al., 2000). Nevertheless, the high number of *Numts* detected in *M. galloprovincialis* compared to the absence of such sequences in *M. sutor* suggests differences in the ability of different genomes to gain or lose *Numts* (Bensasson et al., 2000).

Phenetic reconstruction shows that mtDNA-like sequences observed in this species might not result from a unique mitochondrial transposition in the nuclear genome in ancestral populations, but from at least 9 independent transfer events, i. e. eight recently integrated in nucleus and one family of pseudogenes which are closely related. This family formed a more basal clade closer to ancestral states than to *M. galloprovincialis* mtDNA sequences and closer

to *M. sutor* mtDNA sequence. This result supports that this family of nuclear pseudogenes is likely to have descended from a single mitochondrial immigrant which has been amplified and diverged since its transfer. Independent mitochondrial origins of nuclear pseudogenes within insect species have already been described. For example, it was established that there have been at least 12 separate mtDNA integrations into the grasshopper *Podisma pedestris* nuclear genomes (Bensasson et al., 2000). Likewise, a family of almost identical *Numts* has been described into *Italopodisma spp.*, in addition to multiple horizontal transfer events which could also explain *Numts* diversity within individuals (Bensasson et al., 2000). Multiple independent transposed sequences of mitochondrial sequences have also been observed among species, such as in Aphids of the genus *Sitobion* (Sunnucks and Hales, 1996) and in seven species of diving ducks (Sorenson and Fleischer, 1996). However, further study is needed to explain better the events involved in transfer of mitochondrion to nucleus in *M. galloprovincialis*.

It is not well known which factors determine whether *Numts* are common in a species (Bensasson et al., 2000). Likewise *Numts* geographic distribution within a species and their frequencies within populations are rarely studied. Ponds and Vogler (2005) found that 59% of the *Rivancindela* individuals studied presented *Numts* and 7 out of 65 populations had zero, one or two individuals without *Numts*. In our sampling, also, 22 out of 43 populations had individuals without *Numts*. Even though, we strongly believe the lack of *Numts* from these individuals we could not exclude a PCR failure due, for example, to *Numts*' mutations on primers annealing sites. When considering the geographic distribution of *M. galloprovincialis Numts* in the southern area of its repartition, a wide geographic distribution was observed (Figure 1), whereas populations from the North of France recorded no individuals without *Numts*. Even though, our sampling is not representative of the whole distribution of this species, our results raise questions about the apparition and evolutionary patterns of these transposed sequences in this species. It has been shown that unfavorable environmental factors and different origins of mitochondrial stress could favor mtDNA escape into the cytoplasm (Bensasson et al., 2001b; Woischnik and Moraes, 2002). *M. galloprovincialis* is considered to have a mediterranean origin (Hellrigl, 1971; Sama, 2002) and unfavorable environmental conditions (as lower temperature or/and absence of the original hosts *P. pinaster* and *P. halepensis* in northern regions) could be a pitfall for *M. galloprovincialis* individuals. However, we cannot rule out the hypothesis that factors such as distance isolation, founder effect or past climatic oscillations with contrasted patterns of recolonisation may have affected the observed distribution of *M. galloprovincialis Numts*. Larger sampling is clearly needed in order to test these hypotheses.

Using mtDNA as a molecular marker in evolutionary studies becomes problematic when *Numts* are involved, especially for assessment of species boundaries (Park et al., 2007; Pons and Vogler, 2005; Teletchea et al., 2005), through universal identification systems like the DNA based barcoding system, recently proposed by Hebert et al. (2003). Usually, when ambiguous sites are detected, they are withdrawn from analyses (Brandstätter et al., 2005; Mestrovic et al., 2006). However, the study of *Numts* provides a simultaneous view on the dynamics of mtDNA and nuDNA evolution and interactions (Bensasson et al., 2000) and consequently is of great evolutionary interest. Moreover, *Numts* detection can vary within species, populations and, quite often, tissues of the same individual should be considered when dealing with them (Bensasson et al., 2001b, Ibaruchi et al., 2006, this study). A warning is given about recently translocated genes which, due to less or lack of divergence, are at highest risk of being amplified together or instead of their mitochondrial counterparts and in this case discrimination from them is very hard and sometimes impossible. So far, phylogenetic studies involving both *Numts* and mtDNA sequences showed contrasted results, in some cases placing the *Numts* sequences relative to their mtDNA counterparts (eg. in Sorenson and Fleisher, 1996), and in other cases grouping paralogous nuclear sequences with more than one taxa (*Aythya valisineria* and *A. ferina* nuclear sequence, Sorenson and Fleisher, 1996 ; *Podisma pedestris* *Numts* sequences distributed within Podisma family, Bensasson et al., 2000).

This work highlights the importance for evolutionary research of studying transposed mtDNA and the great risk of ignoring them in phylogenetic and phylogeographic studies. We further encourage scientists to treat pseudogenes as important elements to every biological studies rather than obstacles that should be eliminated from analyses.

Acknowledgments

We would like to thank Jerome Rousselet, Christian Stauffer, Wolfgang Arthofer and François Hericourt for helpful discussion and suggestions as well as Emmanuelle Magnoux for her assistance with DNA sequencing and cloning.

Secondary summary

Incorporation de fragments mitochondriaux dans le génome nucléaire (*Numts*) du longicorne *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae).

Fotini A. Koutroumpa, François Lieutier, Géraldine Roux-Morabito

Université d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

Une étude de l'ADNmt, basée sur 43 populations de *Monochamus galloprovincialis*, vecteur du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*, et 13 populations de l'espèce sœur *M. sutor* a été réalisée. Le séquençage de 792pb du gène COI et 521pb du COII a révélé que près de la moitié des individus analysés (44,8%) présentaient des ambiguïtés sur plusieurs sites nucléotidiques. Les hypothèses de la présence d'hétéroplasmie ou de pseudogènes mitochondriaux (*Numts*) ont été examinées. La séparation de l'ADNmt par lyse alcaline (utilisée avec succès sur trois individus) et le clonage confortent tous les deux l'hypothèse de l'origine non mitochondriale de ces séquences ambiguës et valide la présence de *Numts* dans le génome nucléaire de *M. galloprovincialis*. De multiples copies de séquences similaires à des mitochondriales étaient des paralogues des gènes COI, tRNA leucine et COII. Une analyse phénétique a placé les paralogues qui ont divergé récemment près des haplotypes mitochondriaux et a groupé dix autres paralogues à un clade plus basal et plus près des statuts ancestraux et à *M. sutor*. Ce résultat montre que cette famille de séquences nucléaires de pseudogènes a apparu indépendamment des autres événements et représente probablement des haplotypes mitochondriaux des populations ancestrales de *M. galloprovincialis*. C'est la première fois que des *Numts* sont démontrés chez un longicorne malgré leur absence de *M. sutor*. Le mécanisme de l'incorporation de *Numts* est inconnu pour *M. galloprovincialis*, cependant, l'excès de sites ambigus correspondant à des mutations synonymes en troisième position codon chez *M. galloprovincialis* ainsi l'absence de *Numts* chez *M. sutor*, conduisent à l'hypothèse d'une apparition récente de *Numts* dans le génome nucléaire de *M. galloprovincialis*.

Mots clés : *Monochamus*, ADN mitochondrial, *Numts*.

References

- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.
- Bensasson, D., Petrov, D.A., Zhang, D., Hartl, D.L., Hewitt, G.M., 2001a. Genomic Gigantism: DNA Loss Is Slow in Mountain Grasshoppers. *Mol. Biol. Evol.* 18, 246-253.
- Bensasson, D., Zhang, D.X., Hartl, D.L., Hewitt, G.M., 2001b. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.* 16, 314-321.
- Bensasson, D., Zhang, D.X., Hewitt, G.M., 2000. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Mol. Biol. Evol.* 17, 406-415.
- Bogdanowicz, S.M., Wallner, W.E., Bell, J., O' Dell, T.M., Harrison, R.G., 1993. Asian gypsy moths (Lepidoptera, Lymantriidae) in North America – Evidence from molecular data. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86, 710-715.
- Boyce, T.M., Zwick, M.E., Aquadro, C.F., 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* 123, 825-836.
- Brandstätter, A., Sängler, T., Lutz-Bonengel, S., Parson, W., Béraud-Colomb, E., Wen, B., Kong, Q.P., Bravi, C.M., Bandelt, H.J., 2005. Phantom mutation hotspots in human mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 26, 3414-3429.
- Cesari, M., Marescalchi, O., Francardi, V., Mantovani, B., 2005. Taxonomy and phylogeny of European *Monochamus* species: first molecular and karyological data. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 43, 1-7.
- Coyer, J.A., Hoarau, G., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2004. Geographically specific heteroplasmy of mitochondrial DNA in the seaweed, *Fucus serratus* (Heterokontophyta: Phaeophyceae, Fucales). *Mol. Ecol.* 13, 1323-1326.
- Crochet, P.A., Desmarais, E., 2000. Slow rate of evolution in the mitochondrial control region of gulls (Aves: Laridae). *Mol. Biol. Evol.* 17, 1797-1806.
- Frey, J.E., Frey, B., 2004. Origin of intra-individual variation in PCR-amplified mitochondrial cytochrome oxidase I of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae): mitochondrial heteroplasmy or nuclear integration? *Hereditas* 140, 92-98.
- Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 34, 397-423.
- Godfrey, H.C.J., 2002. Challenges for taxonomy. *Nature* 417, 17-19.
- Hancock, D.K., Tully, L.A., Levin, B.C., 2005. A Standard Reference Material to determine the sensitivity of techniques for detecting low-frequency mutations, SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA. *Genomics* 86, 446-461.
- Harry, M., Solignac, M., Lachaise, D., 1996. Adaptive radiation in the Afrotropical region of the Palearctic genus *Lissocephala* (Drosophilidae) on the pantropical genus *Ficus* (Moraceae). *J. Biogeogr.* 23, 543-552.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 270, 313-321.
- Hellrigl, K.G., 1971. La bionomie des espèces de *Monochamus* (Coleoptera, Cerambycidae) et leur importance pour la sylviculture et l'économie du bois. *Redia* 52, 367-511.
- Hoarau, G., Holla, S., Lescasse, R., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2002. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2261-2264.
- Ibarguchi, G., Friesen, V.L., Lougheed, S.C., 2006. Defeating *numts*: Semi-pure mitochondrial DNA from eggs and simple purification methods for field-collected wildlife tissues. *Genome* 49, 1438-1450.

- Jordal, B.H., 2007. Reconstructing the Phylogeny of Scolytinae and Close Allies: Major Obstacles and Prospects for a Solution. USDA Forest Service Proceedings 45, 3-9.
- Karro, J.E., Yan, Y., Zheng, D., Zhang, Z., Carriero, N., Cayting, P., Harrison, P., Gerstein, M., 2007. Pseudogene.org: a comprehensive database and comparison platform for pseudogene annotation. Nucleic Acids Res. 35, D55-D60.
- Katsares, V., Apostolidis, A., Triantafyllidis, A., Kouvatsi, A., Triantaphyllidis, C., 2003. Development of mitochondrial DNA primers for use with Homarid lobsters. Mar. Biotechnol. 5, 469-479.
- Keller, I., Bensasson, D., Nichols, R.A., 2007. Transition-Transversion Bias Is Not Universal: A Counter Example from Grasshopper Pseudogenes. PLoS Genetics 3, 185-191.
- Keohavong, P., Thilly, W.G., 1989. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9253-9257.
- Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E.T., Ishiwa, H., Takahata, N., Chigusa, S.I., 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in drosophila. Genetics 126, 657-663.
- Kvist, L., Martens, J., Nazarenko, A.A., Orell, M., 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). Mol. Biol. Evol. 20, 243-247.
- Ladoukakis, E.D., Zouros, E., 2001. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. 18, 1168-1175.
- Lopez-Vaamonde, C., Rasplus, J.Y., Weiblen, G.D., Cook, J.M., 2001. Molecular Phylogenies of Fig Wasps: Partial Coclادogenesis of Pollinators and Parasites. Mol. Phylogenet. Evol. 21, 55-71.
- Lopez, J.V., Yuhki, N., Mascuda, R., Modi, W., O'Brien, S.J.O., 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. J. Mol. Evol. 39, 174-190.
- Mamiya, Y., 1976. Pine wilt disease caused by the Pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*, in Japan. Jnp. Agr. Res. Q. 10, 206-212.
- Mestrovic, N., Mravinac, B., Plohl, M., Ugarcovic, D., Bruvo-Madaric, B., 2006. Preliminary phylogeny of *Tribolium* beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) resolved by combined analysis of mitochondrial genes. Eur. J. Entomol. 103, 709-715.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.N., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18, 269-292.
- Mourier, T., Hansen, A.J., Willerslev, E., Arctander, P., 2001. The human genome project reveals a continuous transfer of large mitochondrial fragments to the nucleus. Mol. Biol. Evol. 18, 1833-1837.
- Nickle, W.R., 1970. A taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). J. Nematol. 2, 375-392.
- Nollau, P., Wagener, C., 1997. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. Clin. Chem. 43, 1114-1128.
- Park, J.-M., Manen, J.-F., Schneeweiss, G.M., 2007. Horizontal gene transfer of a plastid gene in the non-photosynthetic flowering plants *Orobanche* and *Phelipanche* (Orobanchaceae). Mol. Phylogenet. Evol. 43, 974-985.
- Pereira, S.L., Baker, A.J., 2004. Low number of mitochondrial pseudogenes in the chicken (*Gallus gallus*) nuclear genome: implications for molecular inference of population history and phylogenetics. BMC Evol. Biol. 4, 1-8.
- Pons, J., Vogler, A.P., 2005. Complex pattern of coalescence and fast evolution of a mitochondrial rRNA pseudogene in a recent radiation of tiger beetles. Mol. Biol. Evol. 22, 991-1000.
- Richly, E., Leister, D., 2004. NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes. Mol. Biol. Evol. 21, 1081-1084.

- Rokas, A., Ladoukakis, E., Zouros, E., 2003a. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol. Evol.* 18, 411-417.
- Rokas, A., Melika, G., Abe, Y., Nieves-Aldrey, J.-L., Cook, J.M., Stone, G.N., 2003b. Lifecycle closure, lineage sorting, and hybridization revealed in a phylogenetic analysis of European oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) using mitochondrial sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 36-45.
- Sama, G., 2002. Atlas of the Cerambycidae of Europe and the Méditerrananean Area. Vit Kabourek, Zlín, 173pp.
- Sekiguchi, K., Kasai, K., Levin, B.C., 2003. Inter- and intragenerational transmission of a human mitochondrial DNA heteroplasmy among 13 maternally-related individuals and differences between and within tissues in two family members. *Mitochondrion* 2, 401-414.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Smith, M.F., Thomas, W.K., L., P.J., 1992. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent. *Mol. Biol. Evol.* 9, 204-215.
- Solignac, M., Monnerot, M., Mounolou, J.C., 1983. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6942-6946.
- Sorenson, M.D., Fleischer, R.C., 1996. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15239-15243.
- Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifacio, L., Mota, M.M., 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3, 89-91.
- Steiner, G., Buhner, E.M., 1934. *Aphelenhoides xylophilus*, n. sp. a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *J. Agric. Res.* 48, 949-951.
- Sunnucks, P., Hales, D.F., 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Biol. Evol.* 13, 510-524.
- Tamura, K., Aotsuka, T., 1988. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochem. Genet.* 26, 815-819
- Teletchea, F., Maudet, C., Hanni, C., 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* 23, 359-366.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 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.
- Woischnik, M., Moraes, C.T., 2002. Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Res.* 12, 885-893.

CHAPITRE IV

(Article en preparation)

« Utilisation de données morphologiques et moléculaires pour la délimitation des taxons dans le complexes espèces soeurs *Monochamus galloprovincialis* - *M. sutor* (Coleoptera Cerambycidae). »

« Use of morphological and molecular data for taxa delimitation in the *M. galloprovincialis* - *M. sutor* (Coleoptera Cerambycidae) sister species complex. »

F.A. Koutroumpa, C. Lopez-Vaamonde, D. Rougon, C. Bertheau, U. Tomiczek,
F. Lieutier, G. Roux-Morabito

L'utilisation de caractères moléculaires pour identifier rapidement des spécimens cryptiques ou à des stades non identifiables est reconnue comme une méthode utile et efficace, même lorsqu'un faible nombre de différences moléculaires sont considérées, comme le démontre le vaste programme de "barcoding" (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b; Sperling and Hickey, 1994). Cependant, la délimitation des espèces requiert idéalement des données provenant de différentes sources, telles que la morphologie, le comportement et de multiples marqueurs moléculaires. Cette démarche est d'autant plus pertinente dans l'application de diagnose moléculaire d'insectes d'importance économique. En effet, les problèmes économiques engendrés par ces insectes sont souvent associés aux variations morphologiques, écologiques ou comportementales de sous-groupes à l'intérieur de l'espèce (par exemple formes, écotypes).

Monochamus galloprovincialis et *M. sutor* sont considérés comme deux espèces sœurs, morphologiquement très proches, non identifiables à l'état larvaire, mais présentant toutefois des caractéristiques écologiques distinctes. Cependant, ces deux espèces peuvent être observées en sympatrie, sur un même arbre hôte, phénomène qui risque de s'amplifier avec les changements environnementaux, notamment le réchauffement climatique. Il existe des critères d'identification taxonomique propres à chacune des deux espèces ou à leurs formes respectives (Hellrigl, 1971; Villiers, 1978; Vives, 2000), cependant l'observation d'une grande variabilité morphologique des spécimens échantillonnés démontre l'insuffisance de l'utilisation de certains caractères supposés diagnostiques.

L'étude de la variabilité aux niveaux intra- et interspécifiques comporte deux intérêts fondamentaux. Elle permet d'évaluer, d'une part, l'importance de la variabilité génétique au sein de l'espèce et de la comparer à la variabilité interspécifique observée, et permet ainsi de définir un « seuil de diversité génétique » permettant de délimiter les espèces. Elle permet, d'autre part, de préciser les processus historiques susceptibles d'avoir influencé et façonné la distribution et la structuration génétique actuelle. Ces processus historiques peuvent être récents, comme le reboisement et la gestion forestière, ou beaucoup plus anciens, liés aux phénomènes de contraction et expansion des populations lors des épisodes glaciaires.

L'objectif de cette étude était d'étudier la variabilité intra- et interspécifique des deux espèces sœurs, *M. galloprovincialis* et *M. sutor* au niveau moléculaire et morphologique. Un fragment du gène mitochondrial COI de 792pb a été séquencé pour 73 individus de *M. galloprovincialis* échantillonnés dans 28 populations en Europe et 1 population marocaine, ainsi que pour 49 individus de *M. sutor* échantillonnés dans 14 populations européennes. Dans

le but d'approfondir l'étude de la structure génétique du vecteur du nématode du pin, un second fragment mitochondrial, le COII de 521pb, a été séquencé pour *M. galloprovincialis* uniquement. De plus, 15 caractères morphologiques, y compris les caractères du système reproducteur mâle (généralia), ont été utilisés. Pour les généralia des femelles nous n'avons pas observé de variabilité (Annexe IV.IV)

Les deux marqueurs, ADNmt et morphologie, ont permis la délimitation des deux espèces sœurs, avec 12 mutations dans le gène COI et 4 caractères morphologiques diagnostiques. C'est la première étude qui démontre la délimitation de ces deux espèces en référence à un caractère de généralia, la « pièce copulatrice » (la variabilité intraspécifique de ce caractère est présentée en Annexe IV.II et IV.III). Malgré le fait que les distances génétiques observées entre les deux espèces atteignent seulement 3,1%, la distribution des distances intra- et interspécifiques a clairement démontré qu'il s'agit bien de distances interspécifiques. Ce résultat est cohérent avec ceux de Cesari et al. (2005) et ceux de Kawai et al. (2006) obtenus entre différentes espèces de *Monochamus*. La séparation des deux espèces se serait donc effectuée récemment, entre 1,35 et 2,07 millions d'années, en référence à l'horloge moléculaire calibrée pour le genre *Tetraopes* (Coleoptera Cerambycidae) (Farrell, 2001) et pour d'autres arthropodes (Brower, 1994; Quek et al., 2004).

Aucun caractère morphologique ou moléculaire n'a permis de séparer les différentes formes de ces espèces (*M. g. galloprovincialis* - *M. g. pistora* et *M. s. sutor* - *M. s. pellico*).

Concernant l'étude de la structuration et de la différenciation des populations de *M. sutor*, deux grands groupes d'haplotypes ont été mis en évidence. Le premier clade regroupait les individus les plus nordiques de l'échantillonnage tandis que le second clade regroupait les individus échantillonnés plus au sud. La plus grande diversité a été observée dans les Alpes, regroupant pour moitié des individus du premier clade et des individus appartenant au second clade. Une telle diversité a déjà été observée pour autres espèces dans la région alpine (Godoy et al., 2004) et des phénomènes comme l'hybridation et l'introgession ne peuvent pas être exclus (Barilani et al., 2007; Deschamps-Cottin et al., 2000; Rees et al., 2003; Schelly et al., 2006), de même que le rôle de zones refuges pendant les glaciations.

La forte variabilité morphologique observée entre les individus de *M. galloprovincialis* et l'absence de critères moléculaires fiables permettant de différencier les différentes formes, nous a conduit à envisager l'existence de plus de deux formes morphologiques chez *M. galloprovincialis*. Cependant, un échantillonnage plus important dans toute l'aire de répartition de *M. galloprovincialis* est nécessaire pour envisager de

conclure sur le statut spécifique de cette espèce. L'importante variabilité génétique révélée par un grand nombre d'haplotypes pourrait être reliée à une grande capacité d'adaptation, puisque des individus de *M. galloprovincialis* ont été piégés sur différents arbres hôtes (5 pins et 1 épicéa), dans une large distribution géographique et sous des climats différents comme les côtes atlantique, méditerranéenne, dans les plaines et en montagne jusqu'à 1600 m d'altitude. L'association d'une grande variabilité génétique avec une large distribution géographique et avec l'oligophagie a été observée chez d'autres coléoptères (Cognato et al., 2005; Horn et al., 2006; Kelley et al., 2000; Ritzerow et al., 2004; Roux-Morabito et al., in press).

L'étude de la différenciation génétique des populations de *M. galloprovincialis* a révélé la séparation des haplotypes en deux clades. Le premier clade montre une structuration géographique pour deux groupes d'haplotypes majoritaires, l'un regroupant les populations du Sud-Ouest de la France et l'autre celles du Sud-Est de la France. Le second clade regroupe des haplotypes observés pour des individus largement distribués dans l'aire de distribution de l'espèce. Les oscillations climatiques durant la période Quaternaire ont dû influencer la structuration des haplotypes de cette espèce, mais la forte variabilité observée pourrait être le résultat du regroupement d'haplotypes provenant de différents refuges glaciaires, la France représentant un carrefour pour de nombreuses routes de recolonisation. Les facteurs anthropogéniques, la gestion forestière ou le reboisement, ont sans doute fortement influencé la structure génétique actuelle de cette espèce. D'autre part, la capacité de vol à longue distance de cet insecte et la nécessité de trouver des arbres hôtes favorables pendant les deux phases de dispersion (nutrition et oviposition) ne doivent pas être négligées.

Use of morphological and molecular data for taxa delimitation in the *M. galloprovincialis* - *M. sutor* (Coleoptera Cerambycidae) sister species complex.

F.A. Koutroumpa, C. Lopez-Vaamonde, D. Rougon, C. Bertheau, U. Tomiczek,
F. Lieutier, G. Roux-Morabito

Abstract

Monochamus galloprovincialis, vector of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, recently introduced in Portugal, presents a large Palearctic distribution like its sister species *M. sutor*. Morphological and genetic delimitation of these species and their European forms (*M. g. galloprovincialis* - *M. g. pistor* and *M. s. sutor* - *M. s. pellio*) is not clear even though crucial for the surveillance and management of the nematode. Four morphological characters were in accordance with the data (12 polymorphic sites) obtained by the COI mitochondrial gene fragment used for the two species delimitation. The most unambiguous morphological character capable to delimitate by its own the two species was found on the male genitalia. This is the first time that the genitalia of these species are used for their delimitation. Markers used failed to discriminate the different forms. A fragment of the COII gene was also used to study intraspecific variability within *M. galloprovincialis* populations.

1. Introduction

Accurate species delimitation is crucial for biodiversity assessments, invasive species recognition and biological control projects success (Brockerhoff et al., 2006; Darling and Blum, 2007). Many pest insects that were previously considered wide spread species are probably complexes of cryptic or sister species with slight differences in their ecology (Hajibabaei et al., 2006; Hebert et al., 2004; Miller, 2007; Pizzo et al., 2006; Smith et al., 2007; Smith et al., 2006). Economic development and increased international commerce are leading to higher species extinction rates, and the introduction of invasive pest species and populations constitute a major threat to biodiversity, ecosystem integrity, agriculture and

public health (Lee, 2002; Miller, 2007). Many insects and pathogens associated can easily pass unnoticed either within live plant material either within crating, pallets wooden spools and all kinds of commercial cargo (Liebhold et al., 1995; Macdonald and van Wilgen, 2002; Mattson et al., 2007; Storer et al., 1999). Coleoptera and mainly xylophagous ones are among the most important invasive pests and vectors of invasive (or not) pathogens. They are the second most abundant insect order introduced in Europe (16% of the North American and 23% of the Asian insects introduced) (Mattson et al., 2007). Molecular techniques were developed at a critical time for taxonomy. Classic taxonomy often averred insufficient for accurate taxa delimitation especially when immature insect stages are implemented (Arnedo and Gillespie, 2006; Nazari et al., 2007). Long comparative procedures used till now demanded to be replaced by new, faster and unambiguous methods.

The genus *Monochamus* (Coleoptera Cerambycidae) includes about 150 different species spread all around the world, besides South America, and more abundantly in equatorial Africa where its species attack coffee and cocoa (Hellrigl, 1971). Being secondary and in most cases not very dangerous pests, *Monochamus* species begun to interest scientists after their association with the Pine Wood Nematode (PWN) *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner 1934; Nickle 1970) (Nematoda: Aphelenchoididae). This nematode is the causative agent of the Pine Wilt Disease (PWD) (Kiyohara and Tokushige, 1971), is inferred to be native to the North America. It causes severe damage on Pine forests in Japan and eastern Asia where he is vectored and transmitted to the trees by *M. alternatus* (Hope, 1842) and *M. saltuarius* (Gebler, 1830) (Evans et al., 1996; Jikumaru and Togashi, 2001; Mamiya, 1988; Mamiya and Enda, 1972). In 1999, *B. xylophilus* has been identified in Portugal near the port of Setubal (Mota et al., 1999) associated with *Pinus pinaster* and *M. galloprovincialis* (Olivier, 1795) (Sousa et al., 2001). In Europe 4 other species of the genus *Monochamus*, besides *M. galloprovincialis*, are present: *M. sutor* (Linnaeus 1758), *M. saltuarius* (Gebler 1830), *M. sartor* (Fabricius, 1787) and *M. urussovi* (Fischer, 1806); all attacking conifers and mainly *Pinus* sp. and *Epicea*. In France the two most abundant species are *M. galloprovincialis* and its sister species *M. sutor* while *M. sartor* is scarcely present. The first two species distribution is very large in Europe and Asia. *M. galloprovincialis* represented by different forms (i.e. *M. g. galloprovincialis* (Olivier, 1795) and *M. g. pistora* (Germar, 1818) as the most widely accepted forms) covers North Africa, the whole Europe and goes further up to Siberia. *M. sutor* (forms *M. s. sutor* (Linnaeus 1758) and *M. s. pellio* (Germar, 1818)) is not present around the mediterranean basin but it is found all around Europe, especially on

mountains, with its southern limits in Pyrenees and the northern Greek mountains. It is also found in Asia up to northern Japan.

Wood trade between European countries is suspected of important population movements and mixtures. This may have an important impact to the evolution of the indigenous populations and therefore accurate taxa delimitation is necessary to the control of an eventual new invasion of the nematode. Molecular markers have been proved efficient tools for species identification and provide valuable insights on population structure (Hebert et al., 2003a; Roe and Sperling, 2007a; Roe and Sperling, 2007b), especially since Hebert (2003a) proposed the use of a barcode for the rapid species identification. However, many studies have shown the need of an integrative taxonomy using multiple lines of evidence (molecular, morphological, behavioral and geographic) for rigorous taxa recognition (Arnedo and Gillespie, 2006; Babik et al., 2005; Nazari et al., 2007; Nice and Shapiro, 1999; Pizzo et al., 2006; Roe and Sperling, 2007a; Roe and Sperling, 2007b).

Even though several studies on *Monochamus* species have started since the arrival of *B. xylophilus* in Portugal, very little is known on the intra- and inter-specific variability of these two species in Europe especially in the taxa delimitation. Whereas genetic structure of *M. alternatus* populations in Japan has already been studied (Kawai et al., 2006), only one study on phylogenetic relationships on European species has been published so far (Cesari et al., 2005) and nothing is known on the genetic structure of their populations at the intraspecific level. Biology and ecology of European *Monochamus* species is very similar and sympatry and syntopy occur (Bense, 1995; Hellrigl, 1971; Mota et al., 1999; Naves et al., 2006a; Naves et al., 2006b; Sousa et al., 2001). Literature on Palearctic *Monochamus* species classic taxonomy seems rather vast (Hellrigl, 1971; Sama, 2002; Villiers, 1978) but references are old and difficulties on their use are often. Therefore, their identification particularly on immature stages can be difficult for people without expertise.

In this study we reconsider morphological characters used till now to describe *M. galloprovincialis* and *M. sutor* and we provide new morphological and molecular markers. The main aim of this study is to test congruence of the two markers used in order to accurately identify the sister species *M. galloprovincialis* and *M. sutor*. We further test the limits of their respective forms (*M. g. galloprovincialis* - *M. g. pistor* and *M. s. sutor* and *M. s. pello*) and investigate morphological and genetic variation within these taxa. Particular attention is given on *M. galloprovincialis* the vector of the PWN in Portugal. The results are of great interest for future studies on *Monochamus* population dynamics. For example, the

potential role of genetic structure could explain variation in the nematode transmission, and the effect of past evolutionary events on current estimates of gene flow.

2. Materials and Methods

2.1 Specimens sampled

A hundred and forty one adults and eight larvae of *M. galloprovincialis* species as well as 49 adults of *M. sutor* species were analyzed. Specimens came from natural populations and were either trapped with cross van traps (French populations) or were kindly offered by different collectors (see table 1). A large part of the *M. galloprovincialis* distribution in southern Europe has been covered by our sampling with special attention in France which occupies a geographical position key for the natural dissemination of the nematode from Portugal to the rest of Europe. In total, 32 populations sampled in France, 5 in Greece, 2 in Portugal, 1 in Spain, 1 in Morocco, and 2 populations of Austria. Individuals from Austrian populations were considered as the *M. g. pistor* form *M. g.* form *pistor* was also considered one individual from the North of Greece with the code GGrF1 (authors identification according to literature) (Table 1). *M. sutor* individuals came from 10 French populations, 2 Greek ones and 1 Austrian. The two individuals from the Austrian population were the *M. sutor* form *pellio*. Sampling was realized on 6 host species (*Pinus sylvestris*, *P. pinaster*, *P. halepensis*, *P. nigra*, *P. brutia*, *Picea abies*) for *M. galloprovincialis* and 3 (*P. sylvestris*, *P. nigra*, *Picea abies*) for *M. sutor*.

Seventy six of the *M. galloprovincialis* individuals had to be withdrawn from the analysis due to co-amplification of nuclear paralogs, Numts (Koutroumpa et al. submitted). Finally, 73 *M. galloprovincialis* individuals with origin 28 populations in Europe and one in Morocco and the totality of the *M. sutor* individuals (49) were used in the molecular cytochrome oxydase (COI) interspecific study (Table 1). Only 60 of the *M. galloprovincialis* individuals and 46 of the *M. sutor* were used for the morphological study due to impossibility to account adult morphological characters (e.g. larvae or seriously damaged specimens, see Table 1).

Table 1. *M. galloprovincialis* and *M. sutor* population characteristics and collectors' names

Population Code	COI	COII	Mophology		Country	Location	Colector	Host species	Date	Latitude	Longitude
			♂	♀							
<i>M. galloprovincialis</i>											
GCom	-	1	-	-	France	Compiègne	D. Mure	<i>P. sylvestris</i>	2004	49°22' N	02°54' E
GPigA	1	-	-	1	France	FD 3 Pignons	B. Germain	<i>P. pinaster</i>	2003	48°24' N	02°33' E
GRam	-	1	-	-	France	Rambouillet	A. Jarsaillon	<i>P. sylvestris</i>	2003,2004	48°38' N	01°49' E
GLor	1	4	-	1	France	Lorris	Authors	<i>P. sylvestris</i>	2003,2004	47°53' N	02°30' E
GEyg	1	-	-	1	France	FD Eygues (com. Rosans)	P. Fee	<i>P. nigra</i>	2004	44°24' N	05°28' E
GAdr	-	2	-	-	France	St André les Alpes	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2004	43°59' N	06°30' E
GDig	-	2	-	-	France	Digne (Les Bains)	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2005	44°05' N	06°13' E
GpFau	2	-	2	-	France	Seyne (Le Faut 1350m)	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2004	44°19' N	06°24' E
GpVer	5	5	3	2	France	Verdaches 1100m	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2005	44°15' N	06°20' E
GpAdr	5	4	2	3	France	St André les Alpes 1100m	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2005	43°59' N	06°30' E
GMey	2	9	1	1	France	Meyrargues	J. Hintzy	<i>P. halepensis</i>	2003,2004	43°28' N	05°38' E
GCor	6	3	2	3	France		P. Girard	<i>P. halepensis</i>	2003,2004	43°44' N	04°00' E
GLG	3	4	2	1	France	Puechagut le Vigan	C. Rulliere	<i>P. nigra</i>	2003,2004	44°01' N	03°34' E
GLar	1	1	1	-	France	Larzac	J-P. Ansonnaud	<i>P. nigra</i>	2005	43°58' N	03°11' E
GAud	1	-	1	-	France	FD de Foufroide		<i>P. halepensis</i>	2004	43°17' N	01°48' E
GTou	1	1	1	-	France	Toulouse		<i>P. nigra</i>	2003	43°36' N	01°26' E
GHer	2	3	1	1	France	Herm (Léon)	J-L. Hautclocq	<i>P. pinaster</i>	2004	43°51' N	01°14' W
GPis	2	2	1	1	France	Pissos	P. Ninosque	<i>P. pinaster</i>	2004	44°18' N	00°46' W
GFar	2	3	1	1	France	Fargues	R. Delpont	<i>P. pinaster</i>	2004	44°11' N	00°11' E
GSarI	5	4	3	1	France	Sare (St Ignace)	C. Van-Meer	<i>P. nigra</i>	2004	43°20' N	01°36' W
GSarL	3	3	-	2	France	Sare (Lizarieta)	C. Van-Meer	<i>P. nigra</i>	2004	43°16' N	01°37' W
GHou	3	-	1	2	France	Hourtin	J-P. Coste	<i>P. pinaster</i>	2004,2005	45°12' N	01°04' W
Gole	3	4	1	2	France	St Pierre d' Oléron	R. Pelloquint	<i>P. pinaster</i>	2003,2004	45°58' N	01°19' W
GP	3	3	-	-	Portugal	Lisbon Troie	P. Naves	<i>P. pinaster</i>	2003	38°22' N	08°47' W
GPOGer	1	-	1	-	Portugal		G. Roux-Morabito				
GEspM	3	1	2	1	Spain	Murcia	D. Gallego	<i>P. pinaster</i>	2004	37°59' N	01°07' W
GMarA	2	2	1	1	Morocco	Atlas mountain		<i>P. pinaster</i>	2003	32°21' N	06°24' W
GGrEr	4 L.	2	-	-	Greece	Eriithres	A. Koutroumpas	<i>P. brutia</i>	2005	38°13' N	23°19' E
GGrB	3 L.	3	-	-	Greece	Bilia	A. Koutroumpas	<i>P. brutia</i>	2005	38°10' N	23°20' E
GGrA	4	5	3	1	Greece	Afete(Magnesia) 300m	A. Koutroumpas	<i>P. brutia</i>	2004,2005	39°22' N	22°56' E
GGrF	1	1	1	-	Greece	Frakto, Mt Rodopi 1200m	A. Koutroumpas	<i>Picea abies</i>	1997	41°15' N	25°30' E
<i>M. g. pistor</i>											
GpAuCa	1	1	1	-	Austria	Carinthia	U. Tomitczek	<i>P. sylvestris</i>	2006	46°45' N	13°51' E
GpAuSo	2	1	1	1	Austria	Sollenau	U. Tomitczek	<i>P. sylvestris</i>	2006	47°53' N	16°14' E
<i>M. sutor</i>											
SuSor	1	-	1	0	France	Sorbiers	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2003	44°33' N	06°06' E
SuDig	1	-	1	0	France	Digne (Les Bains)	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2003	44°05' N	06°13' E
SuCha	2	-	1	1	France	Chatel (Près la Joux)	M. Simon	<i>Picea abies</i>	2004	46°13' N	06°46' E
SuSam	2	-	-	-	France	Samoens			1992	46°05' N	06°43' E
SuAdr	2	-	1	1	France	St André les Alpes	L. Micas	<i>P. sylvestris</i>	2005	43°59' N	06°30' E
SuLG	1	-	1	0	France	Puechagut le Vigan	C. Rulliere	<i>P. nigra</i>	2003	44°01' N	03°34' E
SuMon	1	-	0	1	France	Montels, Midi-Pyrénées			2004	43°00' N	01°28' E
SuIse	1	-	0	1	France	Isere 1260m			2005	45°05' N	05°50' E
SuMed	2	-	0	2	France	Meolans-Revel			2004	44°24' N	06°31' E
SuSeyF	10	-	7	3	France	Seyne (Le Faut) 1350m	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2004	44°19' N	06°24' E
SuSeyM	11	-	7	4	France	Seyne 1600m	D. Rougon	<i>P. sylvestris</i>	2003	44°21' N	06°23' E
SuSeyC	1	-	1	0	France	Seyne (Col Bas) 1700m	Schmit		2005	44°20' N	06°21' E
SuPra	1	-	1	0	France	Prades			2005	42°47' N	01°52' E
SuGrE	6	-	5	0	France	Elatia Mt Rodopi 1550m	A. Koutroumpas	<i>P. nigra</i>	2005	41°15' N	25°30' E
SuGrX	5	-	4	1	France	Elatia Mt Rodopi 1400m	A. Koutroumpas	<i>Picea abies</i>	2005	41°15' N	25°30' E
<i>M. s. pellio</i>											
SupAuNa	2	-	2	0	Austria	Nasswald			2003,2004	47°45' N	15°41' E
<i>M. sartor</i>											
SaSuIB	1	-	-	-	Switzerland	Binntal			1994	46°24' N	08°08' E
<i>M. alternatus</i>											
AJapF	1	-	1	0	Japan	Fukuyama		<i>P. densiflora</i>	2004	47°45' N	15°41' E

L means larvae

For the intraspecific study of *M. galloprovincialis* we used 73 individuals with no pseudogenes for the COI and 75 individuals with no Numts for the COII (Table 1). The same mtDNA fragments and morphological characters were studied for one individual of each of the closely related Cerambycidae species *M. sartor* and *M. alternatus* used as outgroups to the phylogenetic reconstructions (Table 1). However, only *M. alternatus* was used as outgroup for the tree reconstructed with the morphological characters. Insects were frozen at -80°C or in 96-100% ethanol until DNA extraction. One to eleven individuals were examined from each population. Body parts and DNA were kept as vouchers in the L.B.L.G.C. (Laboratoire de Biologie et des Grandes Cultures) in Orléans University in France.

2.2 Morphological methods

Moistening of the specimens is required in order to facilitate the morphological study and the access to all segments, especially genitalia. Genitalia were extracted and disconnected from adjoining membranes. Several specimens' genitalia had to be placed in DERMACIDE foaming solution, for 24 to 48h, in order to clean them up from "fat body" and to loosen adjoining membranes. Genitalia were finally observed in distilled water, photographed and designed on both ventral and lateral views. After examination, they were placed in glycerine in micro-tubes for preservation.

Pictures of all morphological characters studied were taken, with a Canon PowerShot A80 digital camera, through the ocular of a dissecting stereoscope at the exception of the copulatory pieces of *M. sutor* specimens that had to be studied under a microscope because of their small size. Photos were then used to measure all morphological characters using ImageJ 1.32j (Rasband). Genitalia were also designed using a Lucida camera. Vouchers are kept in the L.B.L.G.C.

Selection of characters was guided by previous systematic and morphological studies (Ahrens, 2005; Sanmartin and Martin-Piera, 2003; Takami and Suzuki, 2005; Villiers, 1978). Fifteen characters could be categorized as potentially phylogenetically informative and details on their states are given in the Appendix I.

2.3 Molecular methods

DNA was extracted from one leg (two legs when specimens were small) to permit subsequent morphological observations and to avoid contamination from organisms like the PWN which is found in the tracheas of *Monochamus* (Mamiya, 1976). Extraction and isolation of genomic DNA was performed with the GenElute Mammalian Genomic DNA

miniprep kit (Sigma-Aldrich, St Quentin, France) with final elution to 100 µl. 878 bp COI and 693 bp COII fragments were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the Sigma Red Taq package. The COI gene primers were C1-J-2183a (5'-CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG-3') (Simon et al., 1994) and TL2-N-3014 (5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3') (Simon et al., 1994), and equally the COII were C2-J-3138a (5'-AGA GCC TCT CCT TTA ATA GAA CA-3') (Simon et al., 1994) and TK-N-3782 (5'-GAG ACC ATT ACT TGC TTT CAG TCA TCT-3') (Bogdanowicz et al., 1993). One microliter of DNA extraction, in 50 µl reaction volumes, was used as template for 35 cycles of mtDNA amplification. The reaction was performed in a gradient Peltier Thermal Cycle (PTC-200) under the following conditions: denaturation at 94° C for 1 min, annealing at 45° C for 1min and extension at 72° C for 1 min 30. The initial cycle employed a 3 min denaturation at 95° C and the final cycle had an extension of 72° C for 5 min. PCR products were examined via agarose gel electrophoresis and purified using GenElute PCR Clean-Up kit (Sigma-Aldrich, St Quentin, France). Sequencing of purified PCR products was performed using BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), on both strands. Sequencing reactions were purified using Sephadex G-50 (Amersham; Sigma-Aldrich) and detected with an ABI 3100 automatic sequencer. A fragment of 792 continuous nucleotides of COI and 521 of COII could be reliably read for all specimens amplified. These fragments of COI and COII genes correspond to base pair positions 441-1319 and 1397-2090, respectively, of the *Drosophila yakuba* reference sequence (Simon et al., 1994).

Sequence electropherograms were examined and corrected using Sequence Navigator 1.0.1 (Applied Biosystems) and were aligned with CLUSTAL W version 1.4 (Thompson et al., 1994) as implemented in BioEdit version 4.7.8.

2.3 Data analyses

2.3.1. Analyses at the interspecific level

Regarding the interspecific level, we focus our study on the COI gene because it is less variable than the COII, so more appropriate for these studies (Roe and Sperling, 2007a; Roe and Sperling, 2007b; Roux-Morabito et al., in press). Furthermore, it has been used in the barcoding proposed for the species delimitation by Hebert (2003).

The Incongruence Length Difference (ILD) test was used to test congruence among molecular and morphological data sets and was completed for 1000 iterations. This method determines whether combining of the data sets is appropriate for further phylogenetic

analyses, it has been developed by Farris et al. (1994) and is implemented within PAUP*4b10 (Swofford, 2000) as partition homogeneity test.

We used MODELTEST version 3.7 (Posada and Crandall, 1998) to test the relative fit of 56 models of sequence evolution for the data. Following the likelihood ratio test (Felsenstein, 1988), the most appropriate model of nucleotide substitution was determined as well as the proportion of invariant sites, and γ -shape parameter. To test for homogeneity in rates of COI evolution among lineages we constructed maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees with and without a molecular clock enforced using PAUP. As null hypothesis of the LRT we considered the existence of a homogeneous rate of evolution. The value of LRT is twice the difference of log-likelihood scores from constrained and unconstrained trees, and was compared to a χ^2 distribution with N-2 degrees of freedom (N = number of sequences in the tree). For comparison with ML results, MP trees were also reconstructed using a heuristic search with a simple stepwise addition of sequences and tree bisection-reconnection (TBR) branch-swapping option as implemented in PAUP. The consistency index (CI) and the retention index (RI) were calculated by PAUP. Genetic uncorrected “p” distances were calculated using PAUP.

A MP tree was also reconstructed using the 15 morphological characters and a bootstrap procedure of 1000 iterations was completed. We then, using MacClade v.4.06 (Madison and Madison, 2000), projected one by one these characters onto an initial tree (we used the ML tree of the COI genetic data) in order to detect those that could be informative to the taxonomy of the taxa studied. MacClade traced the evolution of each of these characters by designing on the tree the inferred states of ancestors based on the most parsimonious hypothesis.

MacClade v.4.06 was also used to force monophyly of species or species forms on the topologies and then significance of likelihood differences among these topologies was tested using the Shimodaira – Hasegawa (S-H) test (Shimodaira and Hasegawa, 1999) as implemented in PAUP (1000 replicates).

2.3.2. Analyses at the intraspecific level

Genetic diversity and structure were only studied for *M. galloprovincialis* data from both genes. Due to lack of a large sampling, genetic structure of *M. sutor* was not analysed in this study.

Information on the allelic content of haplotypes, as well as their frequencies were used to estimate genetic structure indices, as haplotype diversity (H) and within-population mean

number of pairwise differences (π), computed using ARLEQUIN version 3.0 (Excoffier et al., 2005). SPSS was used to test the distribution of H and π with the latitude and longitude.

Analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992), as implemented in ARLEQUIN, was used to test the significance of the covariance components associated with the different possible levels of genetic structure (within populations, within groups of populations, among groups) and this for two grouping options: populations clustered by region of sampling and populations clustered by host species.

Haplotype networks were constructed with TCS version 1.21 (Clement et al., 2000) using only COI gene fragment for both species, *M. galloprovincialis* and *M. sutor*.

3. Results

3.1 Analyses at the interspecific level

3.1.1. Sequence divergence and genetic distances

M. galloprovincialis individuals (73) grouped in 9 COI haplotypes while *M. sutor* individuals (49) in 13 COI haplotypes. The alignment of the sequences obtained revealed no deletions or insertions, and 45 polymorphic sites. Twelve diagnostic sites in the COI fragment permitted to undoubtedly separate the two species.

Uncorrected nucleotide distances “p” between *M. galloprovincialis* and *M. sutor* ranged from 0.024 to 0.037 (mean 0.031) while distances with outgroups did not exceed 0.072. No overlap was observed between intraspecific and interspecific pairwise distances, as illustrated in figure 1.

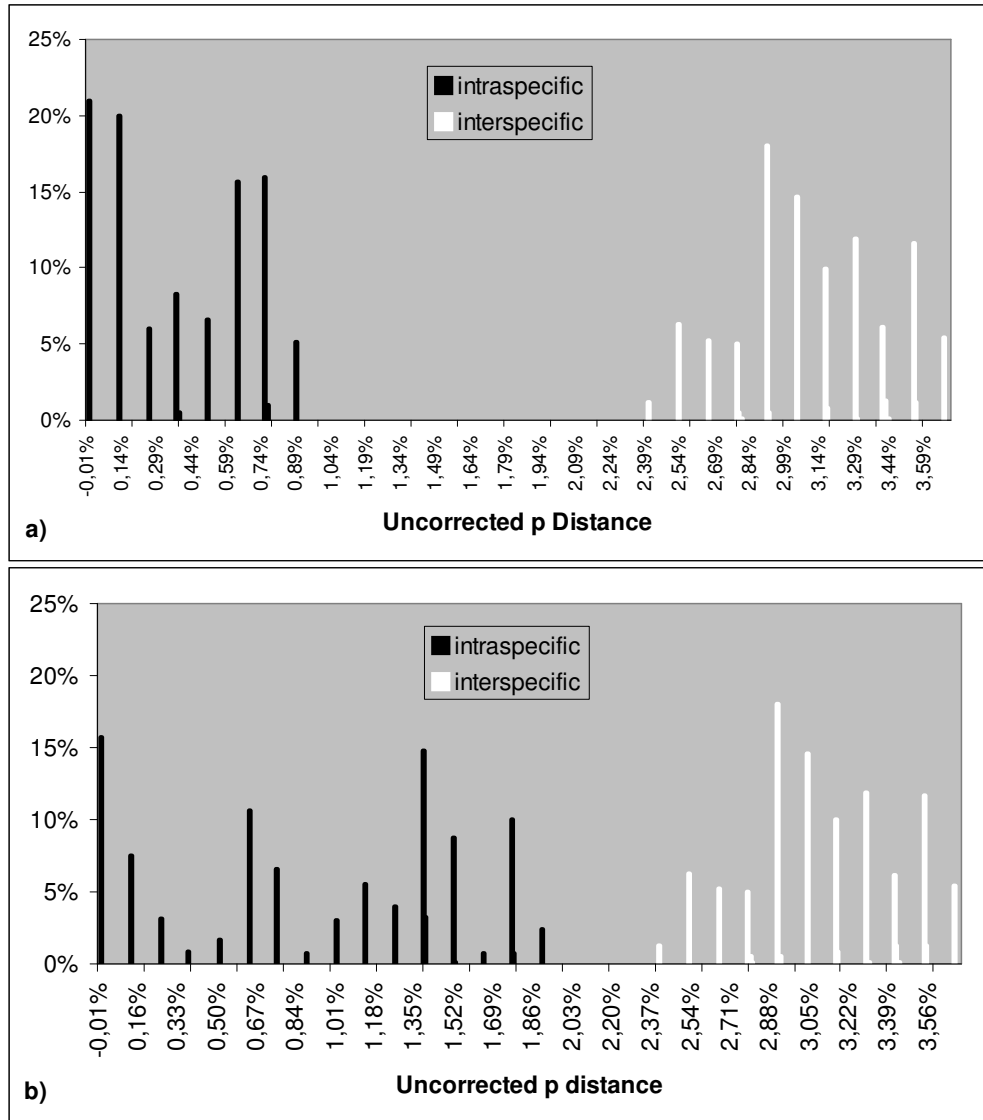


Figure 1. Frequency distribution of intraspecific and interspecific (congeneric) genetic divergence in *Monochamus*. Intraspecific distances correspond a) to *M. galloprovincialis* species and b) to *M. sutor*. Divergences were calculated using uncorrected p distances.

3.1.2. Phylogenetic reconstructions

The ILD test applied on individuals studied genetically and morphologically revealed a significant conflict between the two data sets ($P=0.001$). Therefore, analyses were realized on two separate data sets, COI and morphology.

Maximum parsimony analysis (MP) of the COI fragment resulted in 28 equally parsimonious trees with a length of 121 steps, consistency index (CI) of 0.7851 and retention index (RI) of 0.9795. Modeltest selected the Transversional (TVM + I + G) distance model with a gamma shape parameter 0.7868 and proportion of invariable sites of 0.7336. Both MP and ML consensus phylogenetic reconstructions supported the monophyly of the *M. sutor* species but for *M. galloprovincialis* only the ML reconstruction supported monophyly (Figure 2) while on the MP tree sequences of this species appeared polyphyletic (data not shown). However, the S-H test indicated that there was no significant difference ($p > 0.05$) in the likelihood in which *M. galloprovincialis* and *M. sutor* were constrained to be monophyletic.

No obvious variability was observed on female genitalia, even at the interspecific level and therefore they will not be shown here. MP analysis based on a morphological data matrix of 15 variable characters (8 on external morphology and 7 on male genitalia, see Appendix I and II) yielded 100 most parsimonious trees with a length of 112 steps (CI=0.277, RC=0.233). The resulting topology is shown in Figure 2 and no clade was supported by significant bootstrap values. However, monophyly of *M. sutor* was obvious while *M. galloprovincialis* appeared as polyphyletic on the MP tree (Figure 2). Most probably when all morphological characters were considered together the signal of the informative ones was biased. In order to avoid this bias and manage to identify those capable to separate taxa, we projected them, one by one, on the ML COI consensus tree. With this method we showed the concordance of four morphological characters with the molecular data (ex. Figure 2). These characters corresponded to the form of patches formed by coloured bristle on the elytra of the adults, the sclerotization of the lateral styli of the male genitalia, as well as their colour and finally the most unambiguous character the form of the copulatory piece in the edeagus and they were able to separate the two species, *M. galloprovincialis* and *M. sutor* (Figure 3). Consequently, *M. galloprovincialis* individuals have patches of coloured bristle that form one to three large stripes on their elytra while for *M. sutor* individuals bristle forms points all over their elytra. *M. sutor* sclerotization degree of the lateral styli of the male genitalia is stronger than for *M. galloprovincialis* and their colour is red for the first one and dark brown for the second one. The most unambiguous character that could separate the two species was the copulatory piece in the edeagus which is presented for each species on figure 3).

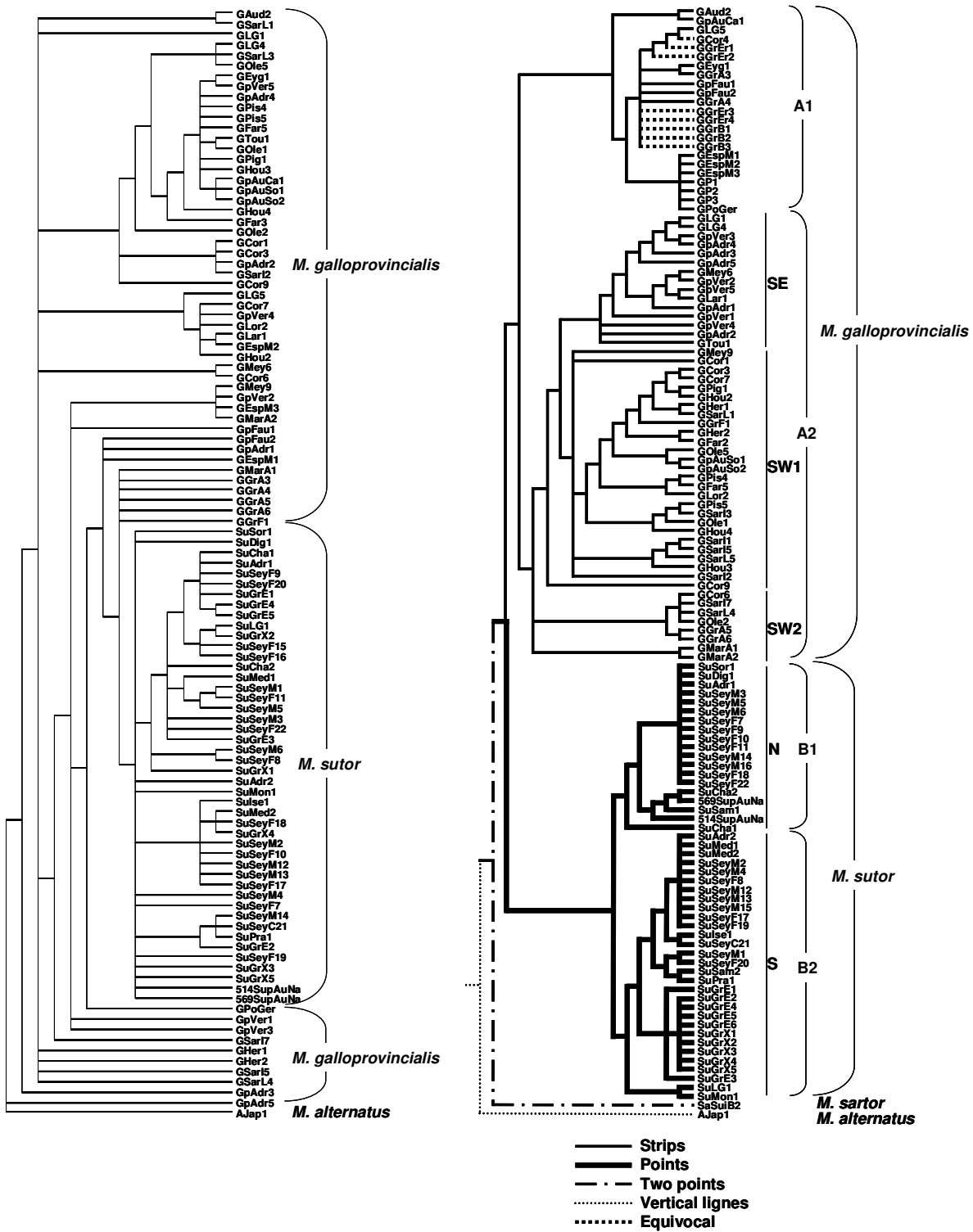


Figure 2. On the left: Consensus MP reconstruction for *M. galloprovincialis* and *M. sutor* species using 15 morphological characters. No BootStrap values were higher than 50% and therefore are not shown. On the right: Consensus ML reconstruction for *M. galloprovincialis* and *M. sutor* species using COI sequence data. Only BootStrap values higher than 50% are shown. In this example, the four different lines, attributed to each branch of the tree, indicate the four different states of the first morphological character (patches on the elytra) separating *M. galloprovincialis* from *M. sutor*. Clades A1 and A2 correspond to *M. galloprovincialis* individuals and clades B1 and B2 to *M. sutor* individuals. SE = South East, SW = South West, N = North and S = South. Population codes were given in Table 1.

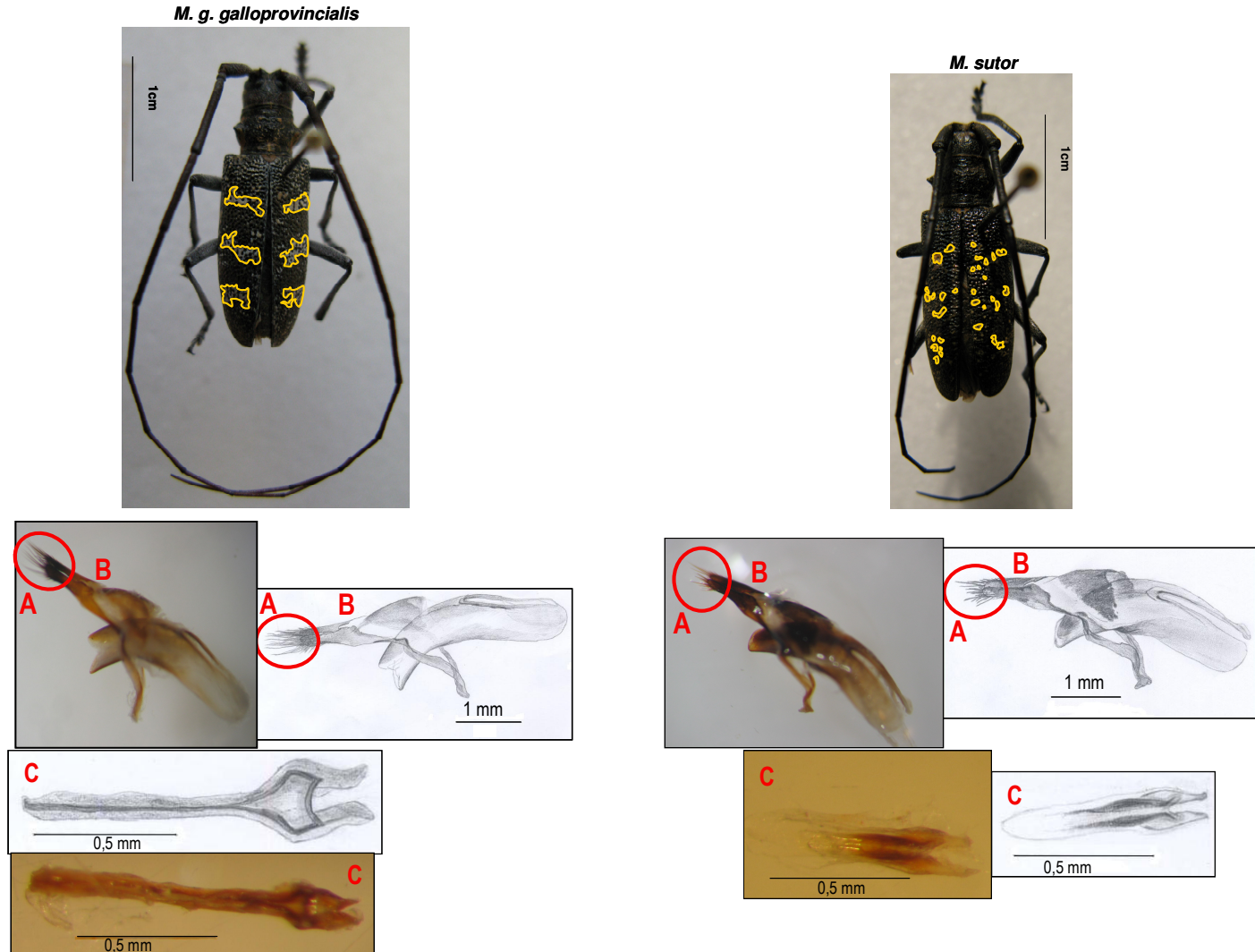


Figure 3. Differences on elytra and male genitalia of the two species *M. galloprovincialis* (left) and *M. sutor* (right): Three stripes on elytra characterize *M. galloprovincialis* and points all over elytra characterize *M. sutor*. The lateral styli are less sclerotized (A) with brown setae (B) for *M. galloprovincialis* and more sclerotized with red setae for *M. sutor*. The form of the sclerotized part of the copulatory piece (C) has an elongated thin shape for *M. galloprovincialis* and is heart shaped for *M. sutor*.

3.2. Analyses at the intraspecific level

3.2.1. Taxa delimitation

None of the molecular and morphological reconstructions (described in paragraph 3.1.2) was able to delimitate the species forms, *M. g. galloprovincialis* – *M. g. pistor* and *M. s. sutor* – *M. s. pellio*. Nevertheless, when considering two morphological characters (antennae and feet color), proposed by some authors (Hellrigl, 1971; Sama, 2002; Villiers, 1978) to discriminate the *pistor* form, and based on the three Austrian individuals, previously identified as *M. g. pistor*, only one specimen (the GGrF1 from Greece) could belong to the *pistor* form. According to Villiers (1978), this form has a smaller body size and rare ochre elytra bristle like this specimen. Furthermore this individual shared the same COI haplotype with two of the Austrian *M. g. pistor* and several French *M. galloprovincialis* individuals. Regarding the other adults with black antennas and feet (Greek and Spanish specimens), they had a remarkably more important body size and their elytra bristle was white and dense forming clear transversal stripes. According to Villiers (1978) such specimens would probably belong to the *M. galloprovincialis* variety *paredeli* (Théry) but we have no more information in the literature on this variety and its geographic distribution so we could not conclude on a more detailed identification. Molecular data (COI and COII) did not confirm this separation even though two major clades (A1 and A2) were obvious for *M. galloprovincialis* on the phylogenetic reconstruction (Figure 2). These clades were only separated by one mutational step (see TCS network figure 4).

M. sutor sequences clustered also in two major clades (B1 and B2) on the ML tree (Figure 2). Interestingly, Austrian individuals and individuals sampled from the most northern French populations (frontiers with Switzerland) were clustered in the B1 clade at the exception of one individual from the French Samoens (SuSam2) that was grouped in the B2 clade (Figure 5b). Individuals from Greece and those sampled on the southern French populations (South France and Pyrenees on the frontier with Spain) were clustered in the B2 clade (Figure 5b). Strict monophyly is not observed since individuals coming from populations of the French Alps are equally distributed to the two clades, showing a maximum mixing of these clades in this area.

Likewise, on the haplotype network (Figure 4) the two clades are separated by six mutational steps. Furthermore, individuals from the French Alps clustered in clade B1 were separated by five mutational steps from the *M. s. pellio* individuals from Austria and those clustered in clade B2 were found four mutational steps away from the Greek individuals on

the haplotype network (Figure 4). Anyhow, no morphological character could separate the two forms.

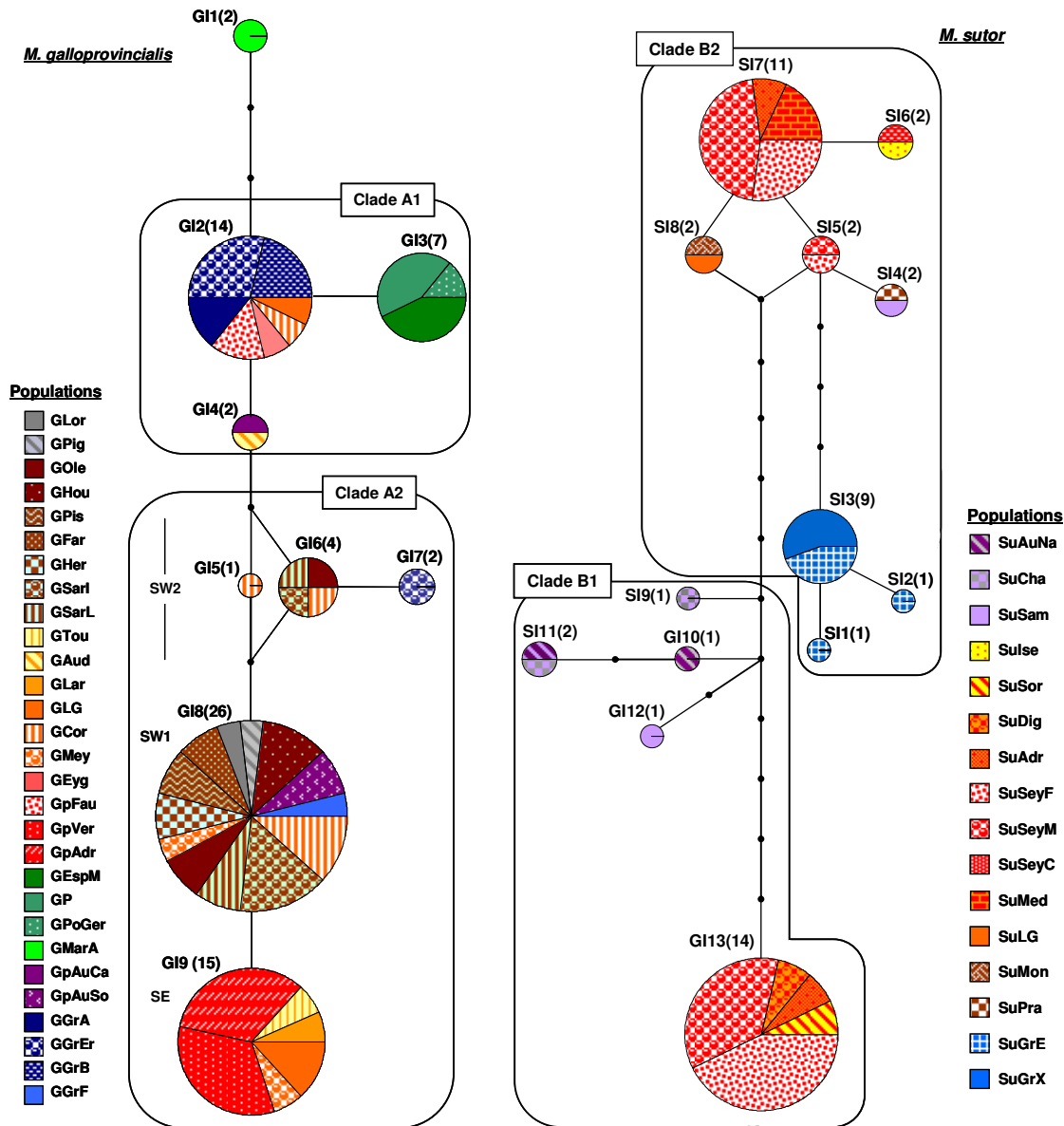


Figure 4. COI TCS network showing population distribution per haplotype. *M. galloprovincialis* to the left and *M. sutor* to the right. Population codes were given in Table 1 and circle size is proportionate to the number of individuals having each haplotype. Clades correspond to those of the ML tree (figure 2).

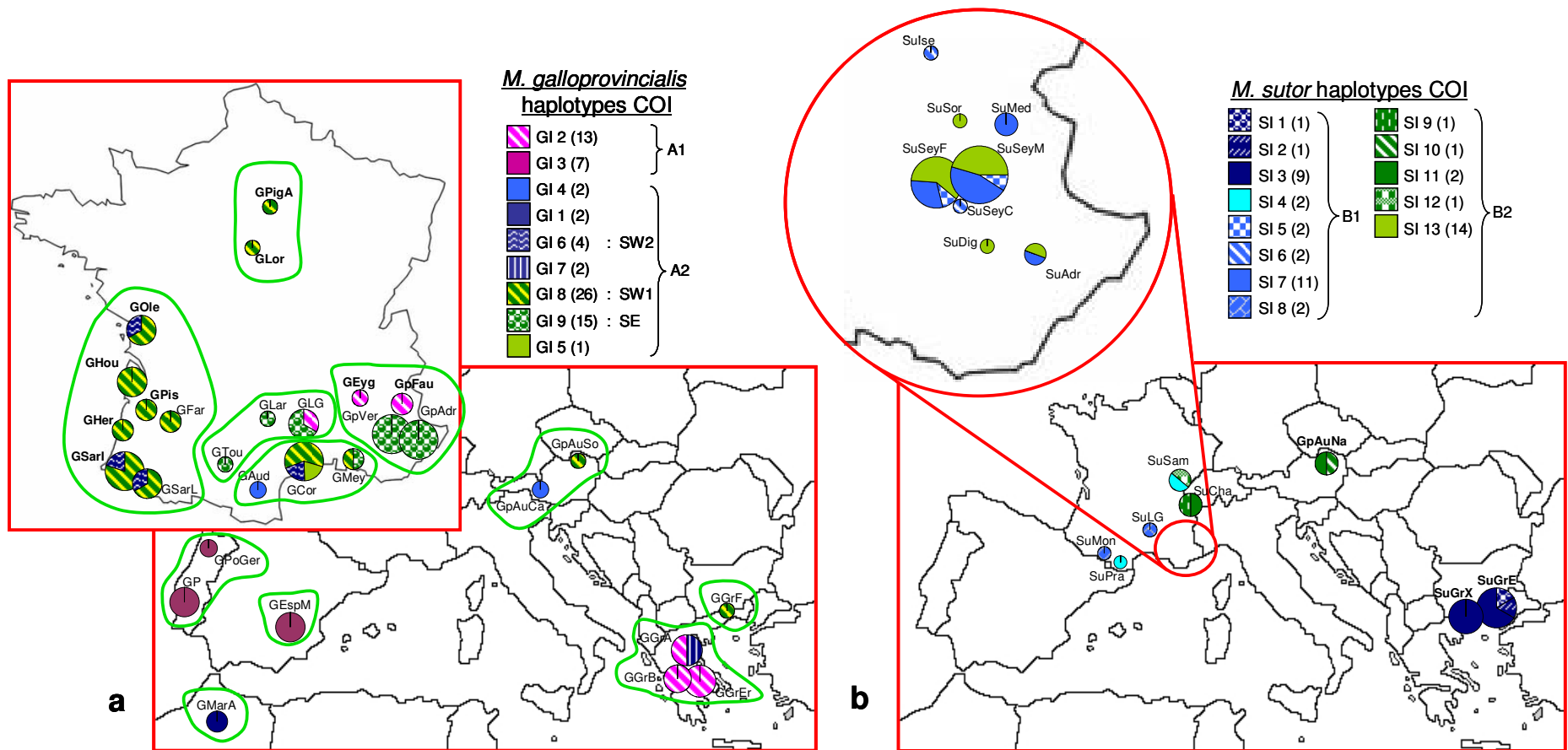


Figure 5. a) *M. galloprovincialis* COI haplotype geographic distribution, in parenthesis number of individuals for each HT. Green delimitations correspond to populations grouping by region for AMOVA. b) Same as the (a) but for *M. sutor*. Population codes were given in Table 1 and circle size is proportionate to the population size. A1, A2, SE, SW1, SW2, B1 and B2 correspond to clades of the ML tree (see figure 2).

3.2.2. Sequence divergence and genetic distances

A total of thirty three (2.5%) polymorphic sites were observed within the species *M. galloprovincialis* (ten (1.26 %) for the COI fragment and twenty three (4.41 %) for the COII), resulting on 9 haplotypes for the COI and on 17 haplotypes for the COII. The number of haplotypes for each *M. galloprovincialis* population is shown in table 2. Twenty five polymorphic sites (3.15%) were found for the forty nine *M. sutor* COI sequences studied (13 haplotypes). Within *M. galloprovincialis* uncorrected p distances varied from 0.000 to 0.009 (mean 0.004) for the COI and from 0.000 to 0.029 (mean 0.013) for the COII and within *M. sutor* from 0.000 to 0.019 (mean 0.009) for the COI.

Table 2. Genetic characteristics of the *M. galloprovincialis* populations: sample size, haplotypes, gene diversity and mean number of pair wise differences for the COI and COII gene.

Code	Number of individuals		Haplotype codes (nb of sequences included when more than 1)		Gene diversity (H)		Mean nb of pair wise differences (π)	
	COI	COII	COI	COII	COI	COII	COI	COII
GCom	0	1	-	GII 2	-	1.00	-	0.00
GPigA	1	0	GI 8	-	1.00	-	0.00	-
GRam	0	1	-	GII 12	-	1.00	-	0.00
GLor	1	4	GI 8	GII 2 (4)	1.00	0.00	0.00	0.00
GEyg	1	0	GI 2	-	1.00	-	0.00	-
GAdr	0	2	-	GII 14, GII 17	-	1.00	-	2.00
GDig	0	2	-	GII 2, GII 17	-	1.00	-	12.00
GpFau	2	0	GI 2 (2)	-	0.00	-	0.00	-
GpVer	5	5	GI 9 (5)	GII 17 (5)	0.00	0.00	0.00	0.00
GpAdr	5	4	GI 9 (5)	GII 17 (4)	0.00	0.00	0.00	0.00
GMey	2	9	GI 8, GI 9	GII 17 (9)	1.00	0.00	1.00	0.00
GCor	6	3	GI 2, GI 6, GI 5, GI 8 (3)	GII 9, GII 13, GII 12	0.80	1.00	2.33	2.66
GLG	3	4	GI 2, GI 9 (2)	GII 2, GII 17 (3)	0.66	0.50	4.00	6.00
GLar	1	1	GI 9	GII 17	1.00	1.00	0.00	0.00
GAud	1	0	GI 4	-	1.00	-	0.00	-
GTou	1	1	GI 9	GII 13	1.00	1.00	0.00	0.00
GHer	2	3	GI 8 (2)	GII 15, GII 13, GII 12	0.00	1.00	0.00	1.33
GPis	2	2	GI 8 (2)	GII 13, GII 12	0.00	1.00	0.00	1.00
GFar	2	3	GI 8 (2)	GII 11, GII 12 (2)	0.00	0.66	0.00	0.66
GSarI	5	4	GI 6, GI 8 (4)	GII 10, GII 12 (3)	0.40	0.50	0.80	2.50
GSarL	3	3	GI 6, GI 8 (2)	GII 10, GII 12 (2)	0.66	0.66	1.33	3.33
GHou	3	-	GI 8 (3)	-	0.00	-	0.00	-
GOle	3	4	GI 6, GI 8 (2)	GII 2, GII 10, GII 12 (2)	0.66	0.83	1.33	7.16
GP	3	3	GI 3 (3)	GII 8 (3)	0.00	0.00	0.00	0.00
GPoGer	1	0	GI 3 (1)	-	1.00	-	0	-
GEspM	3	1	GI 3 (3)	GII 1	0.00	1.00	0.00	0.00
GMarA	2	2	GI 1 (2)	GII 2 (2)	0.00	0.00	0.00	0.00
GGrEr	4	2	GI 2 (4)	GII 4, GII 6	0.00	1.00	0.00	6.00
GGrB	3	3	GI 2 (3)	GII 7, GII 6, GII 5	0.00	1.00	0.00	5.33
GGrA	4	5	GI 2 (2), GI 7 (2)	GII 3, GII 7 (4)	0.66	0.40	2.66	2.80
GGrF	1	1	GI 8	GII 16	1.00	1.00	0.00	0.00
GpAuCa	1	1	GI 4	GII 2	1.00	1.00	0.00	0.00
GpAuSo	2	1	GI 8 (2)	GII-14	0.00	1.00	0.00	0.00

3.2.3. Genetic structure of *M. galloprovincialis* populations

Gene diversity (H) and mean pairwise difference (π) indices for each population and each gene data set (COI and COII) are given in Table 2. H and π were not significantly correlated with the latitude and longitude.

In order to check for geographic or/and host species structure between the French populations, they were grouped by common geographic origin and climatic characteristics as well as by host trees on which they were sampled. AMOVA showed that when grouped by region (Figure 5a) most of the genetic variation was detected among groups and all components of variance partitioning (among groups, among populations within groups and within populations) were highly significant for the two data sets, except among populations within groups for the COI (Table 3).

Table 3. AMOVA results of French *M. galloprovincialis* populations.

Source of variation		a) COI		b) COII	
		Variance components	Percentage of variation	Variance components	Percentage of variation
Grouping by region	Among groups	0.19091 Va	45.43***	0.21138 Va	47.00***
	Among populations within groups	0.05905 Vb	14.05*	0.04787 Vb	10.64***
	Within populations	0.17027 Vc	40.52***	0.19053 Vc	42.36***
Grouping by hosts	Among groups	0.03376 Va	8.54NS	0.04240 Va	9.98NS
	Among populations within groups	0.19139 Vb	48.40***	0.19193 Vb	45.17***
	Within populations	0.17027 Vc	43.06***	0.19053 Vc	44.85***

Only data sets without ambiguities were analyzed: a) COI, b) COII. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 NS: non significant. Shaded boxes indicate the most important percentage for each data

When populations were grouped by host species, most of the genetic variation was found among populations within groups for both COI and COII, these results being significant (P<0.001) and variation among groups being not significant.

The resolution of the COI ML phylogenetic topology for *M. galloprovincialis* was limited by the large number of haplotypes found and a small number of variable sites. Whereas, when considering the haplotype distribution (Figure 5a), the haplotype network (Figure 4) and the phylogenetic reconstruction (Figure 2), *M. galloprovincialis* haplotypes were grouped into two major clades, A1 and A2. The clade A1 is a mixture of six French, one Austrian, the majority of the Greek and all Spanish and Portuguese individuals (Figure 5a). The clade A2 clusters three groups of haplotypes corresponding to the subclades SE, SW1 and SW2 on the ML tree (Figure 2). The first one (SE) was found only in the South and East of France (Figure 5a). The second one (SW1) clustered together two individuals from Austria and the GGrF1 (that most probably belonged to the *M. g. pistor* form), the majority of the individuals coming from the South and West of France and two individuals from the North of France (Figure 5a).

Finally the third subclade (SW2) clustered together individuals from the South West of France and two Greek ones (Figure 5a). For *M. galloprovincialis* this last subclade and the two Moroccan individuals seemed to be the oldest haplotypes of the clade A2 which seems to have derived from the most ancestral haplotypes of the clade A1. A similar pattern was observed for the COII fragment, even though the ILD test revealed significant conflict between the COI and COII genes (data not shown for the COII).

According to the AMOVA the geographic structure found previously was totally due to clade A2 while the A1 clade was not structured geographically. None of these clades were structured by host.

4. Discussion

4.1. Taxa delimitation

Fundamentally a species is determined by separate lineage criteria as monophyly, reproductive isolation or morphological diagnosis. However, species concept seems much more complicated and species delimitation based on a single criterion is highly criticized by numerous authors (Roe and Sperling, 2007a; Roe and Sperling, 2007b; Rubinoff, 2006) and can over- or underestimate species boundaries and diversity. As an alternative, the unified species concept taking into account several criteria for delimiting species and the concordance between several characters, such as morphology, molecular and geographical data, represents an essential approach for rigorously testing species boundaries.

Each marker studied, morphology or mtDNA, allowed delimitation of the two species studied (*M. galloprovincialis* and *M. sutor*) but failed to distinguish the different forms (*M. g. galloprovincialis* - *M. g. pistor* and *M. s. sutor* - *M. s. pellio*). Twelve positions in the COI gene seem to be able to separate *M. galloprovincialis* from *M. sutor*. These diagnostic positions are not found in the barcoding region at the 5' end of COI (600bp) proposed for species delimitation by Hebert (2003a) but to its extension (Jerry – Pat region) in the 3' end direction suggested by Roe and Sperling (2007a) to be significantly more variable and better reflecting sequence divergence within and between species. Four morphological characters (including genitalia) were also able to accurately delimitate these species proving the importance of classic taxonomy and the need of many different sources of information for species identification. Our results permit the accurate and easy identification of *M. galloprovincialis* and *M. sutor* adults in the field without the need of special material as well as the identification of these species immature instars in the laboratory. Similar patterns of species delimitation

using either molecular or informative morphological characters have been observed for the Coleoptera *Aphodiini* (Cabrero-Sanudo and Zardoya, 2004) and for the coneworms of the genus *Dioryctria* (Du et al., 2005). Here we report for the first time the study of male genitalia of *Monochamus* and the unambiguous identification of the two species using a morphological character, the copulatory piece. This character reinforced the hypothesis that the two species probably do not hybridize in the sympatric zones, even though no differences were found between females. Characters like the scutellum form and elytra colour have been the main morphological characters for *Monochamus* species identification proposed in the literature (Hellrigl, 1971; Sama, 2002; Villiers, 1978; Vives, 2000). According to our findings these characters appeared extremely variable between specimens and were difficult to interpret especially for old and trapped individuals that were not well preserved. Therefore, they have not been included in this study. Furthermore, changes of the elytra colour were observed the first days of adult life (unpublished data).

Genetic distances observed between *Monochamus* species were very weak compared to other Coleoptera (Farrell, 2001; Kerdelhué et al., 2002; Monaghan et al., 2005), especially in the interspecific level where an average of 3.1% genetic distance is a mostly common intraspecific divergence. However, graphic representations of intra- and inter-specific distances have clearly shown that they correspond to interspecific distances. Moreover, these results were coherent with genetic distances found so far for other *Monochamus* species (Cesari et al., 2005; Kawai et al., 2006) as well as for the *Diplous* sp. (Coleoptera: Carabidae) (Marek and Kavanaugh, 2005) and means that the two species may have diverged very recently. According to the molecular clock for Coleopteran mitochondrial genes, calibrated from the genus *Tetraopes* (Coleoptera Cerambycidae), 1.5% genetic divergence is equivalent to one million years time (Farrell, 2001), while in general arthropods divergence rates had been calculated between 1.5% (Quek et al., 2004) and 2.3% (Brower, 1994). The first two, more conservative estimations, were calculated using the COI gene and Brower used the COII gene for his calculations that certainly overestimate genetic divergence. Consequently separation of the two *Monochamus* species must have happened 1.35 to 2.07 million years ago (mya), and corresponds to the late Pliocene - beginning of the Pleistocene period. However this kind of estimations should be considered with caution because they may vary between taxa.

No morphological character could separate the two forms of *M. sutor*, *M. s. sutor* and *M. s. pellio* but the two distinct clades observed on the ML tree could probably be attributed to these forms. Geographical pattern of haplotype distribution indicated a North-South clinal distribution of clade proportion. Because the Austrian *M. s. pellio* individuals clustered in the

B1 clade, we could hypothesize that this clade's individuals could all be *M. s. pellio* form, which in this case would be the *M. sutor* form the most adapted to the northern climate than the typical *M. s. sutor* individuals. If this hypothesis is correct, populations of these two forms originated from the French Alps would be sympatric and hybridization could not be excluded. Hybridization phenomena in this area have been observed between two *Parnasius* species, *P. apollo* and *P. phoebus* (Deschamps-Cottin et al., 2000), as well as between chukars and partridge populations, *Alectoris chukar* versus *A. greaca* and *A. rufa* (Barilani et al., 2007). Maximum diversity on the area of the French Alps is common to other animal categories like the vulture, *Gypaetus barbatus*, (Godoy et al., 2004). Furthermore, conflict between molecular and morphological data could be due to potential introgression (Barilani et al., 2007; Rees et al., 2003; Schelly et al., 2006). However, introgression versus incomplete lineage sorting should be confirmed by testing also nuclear markers.

Regarding the different forms of *M. galloprovincialis*, *M. g. galloprovincialis* - *M. g. pistor*, no distinction could be made with the mtDNA and the morphology. Even if two characters (antennae and feet colour) were in accordance with the literature on *M. g. pistor* (Hellrigl, 1971; Sama, 2002; Villiers, 1978; Vives, 2000), these characters were not unique to this form. *M. g. pistor* is considered as the most North-Eastern form of *M. galloprovincialis* in Europe but specimens have been also reported in central Spain, in the South of France and on the French Alps (Vives, 2000). One hypothesis could be the climatic changes during the last century that many times have been suspected to be responsible for northern species migrating to the south and/or southern species going up northern (Bale et al., 2002; Battisti et al., 2005; Hughes, 2000; Parmesan et al., 1999; Walther et al., 2002). The great morphological variability observed in the *M. galloprovincialis* sampling especially in France leads to the hypothesis of the existence of multiple forms of this species and probably not just *M. g. galloprovincialis* and *M. g. pistor*. These forms or intermediate forms of two forms mentioned previously could have appeared due to potential hybridization and introgression (morphology in conflict with mtDNA) (Barilani et al., 2007; Rees et al., 2003; Schelly et al., 2006). Anyhow the different forms of these species are very difficult to delimitate with the markers used here. Other more sensitive and more specific markers like microsatellites should be used in future studies on this aspect. These methods should be applied on a larger sampling that would also help to specify the geographic limits of the taxa studied.

4.2. *M. galloprovincialis* intraspecific variability

At the intraspecific level, divergences between *M. galloprovincialis* individuals were relatively high compared to interspecific distances (maximum intraspecific divergence 2.9%). Moreover, when compared sequence divergence within *M. galloprovincialis*, mean pairwise distances differed significantly between the two genes (0,004 in COI versus 0,009 in COII), the sequence divergence being three times less in the COI (1.26 %) than in the COII (4.41 %)

Relatively high intraspecific variability compared to lower interspecific divergence has also been observed in other forest insects (ex. in cone insects such as *Dioryctria abietella* (Roux-Morabito et al., in press) and in the bark beetles *Pityogenes chalcographus* and *Orthotomicus erosus* (unpublished data). This result, associated to the fact that the ILD test revealed a unexpected significant conflict between the COI and COII genes in our data, assumes that DNA substitution patterns may vary between independent lineages and may change as taxa become increasingly diverged (Galtier et al., 2006). At this point, however, the existence of numts should not be overlooked, even though we *a priori* used sequences without numts. Furthermore, the numts found for *M. galloprovincialis* (Koutroumpa et al. submitted) are very recent and in case of their accidental implication in the analyses they should not change the genes characteristics. Several factors such as functional constraints, mutation hot spots or adaptive substitutions could explain heterogeneous evolutionary rates observed (Innan and Nordborg, 2002; Lunt et al., 1996; Stoneking, 2000). However, such reliance to ILD analysis to test for conflict between data sets has been subjected to controversy. The ILD test seems to be influenced by phylogenetic noise and different levels of homoplasy (Dolphin et al., 2000) as well as small size fragments (Kandul et al., 2004). Furthermore, misleading ILD test results could be due to differences in evolutionary rates between data sets (Barker and Lutzoni, 2002). Dolphin (2000) showed that some data sets were incongruent, according to the ILD test, even when their matrices were represented by similar or identical topologies and he explained this by the different rates evolution observed between these data sets. These remarks are congruent with our study on *M. galloprovincialis* COI and COII genes since the phylogenetic study considering the COI gene versus the COII gene showed congruent reconstructions for this species while important differences were observed on the evolutionary rates of the two data sets. Furthermore, as reliance on short fragment has been subjected to controversy (Roe and Sperling, 2007a; Wahlberg et al., 2003), even if they have commonly been used to identify sister species, especially for DNA barcoding (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b), the combination of more than one DNA region including the COII gene (which was highly variable compared to COI) considerably improved resolution at the intraspecific level.

A great variability within species was observed on the morphological characters studied, likewise a great genetic variability demonstrated by the high number of haplotypes observed for *M. galloprovincialis* populations. Such high variability level could be explained by a wide range of suitable host tree species (five *Pinus* species and one *Epicea*) on which *M. galloprovincialis* has been observed, the large geographic distribution of the species, from the North of Africa until North East of Europe, and the capability of adaptation in different climatic regions. We found this species on the Atlantic and Mediterranean coasts as well as in plains and mountains up to 1600 meters of altitude. Great variability is often associated to polyphagy (Kelley et al., 2000) or/and to a large geographic distribution and this has been shown before for other Coleoptera and forest species (Cognato et al., 2005; Horn et al., 2006; Ritzerow et al., 2004; Roux-Morabito et al., in press).

Despite the great variability mentioned previously, a geographic structure of populations was shown and could play a role of potential barrier to the nematode's propagation. However, when haplotypes are projected on the map, the geographic structure of *M. galloprovincialis* populations is less obvious. Interestingly, the major clade A2 clustered together haplotypes highly structured by the geography in contrast to the smaller A1 clade that clustered fewer haplotypes without geographic structure.

For clade A2 we can not rule out the hypothesis that post climatic oscillations during the Quaternary period may have affected the pattern of genetic variability of *M. galloprovincialis* (Hewitt, 1996). High genetic diversity could be the result of multiple recolonisation origins from different refugia. Balkan and Iberian refugia have certainly influenced the structure of the variability of *M. galloprovincialis* populations. Allelic richness of the Balkan refugia is reinforced by the great variability observed within Greek populations of *M. galloprovincialis*. However, recent events, most probably human activity (ex. wood trade) may have shadowed natural gene flow patterns between them.

The second clade (A1) grouped several specimens from different geographic origins for which no possible colonization scenario can be easily imagined, indicating high gene flow between *M. galloprovincialis* populations. Even though no studies have been conducted on *M. galloprovincialis* dispersal capacities other *Monochamus* species have been proved good flyers especially during the reproductive maturation (Togashi, 1990c). Togashi (1990a) estimated that newly emerged *M. alternatus* adults were able to fly 7.1 to 37.6 m during the first week after emergence and could disperse 50 to 260 m during an average lifespan of about 7 weeks. According to Hellrigl (1971) and Togashi (1990c) adult dispersal occurs twice: firstly during beetle maturation feeding and secondly during mating and oviposition. Moreover females do

not lay all their eggs on the same tree and adequate weakened hosts are necessary for oviposition, as for other xylophagous species (Kerdelhué et al., 2006; Kerdelhué et al., 2002; Sallé et al., 2006). Lack of suitable hosts also accelerates dispersion (Hanks, 1999), especially nowadays that forests are generally well entertained and weakened or recently dead trees are usually scarce. Genetically host species do not constitute a strong barrier to this insect's dispersion since no structure by host was shown by the AMOVA. Same pattern of population structure has been observed for other xylophagous insects, such as the Curculionidae *Hylobius abietis* (Conord et al., 2006) and the bark beetle *Ips typographus* (Stauffer et al., 1999) with stronger role of geography than hosts in populations' differentiation due to increased dispersal ability and need for suitable breeding hosts. Anthropogenic forces, such as forest management practices, wood transportation, have significantly changed and continue to alter forest biodiversity and population structure of numerous species, especially those developing on forest trees, such as xylophagous insects. Introduction of non-native insects in some areas via wood transportation may have profoundly affected the dynamic and genetic structure of *Monochamus* populations that may explain the great diversity observed. In *H. abietis*, human activity by silvicultural extension beyond natural range accelerates dispersal of this pest preventing formation of host races and resulting in great economic impact in forestry. Such human interference could have also influenced *Monochamus* dispersion with tendency of populations' homogenization.

Appendix I

Morphological characters list

External morphology

1. Elytra patch form. Points (1); strips (2); vertical lines (3)
2. Elytra pubescence density. Absence (0); few (1); a lot (2); total elytra surface covered (3).
3. Elytra pubescence colour. Red (0); red and white (1); white (2); yellow (4); mix of grey and red (4)
4. Legs colour. Orange (0); red (1); dark red (2); black (3)
5. Antennas colour. Orange (0); red (1); dark red (2); black (3)
6. Pronotum lateral points. Red (0); black (1); 1red and 1black (2)
7. Pronotum colour. Red and black (0); black (1)
8. Adult body length (head and elytra). Small (11mm-18,5mm) (0); big (18,5mm-26mm) (1)

Male genitalia

9. Tegmen and lateral styli sclerotization. Weak sclerotization (0); strong sclerotization (1)
10. Lateral styli colour. Red (0); black (1)
11. Angle of spiculum gastrale steem. 150°-180° (0), 120°-150° (1), 90°-120° (2)
12. Edeagus length. Short (2-3 mm) (0); long (3-4 mm) (1)
13. Copulatory piece form of the sclerotized part (see figure 3). Form *M. galloprovincialis* (0); form *M. sutor* (1); form *M. alternatus* (no sclerotized part) (1)
14. Copulatory piece branches form. Branches not bind together (0); branches bind together (1); no branches (2).
15. Copulatory piece sclerotized part size. 0.194 – 0.3 µm (0); 0.3 – 0.404 µm (1); 0.884 – 1.37 µm (2); 1.37 – 1.655 µm (3); no sclerotized part (4)

Appendix II

Table 2 Morphological character matrix

Specimen code	Character number														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GAud2	2	1	2	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	3
GLG1	2	1	1	1	1	0	0	1	-	-	-	0	-	-	3
GLG4	2	2	0	1	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-
GLG5	2	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	3
GMey6	2	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	-	-	-
GMey9	2	2	1	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
GCor1	2	1	1	1	1	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-
GCor3	2	1	1	1	1	0	1	0	-	-	-	0	-	-	2
GCor6	2	1	1	1	1	1	1	1	0	1	2	1	1	1	3
GCor7	2	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
GCor9	2	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2
GEyg1	2	2	1	0	1	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
GpFau1	2	1	1	2	2	1	1	1	0	1	0	0	1	0	2
GpFau2	2	1	2	2	2	1	1	1	0	1	1	1	1	0	3
GpVer1	2	1	1	2	2	1	1	1	0	1	0	1	1	1	3
GpVer2	2	2	0	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
GpVer3	2	1	1	2	2	1	1	1	0	1	0	1	1	0	3
GpVer4	2	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	2
GpVer5	2	2	1	1	1	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
GpAdr1	2	1	0	2	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	3
GpAdr2	2	1	1	1	1	0	1	0	0	1	2	1	1	0	2
GpAdr3	2	2	1	1	1	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-
GpAdr4	2	2	0	2	1	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
GpAdr5	2	2	1	0	0	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-
GHer1	2	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	3
GHer2	2	1	1	1	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-
GPis4	2	2	0	2	0	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
GPis5	2	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	2
GFar3	2	2	0	1	1	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-
GFar5	2	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	3
GSar12	2	1	1	2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	2
GSar13	2	2	0	1	1	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-
GSar15	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	3
GSar17	2	1	1	2	2	0	0	1	0	1	0	1	1	0	3
GTou1	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	3
GSarL1	2	1	2	1	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-
GSarL4	2	1	1	1	1	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-
GPig1	2	2	0	1	0	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
GLor2	2	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-	0	-	-	2
Gole1	2	2	0	1	0	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-
Gole2	2	1	0	1	1	0	0	0	-	-	-	0	-	-	2
Gole5	2	2	0	1	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-
GLar1	2	1	1	2	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	3
GHou2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	3
GHou3	2	2	0	1	1	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
GHou4	2	2	0	0	0	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-
GEspM1	2	1	2	2	2	1	1	1	0	1	2	1	1	1	3
GEspM2	2	1	2	2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	3
GEspM3	2	2	1	1	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
GPoGer	2	1	2	2	2	1	1	0	0	1	0	1	1	0	3
GMarA1	2	1	2	3	3	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3
GMarA2	2	2	1	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
GGrA3	2	1	2	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
GGrA4	2	1	2	3	3	1	1	1	0	1	1	1	1	0	3
GGrA5	2	1	2	3	3	1	1	1	0	1	1	1	1	0	3
GGrA6	2	1	2	3	3	1	1	1	0	1	0	1	1	1	2
GpAuCa1	2	2	0	3	3	1	1	0	0	1	1	0	1	-	2
GpAuSo1	2	2	0	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
GpAuSo2	2	2	0	3	3	1	1	0	0	1	-	0	1	-	2
GGrF1	2	0	2	3	3	1	1	0	0	0	-	1	-	-	2
SuSor1	1	1	4	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-

Table 2 continue

Specimen code	Character number														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
SuDig1	1	0	4	3	3	1	1	1	1	0	1	1	2	1	1
SuCha1	1	2	4	3	3	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
SuCha2	1	1	4	3	3	1	1	0	1	0	1	0	2	1	0
SuAdr1	1	2	4	3	3	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
SuAdr2	1	1	4	3	3	1	1	1	1	0	0	1	2	1	1
SuLG1	1	0	0	3	3	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0
SuMon1	1	0	4	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuIse1	1	2	4	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuMed1	1	1	4	3	3	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
SuMed2	1	2	0	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuSeyM2	1	2	4	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuSeyM3	1	1	4	3	3	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
SuSeyM4	1	1	4	3	3	1	1	1	1	0	1	0	2	-	-
SuSeyM5	1	1	4	3	3	1	1	0	1	0	1	0	2	-	-
SuSeyM6	1	1	4	3	3	1	1	1	1	0	2	0	2	1	0
SuSeyF7	1	1	4	3	3	1	1	-	1	0	1	1	2	-	-
SuSeyF8	1	1	4	3	3	1	1	1	1	0	2	0	2	1	0
SuSeyF9	1	2	4	3	3	1	1	0	1	0	1	0	2	-	-
SuSeyF10	1	2	4	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuSeyF11	1	1	4	3	3	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0
SuSeyF12	1	2	4	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuSeyF13	1	2	4	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuSeyF14	1	1	4	3	3	1	1	0	1	0	2	0	2	0	0
SuSeyF15	1	0	4	3	3	1	1	0	1	0	1	0	2	1	1
SuSeyF16	1	0	4	3	3	1	1	0	-	-	-	0	2	1	0
SuSeyF17	1	2	4	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuSeyF18	1	2	0	3	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
SuSeyF19	1	1	4	3	3	1	1	1	1	0	2	1	2	0	1
SuSeyF20	1	2	0	3	3	1	1	0	-	-	-	0	2	1	0
SuSeyF22	1	1	4	3	3	1	1	0	1	0	1	1	2	1	0
SuSeyC21	1	0	4	3	3	1	1	0	1	0	0	0	2	0	1
SuPra1	1	1	4	3	3	1	1	0	1	0	2	0	2	0	1
SuGrE1	1	2	4	3	3	1	1	0	-	-	-	0	2	1	0
SuGrE2	1	1	0	3	3	1	1	0	1	0	1	0	2	0	1
SuGrE3	1	1	4	3	3	1	1	0	-	-	-	0	2	1	0
SuGrE4	1	2	4	3	3	1	1	0	-	-	-	0	2	1	1
SuGrE5	1	2	4	3	3	1	1	0	-	-	-	0	2	1	1
SuGrX1	1	1	4	3	3	1	1	1	1	0	1	0	2	1	0
SuGrX2	1	0	4	3	3	1	1	0	-	-	1	0	2	0	0
SuGrX3	1	0	4	3	3	1	1	1	-	-	1	1	2	1	1
SuGrX4	1	2	0	3	3	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-
SuGrX5	1	1	4	3	3	1	1	1	-	-	1	0	2	1	1
514SupAuNa	1	0	4	3	3	1	1	1	1	0	1	0	2	0	1
569SupAuNa	1	1	4	3	3	1	1	1	1	0	1	1	2	1	1
AJapF1	3	3	5	0	0	1	0	1	0	0	1	1	3	2	4

References

- Ahrens, D., 2005. The phylogeny of Sericini and their position within the Scarabaeidae based on morphological characters (Coleoptera: Scarabaeidae). *Syst. Entomol.* 31, 113-144.
- Arnedo, M.A., Gillespie, R.G., 2006. Species diversification patterns in the Polynesian jumping spider genus *Havaika* Prószyński, 2001 (Araneae, Salticidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 41, 472-495.
- Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja-Isailovic, J., Cogalniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., Poyarkov, N.A., Garcia-Paris, M., Arntzen, J.W., 2005. Phylogeography of two European newt species discordance between mtDNA and morphology. *Mol. Ecol.* 14, 2475-2491.
- Bale, J.S., Masters, G.J., Hodkinson, I.D., Awmack, C., Bezemer, T.M., Brown, V.K., Butterfield, J., Buse, A., Coulson, J.C., Farrar, J., Good, J.E., Harrington, R., Hartley, S., Jones, T.H., Lindroth, R.L., Press, M.C., Symrnioudis, I., Watt, A.D., Whittaker, J.B., 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biol.* 8, 1-16.
- Barilani, M., Bernard-Laurent, A., Mucci, N., Tabarroni, C., Kark, S., Garrido, J.A.P., Randi, E., 2007. Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. *Biol. Cons.* 137, 57-69.
- Barker, F.K., Lutzoni, F.M., 2002. The Utility of the Incongruence Length Difference Test. *Syst. Biol.* 51, 625-637.
- Battisti, A., Stastny, M., Netherer, S., Robinet, C., Schopf, A., Roques, A., Larsson, S., 2005. Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures. *Ecol. Appl.* 15, 2084-2096.
- Bense, U., 1995. Longhorn Beetles, Weikersheim
- Bogdanowicz, S.M., Wallner, W.E., Bell, J., O' Dell, T.M., Harrison, R.G., 1993. Asian gypsy moths (Lepidoptera, Lymantriidae) in North America – Evidence from molecular data. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86, 710-715.
- Brockerhoff, E.G., Liebhold, A.M., Jactel, H., 2006. The ecology of forest insect invasions and advances in their management. *Can. J. For. Res.* 36, 263-268.
- Brower, A.V.Z., 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6491-6495.
- Cabrero-Sanudo, F.J., Zardoya, R., 2004. Phylogenetic relationships of Iberian Aphodiini (Coleoptera: Scarabaeidae) based on morphological and molecular data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 1084-1100.
- Cesari, M., Marescalchi, O., Francardi, V., Mantovani, B., 2005. Taxonomy and phylogeny of European *Monochamus* species: first molecular and karyological data. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 43, 1-7.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, 1657-1659.
- Cognato, A.I., Sun, J.-H., Anducho-Reyes, M.A., Owen, D.R., 2005. Genetic variation and origin of red turpentine beetle (*Dendroctonus valens* LeConte) introduced to the People's Republic of China. *Agr. Forest Entomol.* 7, 87-94.
- Conord, C., Lempérière, G., Taberlet, P., Desprès, L., 2006. Genetic structure of the forest pest *Hyllobius abietis* on conifer plantations at different spatial scales in Europe. *Heredity* 97, 46-55.

- Darling, J.A., Blum, M.J., 2007. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biol. Invasions* 9, 751-765.
- Deschamps-Cottin, M., Aubert, J., Barascud, B., Descimon, H., 2000. Hybridation et introgression entre « bonnes espèces ». Le cas de *Parnassius apollo* et *P. phoebus*. *C. R. Acad. Sci.* 323, 327-337.
- Dolphin, K., Belshaw, R., David, C., Orme, L., Quicke, D.L.J., 2000. Noise and incongruence: interpreting results of the Incongruence Length Difference test. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 401-406.
- Du, Y., Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2005. Phylogenetic framework for *Dioryctria* (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae) based on combined analysis of mitochondrial DNA and morphology. *Can. Entomol.* 137, 685-711.
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J., Magnusson, C., 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *Bull. OEPP* 26, 199-249.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Farrell, B.D., 2001. Evolutionary Assembly of the Milkweed Fauna: Cytochrome Oxidase I and the Age of Tetraopes Beetles. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 467-478.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.
- Felsenstein, J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: inferences and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22, 521-565.
- Galtier, N., Enard, D., Ranondy, Y., Bazin, E., Belkhir, K., 2006. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. *Genome Res.* 16, 215-222.
- Godoy, J.A., Negro, J.J., Hiraldo, F., Donàzar, J.A., 2004. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.* 13, 371-390.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 968-971.
- Hanks, L.M., 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of Cerambycid beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 483-505.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14812-14817.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. (Suppl. 27)*, S96-S99.
- Hellrigl, K.G., 1971. La bionomie des espèces de *Monochamus* (Coleoptera, Cerambycidae) et leur importance pour la sylviculture et l'économie du bois. *Redia* 52, 367-511.
- Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247-276.

- Horn, A., Roux-Morabito, G., Lieutier, F., Kerdelhué, C., 2006. Phylogeographic structure and past history of the circum-Mediterranean species *Tomicus destruens* Woll. (Coleoptera: Scolytinae). *Mol. Ecol.* 15, 1603-1615.
- Hughes, L., 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends Ecol. Evol.* 15, 56-61.
- Innan, H., Nordborg, M., 2002. Recombination or mutational hot spots in human mtDNA? *Mol. Biol. Evol.* 19, 1122-1127.
- Jikumaru, S., Togashi, K., 2001. Transmission of *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) through feeding wounds by *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematology* 3, 325-333.
- Kandul, N.P., Lukhtanov, V.A., Dantchenko, A.V., Coleman, J.W.S., Sekercioglu, C.H., Haig, D., Pierce, N.E., 2004. Phylogeny of *Agrodiaetus* Hübner 1822 (Lepidoptera: Lycaenidae) inferred from mtDNA sequences of *COI* and *COII* and nuclear sequences of EF1-alpha: Karyotype diversification and species radiation. *Syst. Biol.* 53, 278-298.
- Kawai, M., E., S.-K., Maehara, T., Zhihua, Z., Lian, C., Iwata, R., Yamane, A., Hogetsu, T., 2006. Genetic structure of pine sawyer *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) populations in Northeast Asia: consequences of the spread of Pine Wilt Disease. *Mol. Ecol. Evol.* 35, 569-579.
- Kelley, S.T., Farrell, B.D., Mitton, J.B., 2000. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. *Biol. J. Linn. Soc.* 84, 218-227.
- Kerdelhué, C., Magnoux, E., Lieutier, F., Roques, A., Rousselet, J., 2006. Comparative population genetic study of two oligophagous insects associated with the same hosts. *Heredity* 97, 38-45.
- Kerdelhué, C., Roux-Morabito, G., Forichon, J., Chambon, J.-M., Robert, A., Lieutier, F., 2002. Population genetic structure of *Tomicus piniperda* L. (Curculionidae: Scolytidae) on different pine species and validation of *T. destruens* (Woll.). *Mol. Ecol.* 11, 483-494.
- Kiyohara, T., Tokushige, Y., 1971. Inoculation experiments on a nematode, *Bursaphelenchus* sp., on pine trees. *J. Jpn. For. Soc.* 53, 210-218.
- Lee, C.E., 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol. Evol.* 17, 386-391.
- Liebhold, A.M., Macdonald, W.L., Bergdahl, D., Mastro, V.C., 1995. Invasion by exotic forest pests: A threat to forest ecosystems. *For. Sci. Monog.* 30, 1-58.
- Lunt, D.H., Zhang, D.-X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M., 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect. Mol. Biol.* 5, 153-165.
- Macdonald, I.A.W., van Wilgen, B.W. (2002) "Alien invasive species: a global threat to forest ecosystems". In: *GEF*, New York.
- Madison, D.R., Madison, W.P. (2000) *MacClade*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Mamiya, Y., 1976. Pine wilt disease caused by the Pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*, in Japan. *Jpn. Agr. Res. Q.* 10, 206-212.
- Mamiya, Y., 1988. History of Pine Wilt Disease in Japan. *J. Nematol.* 20, 219-226.
- Mamiya, Y., Enda, N., 1972. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica* 18, 159-162.
- Marek, P.E., Kavanaugh, D.H., 2005. The evolutionary relationships of the North American *Diplous* Motschulsky (Coleoptera: Carabidae: Patrobini) inferred from morphological and molecular evidence. *Invertebr. Syst.* 19, 145-168.
- Mattson, W., Vanhanen, H., Veteli, T., Sivonen, S., Niemelä, P., 2007. Few immigrant phytophagous insects on woody plants in Europe: legacy of the European crucible. *Biol. Invasions*.

- Miller, S.E., 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 4775-4776.
- Monaghan, M.T., Balke, M., Gregory, T.R., Vogler, A.P., 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1925-1933.
- Mota, M.M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa, E., 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. Nematology 1, 727-734.
- Naves, P.M., Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2006a. Feeding and oviposition preferences of *Monochamus galloprovincialis* for certain conifers under laboratory conditions. Entomol. Exp. Appl. 120, 99-104.
- Naves, P.M., Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2006b. Reproductive traits of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions. Bull. Entomol. Res. 96, 289-294.
- Nazari, V., Zakharov, E.V., Sperling, F.A.H., 2007. Phylogeny, historical biogeography, and taxonomic ranking of Parnassiinae (Lepidoptera, Papilionidae) based on morphology and seven genes. Mol. Phylogenet. Evol. 42, 131-156.
- Nice, C.C., Shapiro, A.M., 1999. Molecular and morphological divergence in the butterfly genus *Lycaeides* (Lepidoptera: Lycaenidae) in North America: evidence of recent speciation. J. Evol. Biol. 12, 936-950.
- Nickle, W.R., 1970. A taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). J. Nematol. 2, 375-392.
- Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J.K., Thomas, C.D., Descimon, H., Huntley, B., Kaila, L., Kulberg, J., Tammaru, T., Tennent, W.J., Thomas, J.A., Warren, M., 1999. Polewards shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. Nature 399, 579-583.
- Pizzo, A., Roggero, A., Palestrini, C., Cervella, P., Del Pero, M., Rolando, A., 2006. Genetic and morphological differentiation patterns between sisters species: the case of *Onthophagus taurus* and *Onthophagus illyricus* (Coleoptera, Scarabaeidae). Biol. J. Linn. Soc. 89, 197-211.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14, 817-818.
- Quek, S.-P., Davies, S.J., Itino, T., Pierce, N.E., 2004. Codiversification in a ant-plant mutualism: stem texture and the evolution of host use in *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicidae) inhabitants of *Macaranga* (Eupobiaceae). Evolution 58, 554-570.
- Rasband, W. ImageJ, NIH, USA.
- Rees, D.J., Dioli, M., Kirkendall, L.R., 2003. Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African *Hyalomma* (Acari: Ixodidae). Mol. Phylogenet. Evol. 27, 131-142.
- Ritzerow, S., Konrad, H., Stauffer, C., 2004. Phylogeography of the Eurasian pine shoot beetle *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera, Scolytidae). Eur. J. Entomol. 101, 13-19.
- Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2007a. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. Mol. Phylogenet. Evol. 44, 325-345.
- Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2007b. Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: an integrative approach. Mol. Ecol. 16, 3617-3633.
- Roux-Morabito, G., Gillette, N.E., Roques, A., Dormont, L., Stein, J., Sperling, F.A.H., 2008. Systematics of the *Dioryctria abietella* species group (Lepidoptera: Pyralidae) based on mitochondrial DNA. 2008 in press.
- Rubinoff, D., 2006. DNA barcoding evolves into the familiar. Biol. Cons. 20, 1548-1549.

- Sallé, A., Sauvard, D., Horn, A., Frérot, B., Malosse, C., Lieutier, F., 2006. Host preferences in *Tomicus piniperda* and *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae): influence of host monoterpene effluvia. *Eur. J. Entomol.*
- Sama, G., 2002. Atlas of the Cerambycidae of Europe and the Mediterranean Area. Vit Kabourek, Zlín, 173pp.
- Sanmartin, I., Martin-Piera, F., 2003. First phylogenetic analysis of the subfamily Pachydeminae (Coleoptera, Scarabaeoidea, Melolonthidae): the Palearctic Pachydeminae. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 41, 2-46.
- Schelly, R., Salzburger, W., Koblmüller, S., Duftner, N., Sturmbauer, C., 2006. Phylogenetic relationships of the lamprologine cichlid genus *Lepidiolamprologus* (Teleostei: Perciformes) based on mitochondrial and nuclear sequences, suggesting introgressive hybridization. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 426-438.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Smith, M.A., Wood, D.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2007. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4967-4972.
- Smith, M.A., Woodley, N.E., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3657-3662.
- Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifacio, L., Mota, M.M., 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3, 89-91.
- Stauffer, C., Lakatos, F., Hewitt, G.M., 1999. Phylogeography and postglacial colonization routes of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Mol. Ecol.* 8, 763-773.
- Steiner, G., Buhner, E.M., 1934. *Aphelenhoides xylophilus*, n. sp. a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *J. Agric. Res.* 48, 949-951.
- Stoneking, M., 2000. Hyêrvariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1029-1032.
- Storer, A.J., Wood, D.L., Gordon, T.R., 1999. Modification of coevolved insect-plant interactions by an exotic plant pathogen. *Ecol. Entomol.* 24, 238-243.
- Swofford, D.L. (2000) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takami, Y., Suzuki, H., 2005. Morphological, genetic and behavioural analyses of a hybrid zone between the ground beetles *Carabus lewisianus* and *C. albrechti* (Coleoptera, Carabidae): asymmetrical introgression caused by movement of the zone? *Biol. J. Linn. Soc.* 86, 79-94.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 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.
- Togashi, K., 1990a. Change in the activity of adult *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) in relation to age. *Appl. Entomol. Zool.* 25, 153-159.
- Togashi, K., 1990b. A field experiment on dispersal of newly emerged adults of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Res. Popul. Ecol.* 32, 1-13.
- Togashi, K., 1990c. Life table for *Monochamus alternatus* (Coleoptera, Cerambycidae) within dead trees of *Pinus thunbergii*. *Jpn. J. Ent.* 58, 217-230.

- Villiers, A. (1978) I. Cerambycidae. In: *Faune des Coléoptères de France* (ed. LeChevalier, P.), p. 611, Paris.
- Vives, E. (2000) Coleoptera Cerambycidae. In: *Fauna Iberica* (ed. Cientificas, M.N.d.C.N.C.S.d.I.), Madrid.
- Wahlberg, N., Oliveira, R., Scott, J.A., 2003. Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mt DNA variation and species delimitations. *Syst. Entomol.* 28, 257-273.
- Walther, G.-R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J.-M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389-395.

SYNTHESE ET PERSPECTIVES :

DISCUSSION GENERALE

Suite à l'introduction au Portugal et à l'installation sur *P. pinaster* du nématode *B. xylophilus*, véhiculé et transmis par le longicorne xylophage *M. galloprovincialis*, mon travail a été focalisé sur l'étude du vecteur *M. galloprovincialis* en France, tout en accordant une attention aux autres espèces de *Monochamus* et en particulier à l'espèce sœur *M. sutor*. Le nématode est en effet absent de France mais ses vecteurs potentiels (principalement *M. galloprovincialis*) y sont largement présents de même que les espèces de Pins hôtes. Mon travail a été organisé en deux axes complémentaires.

Le premier axe avait comme objectif de préciser les caractéristiques bio-écologiques de *M. galloprovincialis* en France, tandis que le deuxième axe visait la caractérisation de la variabilité génétique et morphologique des espèces de *Monochamus* et les facteurs la structurant.

Caractéristiques bio-écologiques de *M. galloprovincialis*

Nous avons pu décrire assez précisément le cycle biologique de cette espèce au laboratoire sur *P. sylvestris*, en essayant de respecter au mieux les conditions de développement de l'espèce dans la nature (région de Lorris, France). On a confirmé qu'elle avait une fécondité élevée et même peut-être supérieure à ce qui était admis jusqu'à présent (Hellrigl, 1971; Nazari et al., 2007) mais l'essence hôte utilisée était différente. La fécondité s'est avérée plus élevée au début de la période d'oviposition mais reste élevée jusqu'à la fin de cette période. Elle ne dépend pas de la taille de la femelle, ni de la durée de préoviposition. La longévité des femelles est élevée également. Elle s'est avérée plus importante que celle qui a été trouvée au Portugal sur *P. pinaster* mais proche des résultats d'Hellrigl (1971) sur *P. sylvestris* au Nord de l'Europe. Ces résultats, obtenus au laboratoire, peuvent toutefois correspondre à des valeurs supérieures à celles existant dans la nature où les conditions climatiques peuvent être moins favorables et où les individus doivent rechercher leurs substrats alimentaires et de ponte et ne sont pas à l'abri des prédateurs.

Pour la première fois, le nombre de stades larvaires de *M. galloprovincialis* a pu être déterminé. Il en a été observé quatre mais un stade supplémentaire pourrait exister dans la nature (Naves, communication personnelle). Les différents stades ont été décrits en utilisant le poids et la longueur du corps des individus, ainsi que leur localisation dans le rondin de

développement. Les premiers stades (L1 et L2) se développent sous l'écorce et se nourrissent de liber. C'est au troisième stade (larves de 26 jours minimum) que les larves commencent leur activité de forage dans le bois. Toute intervention visant les insectes doit donc s'effectuer avant ce stade si l'on veut éviter les dégâts sur la partie exploitable de l'arbre. D'après Starzyk and Hilszczanski (1997), cette phase d'activité commence 20 jours après l'oviposition pour *M. sutor*. Pour les deux premiers stades, les variations intra-stade de la taille de la capsule céphalique semblent pouvoir être reliées à l'âge des larves et à la période d'oviposition. Les caractéristiques du rondin et la densité des larves influenceraient plutôt la taille des larves de dernier stade (L4) et celle des adultes. La durée totale des émergences intervient pendant une période estivale assez courte, parce que la durée du développement de l'œuf à l'émergence est d'autant plus courte que les œufs dont sont issus les insectes adultes ont été pondus plus tardivement l'année précédente. Tous les stades larvaires sont présents en hiver et au printemps, ce qui signifie que le développement s'arrête en hiver. L'émergence synchronisée de progénitures issues de différentes dates de ponte, est apparemment due à l'existence d'une diapause obligatoire et contrôlée génétiquement, intervenant au dernier stade larvaire, ainsi que démontré au Portugal (Naves, 2007). Cette diapause a pour conséquence l'existence d'une seule génération par an et l'émergence des adultes sous des conditions favorables (ex synchronisation avec l'arbre hôte). Certains individus (environ 8%) continuent cependant leur développement larvaire pendant une deuxième année. Ce pourcentage semble augmenter avec la latitude (Naves, 2007; Tomminen, 1993). Le sex-ratio à l'émergence était légèrement en faveur des mâles.

Nous avons observé un taux de mortalité très élevé dans nos élevages, surtout en 2004, qui semble pouvoir être relié à la faible taille des rondins, d'où la nécessité pour la femelle dans la nature de trouver un substrat adéquat pour l'oviposition.

Les préférences d'hôte ont semblé diverger entre les études de terrain et celles de laboratoire. Au laboratoire, la nutrition et l'oviposition de *M. galloprovincialis* ont eu lieu à la fois sur *P. sylvestris* et *P. pinaster* mais une nette préférence a été observée pour *P. sylvestris* et le développement larvaire était aussi plus rapide sur cette essence. Sur le terrain, la majorité des insectes ont été capturés sur *P. pinaster*, au Sud Ouest de la France. Cette apparente contradiction peut avoir deux explications :

- les adultes utilisés au laboratoire provenaient de *P. sylvestris* et pouvaient donc avoir été conditionnés à se développer sur cette essence.

- l'essence majoritaire dans le Sud de la France est *P. pinaster*, ce qui conduit à se demander si ce choix est une réelle préférence d'hôte et/ou si ce sont simplement les conditions bioclimatiques du Sud, plus favorables à l'insecte, qui font qu'il s'installe sur les hôtes locaux.

Des tests de choix similaires, réalisés au Portugal (en laboratoire), avec des individus provenant de *P. pinaster* ont cependant montré une préférence pour *P. sylvestris* (Naves et al., 2006a). De plus les individus Portugais provenaient d'un climat similaire à celui du Sud de la France. Ainsi, l'insecte préférerait effectivement le Pin sylvestre quand il aurait le choix mais le climat semble être un facteur plus important que l'arbre hôte.

Caractérisation de la variabilité génétique et morphologique des espèces de *Monochamus* et facteurs la structurant

On a tenté de délimiter les deux espèces de *Monochamus* les plus communes en France, *M. galloprovincialis* et *M. sutor* ainsi que leurs formes associées respectives, *M. g. galloprovincialis* - *M. g. pistora* et *M. s. sutor* - *M. s. pellio*, grâce à des approches morphologique et moléculaire. De plus, les relations évolutives de ces espèces ont été précisées au niveau de l'Europe.

Nous avons mis en évidence la présence de pseudogènes sur les séquences mitochondriales de *M. galloprovincialis*, phénomène jamais encore observé chez un Cerambycidae, et problème auquel notre laboratoire se trouvait confronté pour la première fois. Les pseudogènes posent des problèmes aux études moléculaires parce qu'ils sont très difficilement distinguables des séquences nucléotidiques mitochondriales homologues (surtout quand il s'agit de pseudogènes transposés récemment de l'ADNmt dans l'ADNnu). Ainsi, s'ils sont intégrés aux analyses de l'ADNmt, ils peuvent conduire à des phylogénies non représentatives de la réalité et conduire à des erreurs importantes, en particulier dans les études de délimitation d'espèces comme le Barcoding (Hebert et al., 2003b). De plus, il est apparu que les pseudogènes trouvés dans le génome de *M. galloprovincialis* étaient récents (absence de codon stop, mutations majoritairement synonymes à la troisième position de codon et organisation plus proche de celle de l'ADNmt que de celle des pseudogènes) et postérieurs à la séparation de *M. galloprovincialis* et de *M. sutor* (pas de pseudogènes pour cette deuxième espèce). La distribution des pseudogènes est étalée sur toute l'aire de répartition de *M. galloprovincialis* mais des individus n'en contenant pas ont été trouvés au Sud de notre zone d'échantillonnage (à l'exception de l'Autriche). L'hypothèse d'un stress environnemental à l'origine de l'apparition des pseudogènes est donc envisageable.

Des analyses supplémentaires doivent se poursuivre afin de mieux préciser l'origine des pseudogènes et leur position dans le génome. Un échantillonnage plus au Nord de l'Europe est en particulier indispensable pour bien définir leur distribution géographique et confirmer leur absence chez certains individus au Sud. Une fois identifiées, leurs séquences pourraient être utilisées dans les études phylogénétiques, soit comme groupe externe, soit pour évaluer le taux d'évolution relatif entre les séquences mitochondriales et nucléaires, surtout chez les insectes où le sujet est très controversé (Sorenson and Fleischer, 1996; Zhang and Hewitt, 1996). En attendant que d'autres expériences séparent les deux types de séquences (ADNmt et pseudogènes), il s'est donc avéré nécessaire d'éliminer de notre étude de variabilité génétique les individus de *M. galloprovincialis* qui contenaient des pseudogènes, pour éviter de fausses interprétations de résultats.

L'étude de variabilité génétique et moléculaire s'est donc poursuivie avec un échantillonnage limité aux individus sans pseudogènes. On a réussi à délimiter les espèces *M. galloprovincialis* et *M. sutor* en utilisant des caractères moléculaires et morphologiques indéniables. Douze sites polymorphes dans la région la plus proche du 3' du gène de COI ont pu différencier les deux espèces. Pour la première fois les génitalia mâles des deux espèces ont été décrits et la pièce copulatrice s'est avérée un caractère morphologique pouvant à lui seul séparer les deux espèces. Les différences délimitant ces espèces, à la fois moléculaires et morphologiques, restent toutefois très limitées et une variabilité élevée a été mise en évidence. Les distances génétiques confirment que ces espèces sont des espèces sœurs, très proches génétiquement.

Une correspondance entre les différences morphologiques et les différences moléculaires au sein de chaque espèce n'a pas pu être obtenue. Cependant, deux grands groupes d'haplotypes séparés par plusieurs pas mutationnels existent pour *M. sutor*, dont l'un regroupe les individus du nord et l'autre ceux du sud. Cette séparation des haplotypes de *M. sutor* n'a pas pu être attribuée à des caractéristiques morphologiques propres à chaque groupe. La région des Alpes semble avoir la plus grande variabilité génétique avec des individus partagés entre les deux groupes d'haplotypes.

En ce qui concerne *M. galloprovincialis*, une structure géographique a été montrée pour l'un des deux clades séparant les haplotypes du Sud Ouest de ceux du Sud Est de la France. La structuration par la géographie est probablement liée aux refuges glacières. Le deuxième clade, beaucoup moins structuré, regroupe des haplotypes provenant de différents pays et de régions éloignées. Cette migration à longue distance peut certainement s'expliquer par la bonne

capacité de dispersion de ces insectes mais surtout par l'activité humaine (transport de bois). Aucune structure par arbre hôte n'a été mise en évidence.

CONCLUSIONS APPLIQUEES ET PERSPECTIVES

Nos résultats confirment que le risque de propagation du nématode du Pin en France et en Europe, via les Pyrénées et/ou par une nouvelle introduction accidentelle, est très important. Tout d'abord *M. galloprovincialis* a une importante longévité et une fécondité très élevée. Ensuite, il est capable de s'adapter et se développer sur de nombreuses espèces de Pin puisqu'on l'a trouvé sur six espèces de Pin différentes et ces populations n'étaient pas structurées par l'arbre hôte. De plus, il s'adapte à différentes conditions climatiques (e.g. températures et altitude) et la durée de son cycle biologique peut être adaptée en une ou deux années. Enfin, cette espèce a une large distribution en France et en Europe et un flux génique élevé entre ses populations. Les deux périodes de dispersions, la capacité de vol mais surtout l'activité humaine semblent avoir un rôle important à la dispersion de cette espèce. Toutes ces conclusions indiquent un grand risque de dispersion rapide du nématode lors d'une éventuelle introduction en France. En outre, la large distribution géographique, sans structure apparente des populations, montrent qu'ils n'existent pas de barrières pouvant limiter véritablement la dispersion du vecteur. Le seul facteur structurant réellement la distribution géographique de l'insecte pourrait être la température, à des valeurs extrêmes, mais l'on peut légitimement être inquiet compte tenu du contexte de réchauffement climatique actuel.

Dans ce contexte et compte tenu des facteurs anthropogéniques pouvant également affecter la distribution de l'insecte, il serait intéressant de réaliser de nouvelles expériences au laboratoire. Des individus provenant d'arbres hôtes et de localités variées (de France et/ou d'Europe) pourraient être testés à différentes températures pour leurs préférences d'hôtes, ce qui conduirait à des conclusions plus élaborées quant à la flexibilité d'adaptation de *M. galloprovincialis*.

M. sutor est sans doute aussi un vecteur potentiel du nématode puisque génétiquement très proche de *M. galloprovincialis*. Au Japon, cette espèce n'est pas vectrice car les conditions climatiques de sa distribution géographique (Nord du pays) sont mortelles pour le pathogène. En France *M. sutor* est trouvé sous des climats plus modérés et dans certaines régions (Alpes par exemple) en sympatrie avec *M. galloprovincialis*. On l'a trouvé à des moyennes altitudes

sur *P. sylvestris* (hôte commun avec *M. galloprovincialis*) et *Picea abies*. L'espèce *M. sutor* mériterait donc aussi d'être étudiée en France car, plus que *M. galloprovincialis*, elle pourrait être responsable d'une propagation du nématode en altitude et à d'autres arbres hôtes, notamment *Picea abies*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Abad, P., Tares, S., Bruguier, N., Guiran, G., 1991. Characterization of the relationships in the pinewood nematode species complex (PWNSC) (*Bursaphelenchus* spp.) using a heterologous *unc-22* DNA probe from *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* 102, 303-308.
- Ahrens, D., 2005. The phylogeny of Sericini and their position within the Scarabaeidae based on morphological characters (Coleoptera: Scarabaeidae). *Syst. Entomol.* 31, 113-144.
- Akbulut, S., Linit, M.J., 1999. Seasonal effect on reproductive performance of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) reared in pine logs. *Forest Entomol.* 92, 631-637.
- Akbulut, S., Stamps, W.T., Linit, M.J., 2004. Population dynamics of *Monochamus carolinensis* (Col., Cerambycidae) under laboratory conditions. *J. Appl. Entomol.* 128, 17-21.
- Allison, J.D., Borden, J.H., McIntosh, R.L., De Groot, P., Gries, R., 2001. Kairomonal response by four *Monochamus* species (Coleoptera: Cerambycidae) to bark beetle pheromones. *J. Chem. Ecol.* 27, 633-646.
- Anbutsu, H., Togashi, K., 1996. Deterred Oviposition of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) on *Pinus densiflora* bolts from oviposition scars containing eggs or larvae. *Appl. Entomol. Zool.* 31, 481-488.
- Anbutsu, H., Togashi, K., 1997. Oviposition behaviour and response on the oviposition scars occupied by eggs in *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32, 541-549.
- Anbutsu, H., Togashi, K., 2000. Deterred oviposition response of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) to oviposition scars occupied by eggs. *Agr. Forest Entomol.* 2, 217-223.
- Anbutsu, H., Togashi, K., 2001. Oviposition deterrent by female reproductive gland secretion in Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *J. Chem. Ecol.* 27, 1151-1161.
- Anbutsu, H., Togashi, K., 2002. Oviposition deterrence associated with larval frass of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect Physiol.* 48, 459-465.
- Arnedo, M.A., Gillespie, R.G., 2006. Species diversification patterns in the Polynesian jumping spider genus *Havaika* Prószyński, 2001 (Araneae, Salticidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 41, 472-495.
- Ashley, M.V., Laipis, P.J., Hauswirth, W.W., 1989. Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 17, 7325-7331.
- Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.
- Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja-Isailovic, J., Cogalniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., Poyarkov, N.A., Garcia-Paris, M., Arntzen, J.W., 2005. Phylogeography of two European newt species discordance between mtDNA and morphology. *Mol. Ecol.* 14, 2475-2491.
- Bale, J.S., Masters, G.J., Hodkinson, I.D., Awmack, C., Bezemer, T.M., Brown, V.K., Butterfield, J., Buse, A., Coulson, J.C., Farrar, J., Good, J.E., Harrington, R., Hartley, S., Jones, T.H., Lindroth, R.L., Press, M.C., Symrnioudis, I., Watt, A.D., Whittaker, J.B., 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biol.* 8, 1-16.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* 13.

- Barbosa, P., Schaefer, W. (1997) Comparative analysis of patterns of invasion and spread of related lymantriids. In: *Forests and Insects* (eds. Watt, A.D., Stork, N.E., Hunter, M.D.), pp. 153-175. Chapman and Hall.
- Barilani, M., Bernard-Laurent, A., Mucci, N., Tabarroni, C., Kark, S., Garrido, J.A.P., Randi, E., 2007. Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. *Biol. Cons.* 137, 57-69.
- Barker, F.K., Lutzoni, F.M., 2002. The Utility of the Incongruence Length Difference Test. *Syst. Biol.* 51, 625-637.
- Battisti, A., Roques, A., Colombari, F., Frigimelica, G., Guido, M. 1999. Efficient transmission of an introduced pathogen via an ancient insect-fungus association. *Naturwissenschaften* 86, 479-483
- Battisti, A., Stastny, M., Netherer, S., Robinet, C., Schopf, A., Roques, A., Larsson, S., 2005. Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures. *Ecol. Appl.* 15, 2084-2096.
- Beckenbach, K., Smith, M.J., Webster, J.M., 1992. Taxonomic affinities and intra- and interspecific variations in *Bursaphelenchus* spp. as determined by polymerase chain reaction. *J. Nematol.* 24, 140-147.
- Bensasson, D., Petrov, D.A., Zhang, D., Hartl, D.L., Hewitt, G.M., 2001a. Genomic Gigantism: DNA Loss Is Slow in Mountain Grasshoppers. *Mol. Biol. Evol.* 18, 246-253.
- Bensasson, D., Zhang, D.X., Hartl, D.L., Hewitt, G.M., 2001b. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.* 16, 314-321.
- Bensasson, D., Zhang, D.X., Hewitt, G.M., 2000. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Mol. Biol. Evol.* 17, 406-415.
- Bense, U., 1995. Longhorn Beetles, Weikersheim
- Birky, C.W., 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* 35, 125-148.
- Bogdanowicz, S.M., Wallner, W.E., Bell, J., O' Dell, T.M., Harrison, R.G., 1993. Asian gypsy moths (Lepidoptera, Lymantriidae) in North America – Evidence from molecular data. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86, 710-715.
- Bourguet, D., Bethenod, M.T., C., T., Viard, F., 2000. Host-Plant Diversity of the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis*: What Value for Sustainable Transgenic Insecticidal Bt Maize? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 267, 1177-1184.
- Boyce, T.M., Zwick, M.E., Aquadro, C.F., 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* 123, 825-836.
- Brandstätter, A., Sanger, T., Lutz-Bonengel, S., Parson, W., Beraud-Colomb, E., Wen, B., Kong, Q.P., Bravi, C.M., Bandelt, H.J., 2005. Phantom mutation hotspots in human mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 26, 3414-3429.
- Brockerhoff, E.G., Liebhold, A.M., Jactel, H., 2006. The ecology of forest insect invasions and advances in their management. *Can. J. For. Res.* 36, 263-268.
- Brower, A.V.Z., 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6491-6495.
- Brown, J.R., Beckenbach, K., Beckenbach, A.T., Smith, M.J., 1996. Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (Acipmer). *Genetics* 142, 525-535.
- Buroker, N.E., Brown, J.R., Gilbert, T.A., O'Hara, P.J., Beckenbach, A.T., Thomase, W.K., Smith, M.J., 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics* 124, 157-163.

- Cabrero-Sanudo, F.J., Zardoya, R., 2004. Phylogenetic relationships of Iberian Aphodiini (Coleoptera: Scarabaeidae) based on morphological and molecular data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 1084-1100.
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., 2004a. Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics* 166, 883-894.
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2004b. Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics* 167, 835-850.
- Casane, D., Dennebouy, N., de Rochambeau, H., Mounolou, J.C., Monnerot, M., 1994. Genetic analysis of systematic mitochondrial heteroplasmy in rabbits. *Genetics* 138, 471-480.
- Cesari, M., Marescalchi, O., Francardi, V., Mantovani, B., 2005. Taxonomy and phylogeny of European *Monochamus* species: first molecular and karyological data. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 43, 1-7.
- Chesser, R.K., 1998. Heteroplasmy and organelle gene dynamics. *Genetics* 150, 1309-1327.
- Chinnery, P.F., Johnson, M.A., Wardell, T.M., Singh-Kler, E., Hayes, C., Brown, D.T., Taylor, R.W., Bindoff, L.A., Turnbull, D.M., 2000a. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol.* 48, 188-193.
- Chinnery, P.F., Thorburn, D.R., Samuels, D.C., White, S.L., Dahl, H.H.M., Turnbull, D.M., Lightowlers, R.N., Howell, N., 2000b. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet.* 16, 500-505.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, 1657-1659.
- Cocquemot, C., 2006. Alien longhorned beetles (Coleoptera cerambycidae): original interceptions and introductions in Europe, mainly in France, and notes about recently imported species. *Redia* 89, 35-50.
- Cognato, A.I., Sun, J.-H., Anducho-Reyest, M.A., Owen, D.R., 2005. Genetic variation and origin of red turpentine beetle (*Dendroctonus valens* LeConte) introduced to the People's Republic of China. *Agr. Forest Entomol.* 7, 87-94.
- Collura, R.V., Auerbach, M.R., Stewart, C., 1996. A quick, direct method that can differentiate expressed mitochondrial genes from their nuclear pseudogenes. *Curr. Biol.* 6, 1337-1339.
- Conord, C., Lempérière, G., Taberlet, P., Desprès, L., 2006. Genetic structure of the forest pest *Hylobius abietis* on conifer plantations at different spatial scales in Europe. *Heredity* 97, 46-55.
- Coyer, J.A., Hoarau, G., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2004. Geographically specific heteroplasmy of mitochondrial DNA in the seaweed, *Fucus serratus* (Heterokontophyta: Phaeophyceae, Fucales). *Mol. Ecol.* 13, 1323-1326.
- Crochet, P.A., Desmarais, E., 2000. Slow rate of evolution in the mitochondrial control region of gulls (Aves: Laridae). *Mol. Biol. Evol.* 17, 1797-1806.
- Darling, J.A., Blum, M.J., 2007. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biol. Invasions* 9, 751-765.
- Densmore, L.D., Wright, J.W., Brown, W.M., 1985. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (Genus *Cnemidophorus*). *Genetics* 110, 689-707.
- Deschamps-Cottin, M., Aubert, J., Barascud, B., Descimon, H., 2000. Hybridation et introgression entre « bonnes espèces ». Le cas de *Parnassius apollo* et *P. phoebus*. *C. R. Acad. Sci.* 323, 327-337.
- Dillon, L.S., Dillon, E.S., 1941. The tribe Monochamini in the Western Hemisphere (Coleoptera: Cerambycidae). Reading Public Museum and Art Gallery Scientific Publication, 1-135.

- Dimauro, S., Schon, E.A., 2001. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am. J. Med. Gen.* 106, 18-26.
- Dolphin, K., Belshaw, R., David, C., Orme, L., Quicke, D.L.J., 2000. Noise and incongruence: interpreting results of the Incongruence Length Difference test. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 401-406.
- Du, W., Marsac, C., Kruschina, M., Ortigao, F., Florentz, C., 2003. Functionalized self-assembled monolayer on gold for detection of human mitochondrial tRNA gene mutations. *Anal. Biochem.* 322, 14-25.
- Du, Y., Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2005. Phylogenetic framework for *Dioryctria* (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae) based on combined analysis of mitochondrial DNA and morphology. *Can. Entomol.* 137, 685-711.
- Edwards, O., Linit, M., 1992. Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through oviposition wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Nematol.* 24, 133-139.
- Edwards, O.R., Linit, M.J., 1991. Oviposition behaviour of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) infested with the pinewood nematode. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84, 319-323.
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J., Magnusson, C., 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *Bull. OEPP* 26, 199-249.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Fan, J., Sun, J., Shi, J., 2007. Attraction of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternus*, to volatiles from stressed host in China. *Ann. For. Sci.* 64, 67-71.
- Farrell, B.D., 2001. Evolutionary Assembly of the Milkweed Fauna: Cytochrome Oxidase I and the Age of Tetraopes Beetles. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 467-478.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.
- Fauziah, B.A., Hidaka, T., Tabata, K., 1987. The reproductive behavior of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 22, 272-285.
- Felsenstein, J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: inferences and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22, 521-565.
- Francardi, V., Pennacchio, F., 1996. Note sulla bioecologia di *Monochamus galloprovincialis galloprovincialis* (Olivier) in Toscana e in Liguria (Coleoptera Cerambycidae). *Redia* 79, 153-159.
- Francardi, V., Pennacchio, F., Roversi, P.F., Binazzi, A., Leccese, A. (2000) Distribution and abundance of *Monochamus* species in Italy. XXI International Congress of Entomology, 484.
- Frey, J.E., Frey, B., 2004. Origin of intra-individual variation in PCR-amplified mitochondrial cytochrome oxidase I of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae): mitochondrial heteroplasmy or nuclear integration? *Hereditas* 140, 92-98.
- Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level paralogy and polyphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol.* S. 34, 397-423.
- Galtier, N., Enard, D., Ranondy, Y., Bazin, E., Belkhir, K., 2006. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. *Genome Res.* 16, 215-222.

- Godfrey, H.C.J., 2002. Challenges for taxonomy. *Nature* 417, 17-19.
- Godoy, J.A., Negro, J.J., Hiraldo, F., Donàzar, J.A., 2004. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.* 13, 371-390.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 968-971.
- Hancock, D.K., Tully, L.A., Levin, B.C., 2005. A Standard Reference Material to determine the sensitivity of techniques for detecting low-frequency mutations, SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA. *Genomics* 86, 446-461.
- Hanks, L.M., 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of Cerambycid beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 483-505.
- Harry, M., 2001. Génétique moléculaire et évolutive, Paris
- Harry, M., Solignac, M., Lachaise, D., 1996. Adaptive radiation in the Afrotropical region of the Palearctic genus *Lissocephala* (Drosophilidae) on the pantropical genus *Ficus* (Moraceae). *J. Biogeogr.* 23, 543-552.
- Hauswirth, W.W., Laipis, P.J., 1982. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4686-4690.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14812-14817.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. (Suppl. 27)*, S96-S99.
- Hellrigl, K.G., 1971. La bionomie des espèces de *Monochamus* (Coleoptera, Cerambycidae) et leur importance pour la sylviculture et l'économie du bois. *Redia* 52, 367-511.
- Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247-276.
- Hewitt, G.M., 2001. Speciation, hybrid zone and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Mol. Ecol.* 10, 537-549.
- Hoarau, G., Holla, S., Lescasse, R., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2002. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2261-2264.
- Hopkins, A.D., 1917. A discussion of HG Hewitt's paper on "insect behaviour". *J. Econ. Entomol.* 10, 92-93.
- Horn, A., Roux-Morabito, G., Lieutier, F., Kerdelhué, C., 2006. Phylogeographic structure and past history of the circum-Mediterranean species *Tomicus destruens* Woll. (Coleoptera: Scolytinae). *Mol. Ecol.* 15, 1603-1615.
- Hughes, L., 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends Ecol. Evol.* 15, 56-61.
- Ibarguchi, G., Friesen, V.L., Loughheed, S.C., 2006. Defeating *numts*: Semi-pure mitochondrial DNA from eggs and simple purification methods for field-collected wildlife tissues. *Genome* 49, 1438-1450.
- Ibeas, F., Gallego, D., Diez, J.J., Pajares, J.A., 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbidae). *J. Appl. Entomol.* 131, 13-20.
- Innan, H., Nordborg, M., 2002. Recombination or mutational hot spots in human mtDNA? *Mol. Biol. Evol.* 19, 1122-1127.

- Jikumaru, S., Togashi, K., 1995. A Weak Deleterious Effect of the Avirulent Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae), on the Longevity of Its Vector, *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 30, 9-16.
- Jikumaru, S., Togashi, K., 1996. Effect of temperature on the post-diapause development of *Monochamus saltuarius* (Gebler) (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 31, 145-148.
- Jikumaru, S., Togashi, K., 2001. Transmission of *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) through feeding wounds by *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae). Nematology 3, 325-333.
- Jikumaru, S., Togashi, K., Taketsune, A., Takahashi, F., 1994. Oviposition biology of *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) at constant temperature. Appl. Entomol. Zool. 29, 555-561.
- Jordal, B.H., 2007. Reconstructing the Phylogeny of Scolytinae and Close Allies: Major Obstacles and Prospects for a Solution. USDA Forest Service Proceedings 45, 3-9.
- Kandul, N.P., Lukhtanov, V.A., Dantchenko, A.V., Coleman, J.W.S., Sekercioglu, C.H., Haig, D., Pierce, N.E., 2004. Phylogeny of *Agrodiaetus* Hübner 1822 (Lepidoptera: Lycaenidae) inferred from mtDNA sequences of *COI* and *COII* and nuclear sequences of EF1-alpha: Karyotype diversification and species radiation. Syst. Biol. 53, 278-298.
- Kaneda, H., Hayashi, J.I., Takahama, S., Taya, C., Fischer Lindahl, K., 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4542-4546.
- Kann, L.M., Rosenblum, E.B., Rand, D.M., 1998. Aging, mating, and the evolution of mtDNA heteroplasmy in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 2372-2377.
- Karro, J.E., Yan, Y., Zheng, D., Zhang, Z., Carriero, N., Cayting, P., Harrison, P., Gerstein, M., 2007. Pseudogene.org: a comprehensive database and comparison platform for pseudogene annotation. Nucleic Acids Res. 35, D55-D60.
- Katsares, V., Apostolidis, A., Triantafyllidis, A., Kouvatsi, A., Triantaphyllidis, C., 2003. Development of mitochondrial DNA primers for use with Homarid lobsters. Mar. Biotechnol. 5, 469-479.
- Kawai, M., E., S.-K., Maehara, T., Zhihua, Z., Lian, C., Iwata, R., Yamane, A., Hogetsu, T., 2006. Genetic structure of pine sawyer *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) populations in Northeast Asia: consequences of the spread of Pine Wilt Disease. Mol. Ecol. Evol. 35, 569-579.
- Keller, I., Bensasson, D., Nichols, R.A., 2007. Transition-Transversion Bias Is Not Universal: A Counter Example from Grasshopper Pseudogenes. PLoS Genetics 3, 185-191.
- Kelley, S.T., Farrell, B.D., Mitton, J.B., 2000. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. Biol. J. Linn. Soc. 84, 218-227.
- Keohavong, P., Thilly, W.G., 1989. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9253-9257.
- Kerdelhué, C., Magnoux, E., Lieutier, F., Roques, A., Rousselet, J., 2006. Comparative population genetic study of two oligophagous insects associated with the same hosts. Heredity 97, 38-45.
- Kerdelhué, C., Rasplus, J.-Y., 2002. Le séquençage des acides nucléiques et les méthodes d'analyse des données moléculaires en phylogénie. Mémoires de la SEF 6, 97-122.
- Kerdelhué, C., Roux-Morabito, G., Forichon, J., Chambon, J.-M., Robert, A., Lieutier, F., 2002. Population genetic structure of *Tomicus piniperda* L. (Curculionidae: Scolytidae) on different pine species and validation of *T. destruens* (Woll.). Mol. Ecol. 11, 483-494.

- Kim, G.H., Takabayashi, J., Takahashi, S., Tabata, K., 1992. Function of pheromones in mating behavior of the Japanese pine sawyer beetle, *Monochamus alternatus* Hope. Appl. Entomol. Zool. 27, 489-497.
- Kiyohara, T., Tokushige, Y., 1971. Inoculation experiments on a nematode, *Bursaphelenchus* sp., on pine trees. J. Jpn. For. Soc. 53, 210-218.
- Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E.T., Ishiwa, H., Takahata, N., Chigusa, S.I., 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in drosophila. Genetics 126, 657-663.
- Koutroumpa, F.A., Vincent, B., Roux-Morabito, G., Martin, C., Lieutier, F., submitted. Fecundity and larval development of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) in experimental breeding. Ann. For. Sci.
- Kvist, L., Martens, J., Nazarenko, A.A., Orell, M., 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). Mol. Biol. Evol. 20, 243-247.
- Ladoukakis, E., Saavedra, C., Magoulas, A., Zouros, E., 2002. Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. Mol. Ecol. 11, 755-769.
- Ladoukakis, E.D., Zouros, E., 2001. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. 18, 1168-1175.
- Lee, C.E., 2002. Evolutionary genetics of invasive species. Trends Ecol. Evol. 17, 386-391.
- Levieux, J., Cassier, P., 1994. La vexion de champignons pathogènes des résineux par les xylophages forestiers européens. Année Biologique 33, 19-37.
- Liebhald, A.M., Macdonald, W.L., Bergdahl, D., Mastro, V.C., 1995. Invasion by exotic forest pests: A threat to forest ecosystems. For. Sci. Monog. 30, 1-58.
- Lieutier, F. (2006) Changing forest communities: role of tree resistance to insects in insect invasions and tree introductions. In: *Invasive Forest Insects, Introduced Forest Trees, and Altered Ecosystems. Ecological Pest Management in Global Forests of a Changing World* (ed. Paine, T.D.), pp. 15-52. Springer.
- Lightowers, R.N., Chinnery, P.F., D.M., T., Howell, N., 1997. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. Trends Genet. 13, 450-455.
- Lindelöw, A., Björkman, C., 2001. Insects on lodgepole pine in Sweden - current knowledge and potential risks. For. Ecol. Manage. 141, 107-116.
- Linit, M.J., 1988. Nematode-Vector Relationships in the pine wilt disease system. J. Nematol. 20, 227-235.
- Lopez-Vaamonde, C., Rasplus, J.Y., Weiblen, G.D., Cook, J.M., 2001. Molecular Phylogenies of Fig Wasps: Partial Coclادogenesis of Pollinators and Parasites. Mol. Phylogenet. Evol. 21, 55-71.
- Lopez, J.V., Yuhki, N., Mascuda, R., Modi, W., O'Brien, S.J.O., 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. J. Mol. Evol. 39, 174-190.
- Lothe Nesbø, C., Arab, M.O., Jakobsen, K.S., 1998. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). Genetics 148, 1907-1919.
- Lunt, D.H., Zhang, D.-X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M., 1996. The insect cytochrome oxydase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect. Mol. Biol. 5, 153-165.
- Macdonald, I.A.W., van Wilgen, B.W. (2002) "Alien invasive species: a global threat to forest ecosystems". In: *GEF*, New York.
- Madison, D.R., Madison, W.P. (2000) MacClade. Sinauer, Sunderland, MA.
- Mamiya, Y., 1976. Pine wilt disease caused by the Pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*, in Japan. Jpn. Agr. Res. Q. 10, 206-212.

- Mamiya, Y. (1984) The pine wood nematode. In: *Plant and insect nematodes* (ed. Nickle, W.R.), pp. 589-626. Marcel Dekker, New York.
- Mamiya, Y., 1988. History of Pine Wilt Disease in Japan. *J. Nematol.* 20, 219-226.
- Mamiya, Y., Enda, N., 1972. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica* 18, 159-162.
- Mamiya, Y., Enda, N., 1979. *Bursaphelenchus mucronatus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees. *Nematologica* 25, 353-361.
- Marek, P.E., Kavanaugh, D.H., 2005. The evolutionary relationships of the North American *Diplous* Motschulsky (Coleoptera: Carabidae: Patrobini) inferred from morphological and molecular evidence. *Invertebr. Syst.* 19, 145-168.
- Mattson, W., Vanhanen, H., Veteli, T., Sivonen, S., Niemelä, P., 2007. Few immigrant phytophagous insects on woody plants in Europe: legacy of the European crucible. *Biol. Invasions*.
- Mayr, E., 1963. *Animal species and evolution* Harvard University Press, Cambridge
- Mestrovic, N., Mravinac, B., Plohl, M., Ugarcovic, D., Bruvo-Madaric, B., 2006. Preliminary phylogeny of *Tribolium* beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) resolved by combined analysis of mitochondrial genes. *Eur. J. Entomol.* 103, 709-715.
- Mighell, A.J., Smith, N.R., Robinson, P.A., Markham, A.F., 2000. Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letters* 468, 109-114.
- Miller, D.R., 2006. Ethanol and (-)- α -pinene: Attractant kairomones for some large wood-boring beetles in southeastern USA. *J. Chem. Ecol.* 32, 779-794.
- Miller, D.R., Asaro, C., 2005. Ipsenol and Ipsdienol Attract *Monochamus titillator* (Coleoptera: Cerambycidae) and Associated Large Pine Woodborers in Southeastern United States. *Forest Entomol.* 98, 2033-2040.
- Miller, S.E., 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4775-4776.
- Mirov, N.T., 1967. *The genus Pinus*, New York, NY, USA
- Miura, K., Abe, T., Nakashima, Y., Urano, T., 2003. Field release of parasitoid *Dastarcus helophoroides* (Fairmaire) (Coleoptera: Bothrideridae) on pine logs infested with *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) and their dispersal. *J. Jpn. For. Soc.* 85, 12-17.
- Mizi, A., Zouros, E., Moschonas, N., Rodakis, G.C., 2005. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Mol. Biol. Evol.* 22, 952-967.
- Monaghan, M.T., Balke, M., Gregory, T.R., Vogler, A.P., 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, 1925-1933.
- Morewood, W.D., Simmons, K.E., Gries, R., Allison, J.D., Borden, J.H., 2003. Disruption by conophthorin of the kairomonal response of sawyer beetles to bark beetle pheromones. *J. Chem. Ecol.* 29, 2115-2129.
- Morimoto, K., Iwasaki, A., 1972. Role of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Aphelenchoididae) as vector of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *J. Jpn. For. Soc.* 54, 177-183.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.N., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 269-292.

- Mota, M.M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa, E., 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1, 727-734.
- Moum, T., Bakke, I., 2001. Mitochondrial control region structure and single site heteroplamy in the razorbill (*Alca torda*; Aves). *Curr. Genet.* 39, 198-203.
- Mourier, T., Hansen, A.J., Willerslev, E., Arctander, P., 2001. The human genome project reveals a continuous transfer of large mitochondrial fragments to the nucleus. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1833-1837.
- Nakayama, Y., Jikumaru, S., Togashi, K., 1998. Reproductive traits and diel activity of adult *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) at two different temperatures. *J. For. Res.* 3, 61-65.
- Naves, P., 2007. Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) and its role as vector of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda, Parasitaphelenchidae) in Portugal. *Doutoramento em Biologia (Biologia Populacional)*, Faculdade de Ciências.
- Naves, P.M., Kenis, M., Sousa, E.M., 2005. Parasitoids associated with *Monochamus galloprovincialis* (Oliv.) (Coleoptera: Cerambycidae) within the pine wilt nematode-affected zone in Portugal. *J. Pest Sci.* 78, 57-62.
- Naves, P.M., Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2006a. Feeding and oviposition preferences of *Monochamus galloprovincialis* for certain conifers under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 120, 99-104.
- Naves, P.M., Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2006b. Reproductive traits of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions. *Bull. Entomol. Res.* 96, 289-294.
- Nazari, V., Zakharov, E.V., Sperling, F.A.H., 2007. Phylogeny, historical biogeography, and taxonomic ranking of Parnassiinae (Lepidoptera, Papilionidae) based on morphology and seven genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 131-156.
- Nice, C.C., Shapiro, A.M., 1999. Molecular and morphological divergence in the butterfly genus *Lycaeides* (Lepidoptera: Lycaenidae) in North America: evidence of recent speciation. *J. Evol. Biol.* 12, 936-950.
- Nickle, W.R., 1970. A taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). *J. Nematol.* 2, 375-392.
- Niemelä, P., Mattson, W.J., 1996. Invasion of North American Forests by Phytophagous Insects. Legacy of the European crucible? *BioScience* 46, 741-753.
- Nollau, P., Wagener, C., 1997. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin. Chem.* 43, 1114-1128.
- Oliver, P., Hugall, A., Adams, M., Cooper, S.J.B., Hutchinson, M., 2007. Genetic elucidation of cryptic and ancient diversity in a group of Australian diplodactyline geckos: The *Diplodactylus vittatus* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 77-88.
- Pajares, J.A., Ibeas, F., Diez, J.J., Gallego, D., 2004. Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *J. Appl. Ent.* 128, 633-638.
- Park, J.-M., Manen, J.-F., Schneeweiss, G.M., 2007. Horizontal gene transfer of a plastid gene in the non-photosynthetic flowering plants *Orobanchae* and *Phelipanche* (Orobanchaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 974-985.
- Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J.K., Thomas, C.D., Descimon, H., Huntley, B., Kaila, L., Kulberg, J., Tammaru, T., Tennent, W.J., Thomas, J.A., Warren, M., 1999. Polewards shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature* 399, 579-583.

- Pereira, S.L., Baker, A.J., 2004. Low number of mitochondrial pseudogenes in the chicken (*Gallus gallus*) nuclear genome: implications for molecular inference of population history and phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 4, 1-8.
- Perna, N.T., Kocher, T.D., 1996. Mitochondrial DNA: Molecular fossils in the nucleus. *Curr. Biol.* 6, 128-129.
- Pershing, J.C., Linit, M.J., 1986. Development and seasonal occurrence of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) in Missouri. *Environ. Entomol.* 15, 251-253.
- Picard, F. (1929) Coléoptères Cerambycidae. In: *Faune de France* (ed. LeChevalier, P.), Paris.
- Piscart, C., Moreteau, J.-C., Beisel, J.-N., 2005. Decrease of fluctuating asymmetry among larval instars in an aquatic, holometabolous insect. *Comptes Rendus Biologies* 328, 912-917.
- Pizzo, A., Roggero, A., Palestini, C., Cervella, P., Del Pero, M., Rolando, A., 2006. Genetic and morphological differentiation patterns between sister species: the case of *Onthophagus taurus* and *Onthophagus illyricus* (Coleoptera, Scarabaeidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 89, 197-211.
- Pons, J., Vogler, A.P., 2005. Complex pattern of coalescence and fast evolution of a mitochondrial rRNA pseudogene in a recent radiation of tiger beetles. *Mol. Biol. Evol.* 22, 991-1000.
- Portevin, G. (1934) Tomme III. Polyphaga : Heteromera, Phytophaga. In: *Histoire naturelle des Coléoptères de France* (ed. LeChevalier, P.F.), Paris.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.
- Quek, S.-P., Davies, S.J., Itino, T., Pierce, N.E., 2004. Codiversification in a ant-plant mutualism: stem texture and the evolution of host use in *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicidae) inhabitants of *Macaranga* (Euphobiaceae). *Evolution* 58, 554-570.
- R Development Core Team (2006) *R* : a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rand, D.M., 2001. The units of selection on mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32, 415-448.
- Raposo do Amaral, F.S., Miller, M.J., Silveira, L.F., Bermingham, E., Wajntal, A., 2006. Polyphyly of the hawk genera *Leucopternis* and *Buteogallus* (Aves, Accipitridae): multiple habitat shifts during the Neotropical buteonine diversification. *BMC Evol. Biol.* 6.
- Rasband, W. ImageJ, NIH, USA.
- Rawson, P.D., Hilbish, T.J., 1995. Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Mol. Biol. Evol.* 12, 893-901.
- Rawson, P.D., Secor, C.L., Hilbish, T.J., 1996. The effects of natural hybridization on the regulation of doubly uniparental mtDNA inheritance in blue mussels (*Mytilus* spp.). *Genetics* 144, 241-248.
- Rees, D.J., Dioli, M., Kirkendall, L.R., 2003. Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African *Hyalomma* (Acari: Ixodidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 131-142.
- Rhymer, J.M., Simberloff, D., 1996. Extinction by Hybridization and Introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 83-109.
- Richardson, D.M., Rundel, P.W. (1998) Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. In: *Ecology and biogeography of Pinus* (ed. Richardson, D.M.), pp. 3-46, Cambridge, UK.
- Richly, E., Leister, D., 2004. NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1081-1084.

- Ritzerow, S., Konrad, H., Stauffer, C., 2004. Phylogeography of the Eurasian pine shoot beetle *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Eur. J. Entomol.* 101, 13-19.
- Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2007a. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 325-345.
- Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2007b. Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: an integrative approach. *Mol. Ecol.* 16, 3617-3633.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., Zouros, E., 2003a. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol. Evol.* 18, 411-417.
- Rokas, A., Melika, G., Abe, Y., Nieves-Aldrey, J.-L., Cook, J.M., Stone, G.N., 2003b. Lifecycle closure, lineage sorting, and hybridization revealed in a phylogenetic analysis of European oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) using mitochondrial sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 36-45.
- Roques, A., Auger-Rozenberg, M.-A., Boivin, S., 2006. A lack of native congeners may limit colonization of introduced conifers by indigenous insects in Europe. *Can. J. For. Res.* 36, 299-313.
- Roux-Morabito, G., Gillette, N.E., Roques, A., Dormont, L., Stein, J., Sperling, F.A.H., 2008. Systematics of the *Dioryctria abietella* species group (Lepidoptera: Pyralidae) based on mitochondrial DNA. 2008 in press.
- Roze, D., Rousset, F., Michalakis, Y., 2005. Germline bottlenecks, biparental inheritance and selection on mitochondrial variants. *Genetics* 170, 1385-1399.
- Rubinoff, D., 2006. DNA barcoding evolves into the familiar. *Biol. Cons.* 20, 1548-1549.
- Rubinoff, D., Sperling, F.A.H., 2004. Mitochondrial DNA sequence, morphology and ecology yield contrasting conservation implications for two threatened buckmoths (*Hemileuca*: Saturniidae). *Biol. Cons.* 118, 341-351.
- Ryss, A., Vieira, P., Mota, M., Kulinich, O., 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1973 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology* 7, 393-458.
- Saint-Germain, M., Drapeau, P., Hébert, C., 2004. Xylophagous insect species composition and patterns of substratum use on fire-killed black spruce in central Quebec. *Can. J. For. Res.* 34, 677-685.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O'Neil, P., Parker, E.M., Thompson, J.N., Weller, S.J., 2001. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32, 305-332.
- Sallé, A., Sauvard, D., Horn, A., Frérot, B., Malosse, C., Lieutier, F., 2006. Host preferences in *Tomicus piniperda* and *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae): influence of host monoterpene effluvia. *Eur. J. Entomol.*
- Sama, G., 2002. Atlas of the Cerambycidae of Europe and the Méditerrananean Area. *Vit Kabourek, Zlín*, 173pp.
- Sanmartin, I., Martin-Piera, F., 2003. First phylogenetic analysis of the subfamily Pachydeminae (Coleoptera, Scarabaeoidea, Melolonthidae): the Palearctic Pachydeminae. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 41, 2-46.
- Sato, A., Endo, H., Umetsu, K., Sone, H., Yanagisawa, Y., Saigusa, A., Aita, S., Kagawa, Y., 2004. Polymorphism, heteroplasmy, mitochondrial fusion and diabetes. *Biosci. Rep.* 23, 313-337.
- Savolainen, P., Arvestad, L., Lundeberg, J., 2000. mtDNA tandem repeats in domestic dogs and wolves: mutation mechanism studied by analysis of the sequence of imperfect repeats. *Mol. Biol. Evol.* 17, 474-488.

- Schelly, R., Salzburger, W., Koblmüller, S., Duftner, N., Sturmbauer, C., 2006. Phylogenetic relationships of the lamprologine cichlid genus *Lepidiolamprologus* (Teleostei: Perciformes) based on mitochondrial and nuclear sequences, suggesting introgressive hybridization. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 426-438.
- Schwartz, M., Vissing, J., 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 347, 576-580.
- Sekiguchi, K., Kasai, K., Levin, B.C., 2003. Inter- and intragenerational transmission of a human mitochondrial DNA heteroplasmy among 13 maternally-related individuals and differences between and within tissues in two family members. *Mitochondrion* 2, 401-414.
- Shigenobu, Y., Saitoh, K., Hayashizaki, K., Ida, H., 2005. Nonsynonymous site heteroplasmy in fish mitochondrial DNA. *Genes Genet. Syst.* 80, 297-301.
- Shihan, S., Lianqin, Z., Zhang, E., Murong, C., Liang, Y. (1995) Study on the control of pine wood nematode with releasing *Scleroderma guani*. Abstracts of International Symposium on Pine Wilt Disease Caused by the Pine Wood Nematode.
- Shimazu, M., Sato, H., Maehara, N. (1999) Microbial control of *Monochamus alternatus* using *Beauveria bassiana*. In: *Sustainability of pine forests in relation to pine wilt and decline* (eds. Futai, K., Togashi, K., Ikeda, T.), pp. 200-204, Tokyo, Japan.
- Shitara, H., Hayashi, J.I., Takahama, K., Kaneda, H., Yonekawa, H., 1998. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* 148, 851-857.
- Shitara, H., Kaneda, H., Sato, A., Inoue, K., Ogura, A., Yonekawa, H., Hayashi, J.I., 2000. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 156, 1277-1284.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Smith, M.A., Wood, D.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2007. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4967-4972.
- Smith, M.A., Woodley, N.E., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3657-3662.
- Smith, M.F., Thomas, W.K., L., P.J., 1992. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent. *Mol. Biol. Evol.* 9, 204-215.
- Solignac, M., Monnerot, M., Mounolou, J.C., 1983. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6942-6946.
- Sorenson, M.D., Fleischer, R.C., 1996. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15239-15243.
- Sorenson, M.D., Quinn, T.W., 1998. Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *The Auk* 115, 214-221.
- Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifacio, L., Mota, M.M., 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3, 89-91.

- Sousa, E., Naves, P., Bonifacio, L., Bravo, M.A., Penas, A.C., Pires, J., Serrao, M., 2002. Preliminary survey for insects associated with *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal. *Bull. OEPP* 32, 499-502.
- Sperling, F.A.H., Hickey, D.A., 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (Choristoneura: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.* 11, 656-665.
- Starzyk, J.R., Hilszczanski, J., 1997. Bionomics, ecology, and economic importance of *Monochamus sutor* (L.) (Coleoptera, Cerambycidae) in mountain stands of *Picea abies* (L.) Karst. *Zesz. Nauk. AR w Krakowie* 326, 121-145.
- Stauffer, C., Lakatos, F., Hewitt, G.M., 1999. Phylogeography and postglacial colonization routes of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Mol. Ecol.* 8, 763-773.
- Steiner, G., Buhner, E.M., 1934. *Aphelenhoides xylophilus*, n. sp. a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *J. Agric. Res.* 48, 949-951.
- Stoneking, M., 2000. Hyêrvariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1029-1032.
- Storer, A.J., Wood, D.L., Gordon, T.R., 1999. Modification of coevolved insect-plant interactions by an exotic plant pathogen. *Ecol. Entomol.* 24, 238-243.
- Sunnucks, P., Hales, D.F., 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Biol. Evol.* 13, 510-524.
- Swofford, D.L. (2000) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takami, Y., Suzuki, H., 2005. Morphological, genetic and behavioural analyses of a hybrid zone between the ground beetles *Carabus lewisianus* and *C. albrechti* (Coleoptera, Carabidae): asymmetrical introgression caused by movement of the zone? *Biol. J. Linn. Soc.* 86, 79-94.
- Takasu, F., Yamamoto, N., Kawasaki, K., Togashi, K., Kishi, Y., Shigesada, N., 2000. Modeling the expansion of an introduced tree disease. *Biol. Invasions* 2, 141-150.
- Tamura, K., Aotsuka, T., 1988. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochem. Genet.* 26, 815-819
- Teletchea, F., Maudet, C., Hanni, C., 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* 23, 359-366.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 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.
- Tkacz, B.M., 2002. Pest risks associated with importing wood to the United States. *Can. J. Plant Pathol.* 24, 111-116.
- Togashi, K., 1990a. Change in the activity of adult *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) in relation to age. *Appl. Entomol. Zool.* 25, 153-159.
- Togashi, K., 1990b. Effects of aerial application of Insecticides on the survival rate of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) within *Pinus densiflora* logs. *Appl. Entomol. Zool.* 25, 187-197.
- Togashi, K., 1990c. A field experiment on dispersal of newly emerged adults of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Res. Popul. Ecol.* 32, 1-13.
- Togashi, K., 1990d. Life table for *Monochamus alternatus* (Coleoptera, Cerambycidae) within dead trees of *Pinus thunbergii*. *Jpn. J. Ent.* 58, 217-230.
- Togashi, K., 1991a. Different developments of overwintered larvae of *Monochamus alternatus* (Coleoptera, Cerambycidae) under a constant temperature. *Jpn. J. Ent.* 59, 149-154.
- Togashi, K., 1991b. Larval diapause termination of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) under natural conditions. *Appl. Entomol. Zool.* 26, 381-386.

- Togashi, K., 1995. Interacting effects of temperature and photoperiod on diapause in larvae of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). Jpn. J. Ent. 63, 243-252.
- Togashi, K., 1997. Lifetime fecundity and body size of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) at a constant temperature. Jpn. J. Ent. 65, 458-470.
- Togashi, K., Akita, Y., Nakane, I., Shibata, Y., Nakai, I., 1997. Relatively larger eggs produced by smaller females of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 32, 264-266.
- Togashi, K., Appleby, J.E., Malek, R.B., 2005. Host tree effect on the pupal chamber size of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 40, 467-474.
- Togashi, K., Chung, Y.J., Shibata, E. (2004) Spread of an introduced tree pest organism - the pinewood nematode. In: *Ecological Issues in a Changing World. Status, Response and Strategy* (eds. Hong, S.K., Lee, J.A., Ihm, B.S., Farina, A., Son, Y., Kim, E.S., Choe, J.C.), pp. 173-188. Kluwer Academic Publishers.
- Togashi, K., Jikumar, S., Taketsune, A., Takahashi, F., 1994. Termination of larval diapause in *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) under natural conditions. J. Jpn. For. Soc. 76, 30-34.
- Togashi, K., Magira, H., 1981. Age-specific survival rate and fecundity of the adult Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera : Cerambycidae), at different emergence times Appl. Entomol. Zool. 16, 351-361.
- Tomminen, J., 1993. Development of *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) (Coleoptera, Cerambycidae) in cut trees of young pines (*Pinus sylvestris* L.) and log bolts in southern Finland. Entomol. Fennica 4, 137-142.
- Urano, T., 2004. Experimental release of a parasitoid, *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrideridae), on *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) infesting *Pinus densiflora* in the field. Bull. FFPRI 3, 205-211.
- Villiers, A. (1978) I. Cerambycidae. In: *Faune des Coléoptères de France* (ed. LeChevalier, P.), p. 611, Paris.
- Vincent, B., 2007. Relations entre les nématodes du genre *Bursaphelenchus*, l'insecte vecteur *Monochamus galloprovincialis* et leurs arbres hôtes Physiologie et Biologie des Organismes et des Populations, Université d'Orléans.
- Vives, E. (2000) Coleoptera Cerambycidae. In: *Fauna Iberica* (ed. Cientificas, M.N.d.C.N.C.S.d.I.), Madrid.
- Wahlberg, N., Oliveira, R., Scott, J.A., 2003. Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mt DNA variation and species delimitations. Syst. Entomol. 28, 257-273.
- Walsh, K., Linit, M., 1985. Oviposition biology of the pine sawyer, *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). Ann. Entomological Soc. Am. 78, 81-85.
- Walther, G.-R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J.-M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. Nature 416, 389-395.
- Wang, Q., Ito, M., Adams, K., Li, B.U.K., Klopstock, T., Maslim, A., Higashimoto, T., Herzog, J., Boles, R.G., 2004. Mitochondrial DNA control region sequence variation in migraine headache and cyclic vomiting syndrome. Am. J. Med. Gen. 131, 50-58.
- Wang, X., 1988. Use of *Ontsira palliatus* (Hym.: Braconidae) to control pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Col.: Cerambycidae). Chin. J. Biol. Control 4, 18-20.
- Webster, J.M., Anderson, R.V., Baillie, D.L., Beckenbach, K., Curran, J., Rutherford, T.A., 1990. DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. Rev. Nematol. 13, 255-263.

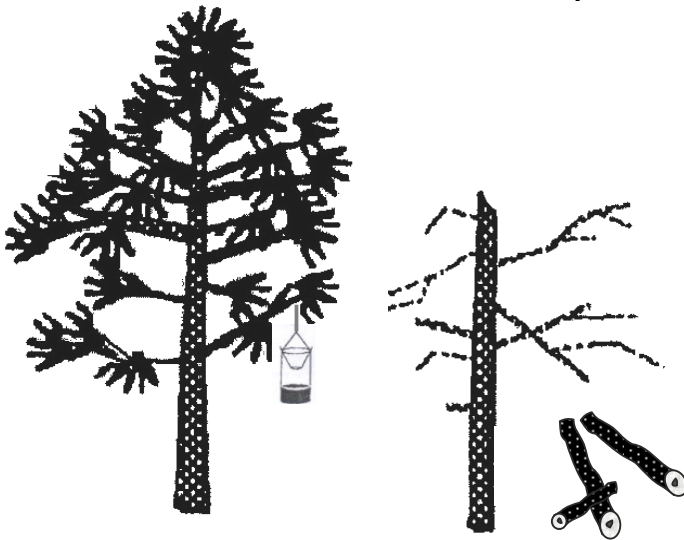
- Wilkinson, G.S., Chapman, A.M., 1991. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics* 128, 607-617.
- Wilkinson, G.S., Mayer, F., Ked, G., Petri, B., 1997. Evolution of repeated sequence arrays in the D-loop region of bat mitochondrial DNA. *Genetics* 146, 1035-1048.
- Wingfield, M., Blanchette, R., 1983. The pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Minnesota and Wisconsin: insect associates and transmission studies. *Can. J. For. Res.* 13, 1068-1076.
- Woischnik, M., Moraes, C.T., 2002. Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Res.* 12, 885-893.
- Wu, J., Smith, R.K., Freeman, A.E., Beitz, D.C., McDaniel, B.T., Lindberg, G.L., 2000. Sequence heteroplasmy of D-loop and rRNA coding regions in mitochondrial DNA from holstein cows of independent maternal lineages. *Biochem. Genet.* 38, 323-335.
- Xu, X., Arnason, U., 1997. The complete mitochondrial DNA sequence of the white rhinoceros, *Ceratotherium simum*, and comparison with the mtDNA sequence of the Indian rhinoceros, *rhinoceros unicornis*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7, 189-194.
- Zhang, D.X., Hewitt, G.M., 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* 11, 247-251.
- Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C., Freeman, K.R., 1994. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7463-7467.

ANNEXES :

Annexe I : Campagne de piégeage et échantillonnage

I.I Quel site choisir et comment installer les pièges ?

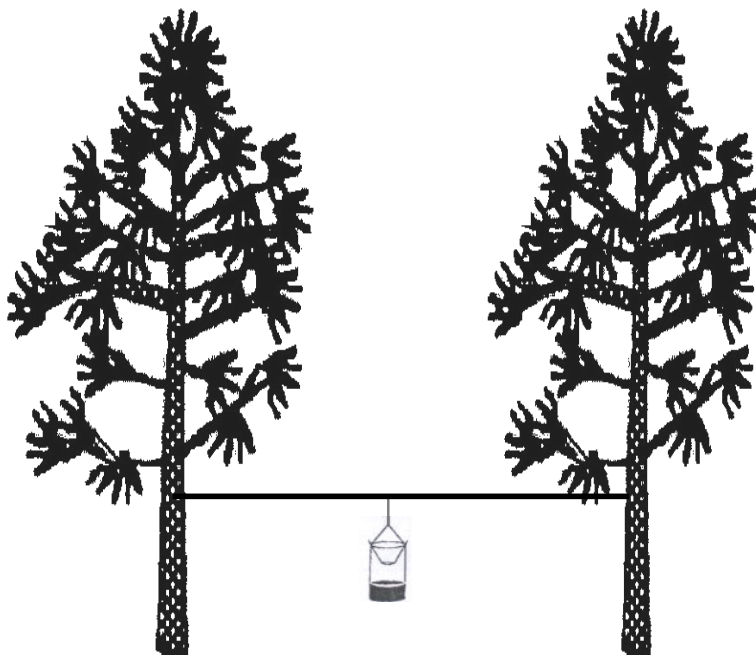
Différentes possibilités :



Peuplement pas trop entretenu, ni trop dense, ouvert, arbre-piège bien exposé.

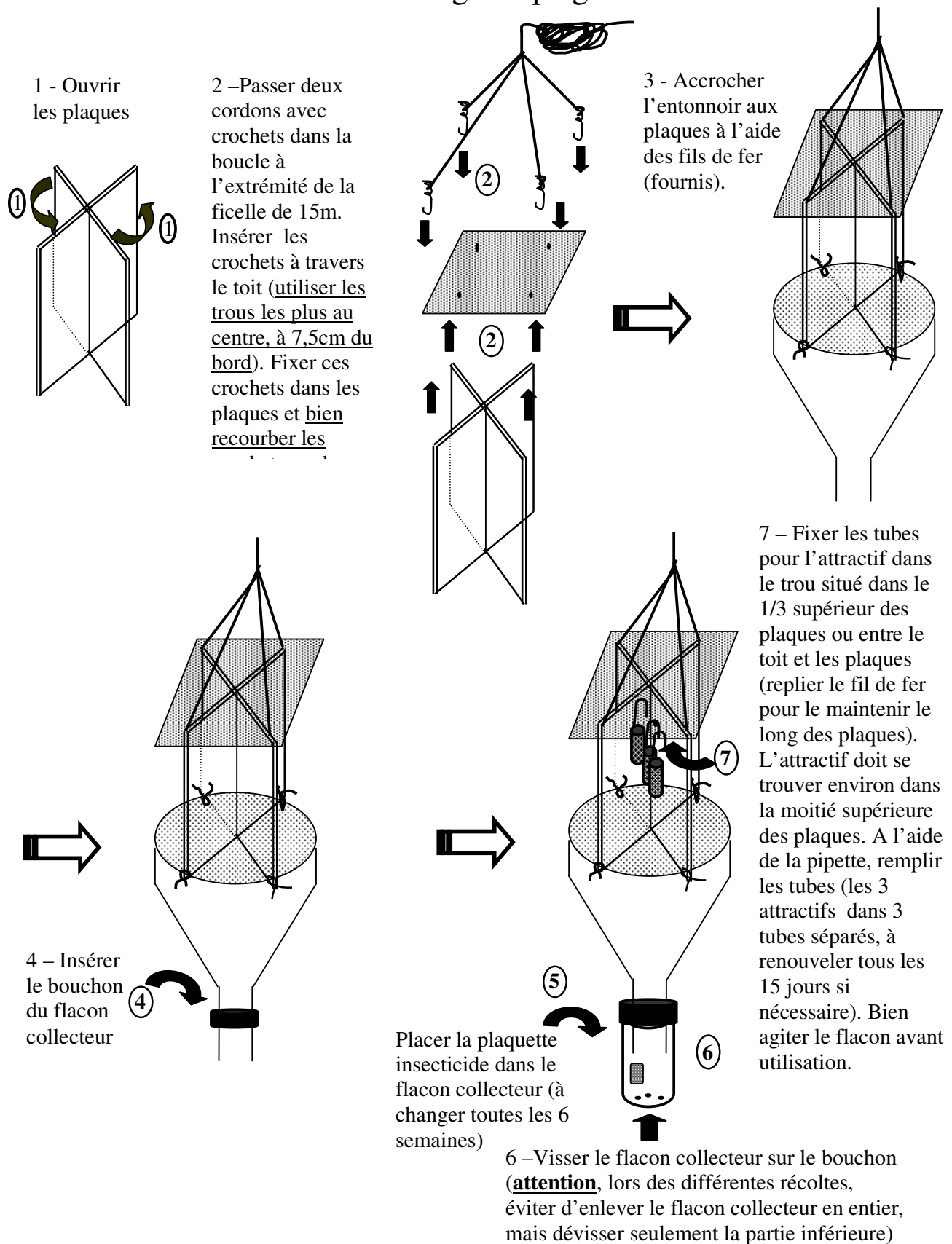
Présence de chablis ou d'arbres affaiblis, dépérissants ou tombés au sol, à proximité ou dans le peuplement.

Possibilité d'installer le piège à proximité (quelques mètres) de coupes de pins récemment réalisées (2 à 3 mois) et non traitées.



Installation du piège dans le houppier ou encore à hauteur d'homme, sur des pins. Possibilité d'accrocher le piège sur une corde tendue entre 2 arbres, à hauteur d'homme.

I.II Montage du piège :



I.III Fiche d'observation :
(à compléter et à nous retourner avec le 1^{er} envoi)

Région DSF :
 NOM du Correspondant DSF :
 Adresse :
 Téléphone : Fax :
 Adresse e-mail :

Localisation du peuplement :

Commune :
 Nom de la Forêt ou du propriétaire :
 N° de Parcelle :
 Lieu-Dit :

Description du peuplement :

Altitude :
 Essence majoritaire :
 Age du peuplement :
 Remarques (présence d'arbres affaiblis, morts, chablis...) :

Localisation des pièges :

	Type d'installation (sur une branche ou entre 2 arbres)	Hauteur du piège	Exposition
Piège 1 :			
Piège 2 :			
Piège 3 :			
Piège 4 :			

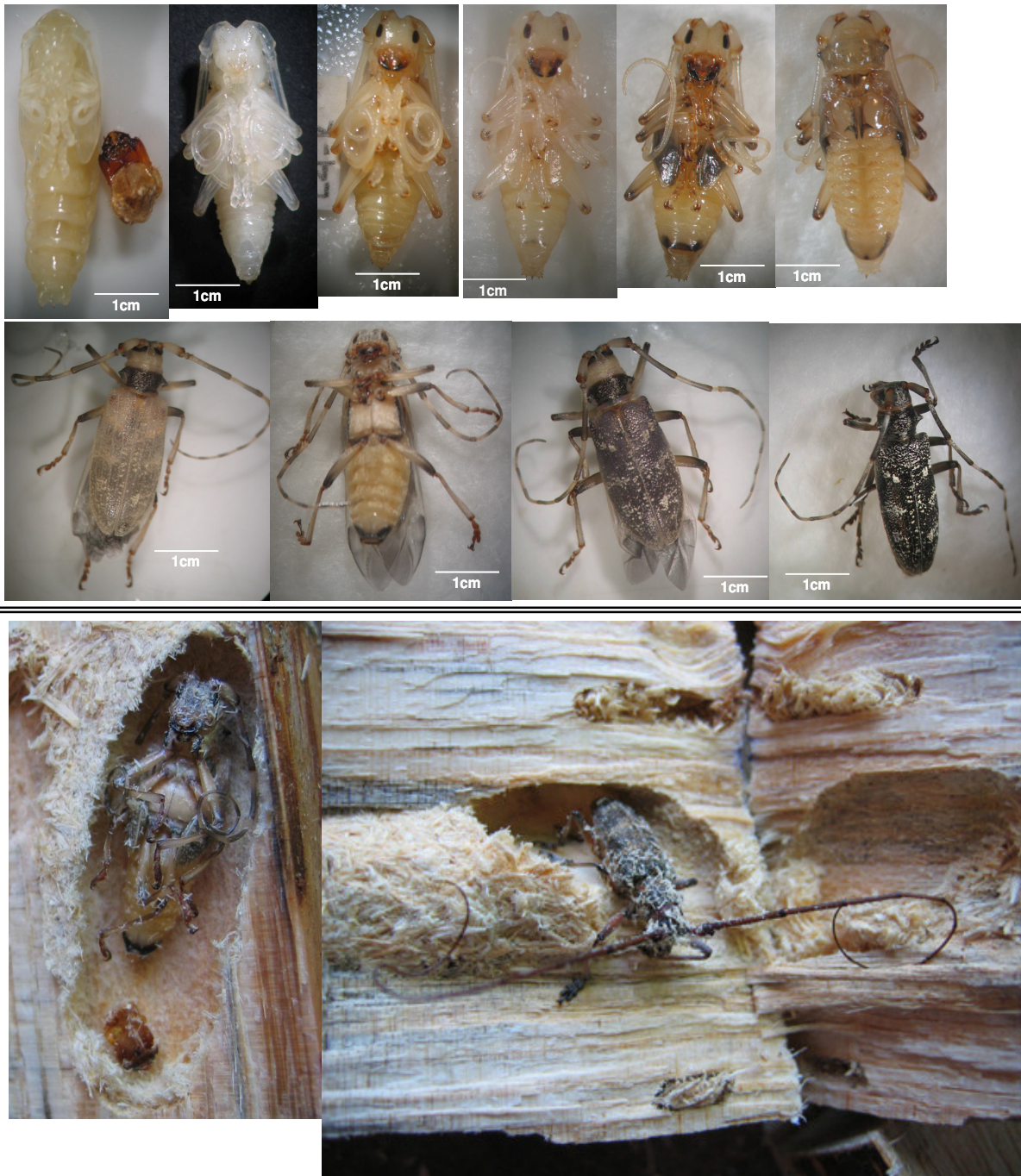
L.IV Tableau contenant les caractéristiques des sites où les pièges pour les captures de *Monochamus* (2003 - 2004 ont été posés).

Code/ carte	Commune		Nb individus	Coordonnées parcelle		Altitude	Age	Températures moyennes été	Précipitations totales été	Etat sanitaire du peuplement	Essence hôte	Nb de pièges	Hauteur piège
				Latitude	Longitude								
Cau	Ansaunaud	St-Jean-de-Bruel	2	43.5810	3.1538	850	60	20°C	150mm	mauvais	<i>P.nigra</i>	4	2
3	Quereilhac	Vendays-Montalivet		45.1924	-1.0911	14	40	20°C	100mm	moyen	<i>P.pinaster</i>	3	2
Far	Delpont	Houeillès	5	44.1134	0.1134	121	16	20°C	100mm	moyen	<i>P.pinaster</i>	3	2
1	Fedou	St-Girons		42.5742	1.1955	800	40	18°C	50mm	mauvais	Autres	3	2
Hou	Coste	Hourtin	1	45.1200	-1.0400						<i>P.pinaster</i>		
2	Gourgues	Maillas		44.1038	-0.095	143	10	20°C	100mm	moyen	<i>P.pinaster</i>	3	2
Her	Hautlock	Herm	4	43.5155	-1.1444	42	12	20°C	150mm	sain	<i>P.pinaster</i>	3	2
Pis	Ninosque	Pissos	5	44.1846	-0.4618	68	30	20°C	150mm	mauvais	<i>P.pinaster</i>	3	2,5
Sar/L	Van Meer	Sare	4/2	43.2035	-1.3625	200	50	20°C	200mm	mauvais	<i>P.laricio</i>	3/3	
4	Bavouzet	Lapleau		45.1958	2.0836								
5	Morzieres	Menet		45.1910	2.3404								
Gav	Belloir	Le Gavre	1	46.3937	-0.4412	90	40	18°C	100mm	mauvais	Autres	3	4,5
Pig	Germain	Arbonne la Forêt	1	48.2532	2.3011	70	40	18°C	150mm	mauvais	<i>P.sylv./P.pinas.</i>	3	4,5
Ram	Jarsaillon	Rambouillet	1	48.3800	1.4900						<i>P.sylvestris</i>		
10	Blot	Damigni		48.3222	0.0033								
11	Levannier	Canteleu		49.2348	0.5954	105	60	16°C	200mm	mauvais	<i>P.sylvestris</i>	3	3
12	Dupuy	Les Bordes		47.0045	1.5835								
13	Henry	St Alban Hurtières											
Com	Mure	Compiègne	1	49.2207	2.5441	50	100	18°C	200mm	mauvais	<i>P.sylvestris</i>	3	3
Ole	Pelloquin	Oléron	6	45.5851	-1.1906	10	33	20°C	100mm	mauvais	<i>P.pinaster</i>	3	4,5
Lor	auteurs	Lorris	1	47.5353	2.3041	129	35	18°C	150mm	sain	<i>P.sylvestris</i>	9	4
6	DeFalvard	Orcival		45.4041	2.5043	1195	110	18°C	150mm	mauvais	Autres	3	2,5
Sag	Huttinger	Savigny les Beaune	1	47.0348	4.4949	406	40	18°C	250mm	moyen	<i>P.nigra</i>	4	4,5
7	Malot	Michery		48.1840	3.1541	160	50	18°C	200mm	sain	Autres	3	2,5
8	Hamelin	Vernet les Bains		42.3637	2.2458								
9	Cantal	Varzy		47.1930	3.2440								
15	Adam	Muhlbach		48.0138	7.0408	580	40	18°C	100mm	moyen	<i>P.sylvestris</i>	6	2
Hag	Dorfer	Haguenau		48.4949	7.4701	120	70	18°C	200mm	moyen	<i>P.sylvestris</i>	3	5
14	Durand	Cleebourg		49.0116	7.5353	470	50	18°C	100mm	moyen	<i>P.sylvestris</i>	3	5
17	Grandjean	Ainvelle		47.5112	6.1512	293	130	18°C	150mm	sain	<i>P.sylvestris</i>	3	2,5
16	Letz	Raon-l'Etape		48.2447	6.5058	400	120	16°C	300mm	moyen	<i>P.sylvestris</i>	3	8
Stu	Schmuck	Sturzelbronn	1	49.0329	7.3500	304	50	20°C	250mm	sain	<i>P.sylvestris</i>	3	2,5
18	Pagnier	Levier		46.5903	6.0847								
19	De Yparraguir	Revel		45.1132	5.5613	1400	80	20°C	100mm	moyen	Epicéas	4	5
Sor	Fee	Rosans	1	44.3348	6.0647	1000	40	20°C	100mm	moyen	<i>P.nigra</i>	4	3
Cor	Girard	St Jean de Cornies	37	43.4431	4.0054	77	50	22°C	50mm	mauvais	<i>P.halepensis</i>	4	
20	Csakvry	Montbrison		45.5040	4.0625								
Mey	Hintzy	Meyrargues	26	43.2833	5.3852	321	50	22°C	0mm	moyen	<i>P.halepensis</i>	4	6
Adr	Micas	St André les Alpes	1	43.5905	6.3053	1500	100	20°C	50mm	sain	<i>P.sylvestris</i>	3	2
LG	Rullière	Le Vigan	5	44.0159	3.3455	410	40	22°C	150mm	moyen	<i>P.nigra</i>	4	4

I.V Tableau récapitulatif des captures de *Monochamus* par piège multidirectionnel attractif et chasse à vue entre mai et septembre 2003, sur le territoire français.

Massif forestier	Essence-hôte	Espèce	Date de piégeage	Mode de capture
Haguenau (67) NE	Pin sylvestre	<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	07.07.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
		<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	21.07.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
Les 3 Pignons (77) NO	Pin maritime	<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	27.08.03	Piège multidirectionnel attractif (4)
Lorris (45) NO	Pin sylvestre	<i>M. galloprovincialis</i>	03.08.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
		<i>M. galloprovincialis</i> (2 femelles et 2 mâles)	09.07.03	Sur tronc (G. Roux)
		<i>M. galloprovincialis</i> (1 femelle et 3 mâles)	11.07.03	Sur tronc (G. Roux)
Rambouillet (78) NO	Pin sylvestre	<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	16.07.03	Piège multidirectionnel attractif (3)
Saumenards (17) NO	Pin maritime	<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	16.07.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
		<i>M. galloprovincialis</i> (mâle)	13.08.03	Piège multidirectionnel attractif (2)
Digne (04) SE	grumes	<i>M. galloprovincialis</i>	15.08.03	Chasse à vue (L. Micas)
		(1 femelle) et 1 mâle <i>M. sutor</i>		
Hautes Alpes (05) SE	grumes	<i>M. sutor</i> (mâle)	25.06.03	Chasse à vue (L. Micas)
Meyrargue (13) SE	Pin d'Alep	<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	01.09.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
		<i>M. galloprovincialis</i> (mâle)	01.09.03	Piège multidirectionnel attractif (2)
		<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	01.07.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
		<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	01.07.03	Piège multidirectionnel attractif (4)
		<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	08.08.03	Piège multidirectionnel attractif (3)
		<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	08.08.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
		<i>M. galloprovincialis</i> (mâle)	11.07.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
		<i>M. galloprovincialis</i> (mâle)	28.07.03	Piège multidirectionnel attractif (4)
		<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	28.07.03	Piège multidirectionnel attractif (4)
Puechagut-le-Vigan (30) SE	Pin noir	<i>M. sutor</i> (mâle)	13.06.03	Piège multidirectionnel attractif (3)
		<i>M. galloprovincialis</i> (mâle)	25.07.03	Piège multidirectionnel attractif (1)
Seyne (04) SE (1600m)	Pins	<i>M. galloprovincialis</i> (1 fem)	23.07.03	Chasse à vue (D. Rougon)
		15 <i>M. sutor</i>	23.07.03	Chasse à vue (D. Rougon)
St Jean de Cornies (34) SE	Pin d'alep	<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	07.08.03	Piège multidirectionnel attractif (2)
		<i>M. galloprovincialis</i> (mâle)	10.07.03	Piège multidirectionnel attractif (4)
		<i>M. galloprovincialis</i> (mâle)	21.08.03	Piège multidirectionnel attractif (4)
		<i>M. galloprovincialis</i> (fem)	24.07.03	Piège multidirectionnel attractif (4)
La Illas (66) SE	Pin noir	<i>M. galloprovincialis</i> (mâle)	15.06.03	Chasse à vue (H. Brustel)

Annexe II : Stades de pigmentation de *M. galloprovincialis*



II.I Différents stades de sclérotinisation de la nymphe jusqu'à l'émergence de l'adulte *M. galloprovincialis*. (Photos de l'auteur).

Annexe III : Clés d'identification d'après Picard (1929) :

- 1-(4). Pattes et antennes noires ; écusson couvert de pubescence grise.
- 2-(3). Elytres déprimés transversalement vers le tiers basal ; écusson sans ligne dénudée au milieu ; noir ou noir brun un peu bronzé, à pubescence jaunâtre. 26 à 32 mm. Montagnes de la France orientale, des Vosges aux Alpes-Maritimes, Var, Doubs. Larves dans les divers Conifères.....*sartor* Fabricius.
- 3-(2). Elytres sans dépression transverse au premier tiers ; écusson avec une ligne médiane dénudée ; macules jaunâtres des élytres formant trois vagues fascies. 18 à 25 mm. Pyrénées, Alpes, Jura, Vosges ; Côte-d'Or. Conifères..... *sutor* Linnaeus.
- 4-(1). Pattes et antennes rougeâtres ; élytres sans dépression transversale en avant ; élytres brun bronzé ; pubescence de l'avant-corps et de l'écusson rousse, ce dernier à ligne médiane lisse en avant seulement ; élytres à macules rousses et deux vagues fascies blanchâtres sur la moitié postérieure. 18 à 25 mm. Toute la France méridionale, mais se répand avec les plantations de pins ; signalé de l'Oise, Châlons-sur-Marne (H. Portevin) ; Corse. Conifères.....*galloprovincialis* Olivier.

Monochamus galloprovincialis (Olivier)

Variations (d'après Villiers 1978) :

I. Antennes et pattes rougeâtres.

- a. Les mouchetures élytrales en majeure partie grisâtres, les antennes brun-rouge *galloprovincialis*, f. t.
- b. Toute la pubescence, y compris celle des élytres ochracée var. *subrufopubens* Pic
- c. Mouchetures élytrales blanchâtres, denses, formant des bandes assez nettes var. *parendeli* Théry
- d. Comme a., les pattes et les antennes rouges (non brun-rouge) var. *breuningi* Podany

II. Antennes et pattes en majeure partie noires.

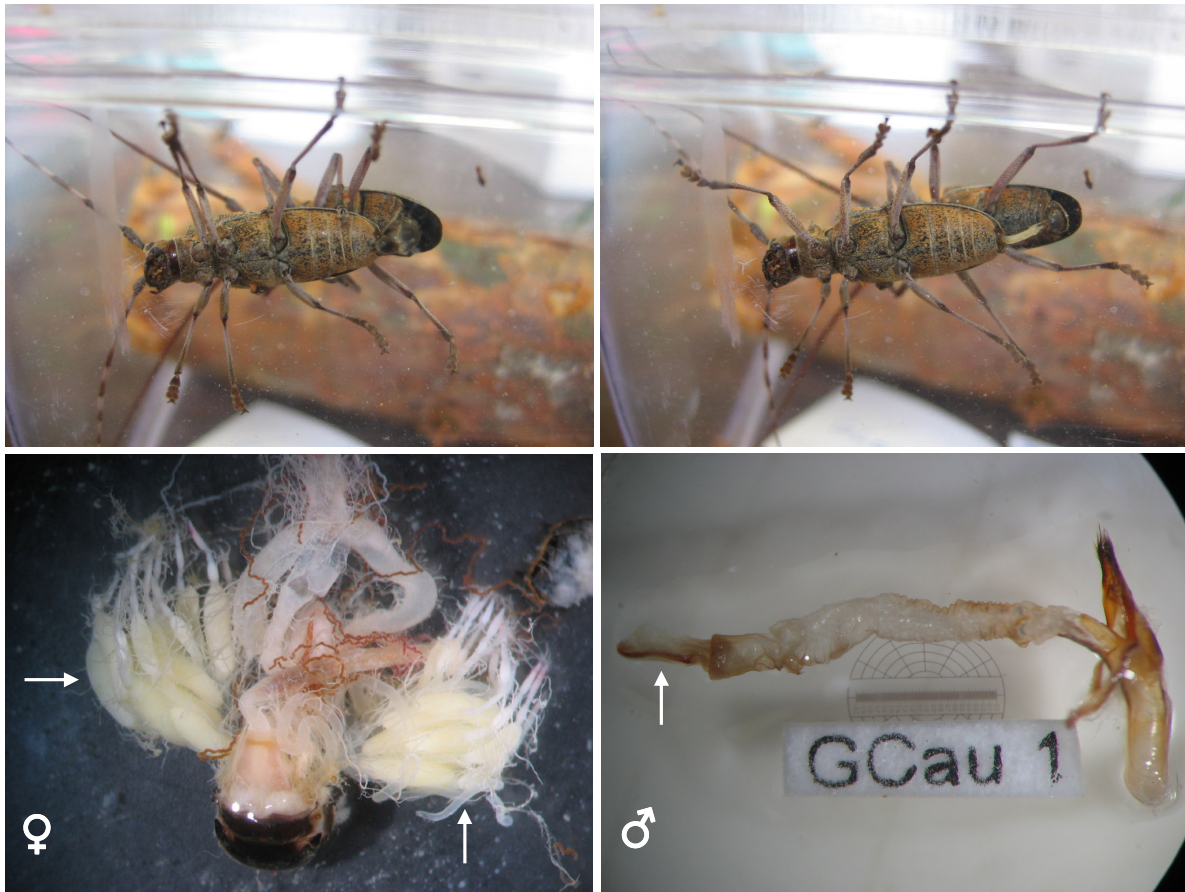
- a. Allongé, de petite taille, mouchetures élytrales rares et ochracées morpha *pistor* Germar

Monochamus sutor (Linnaeus)

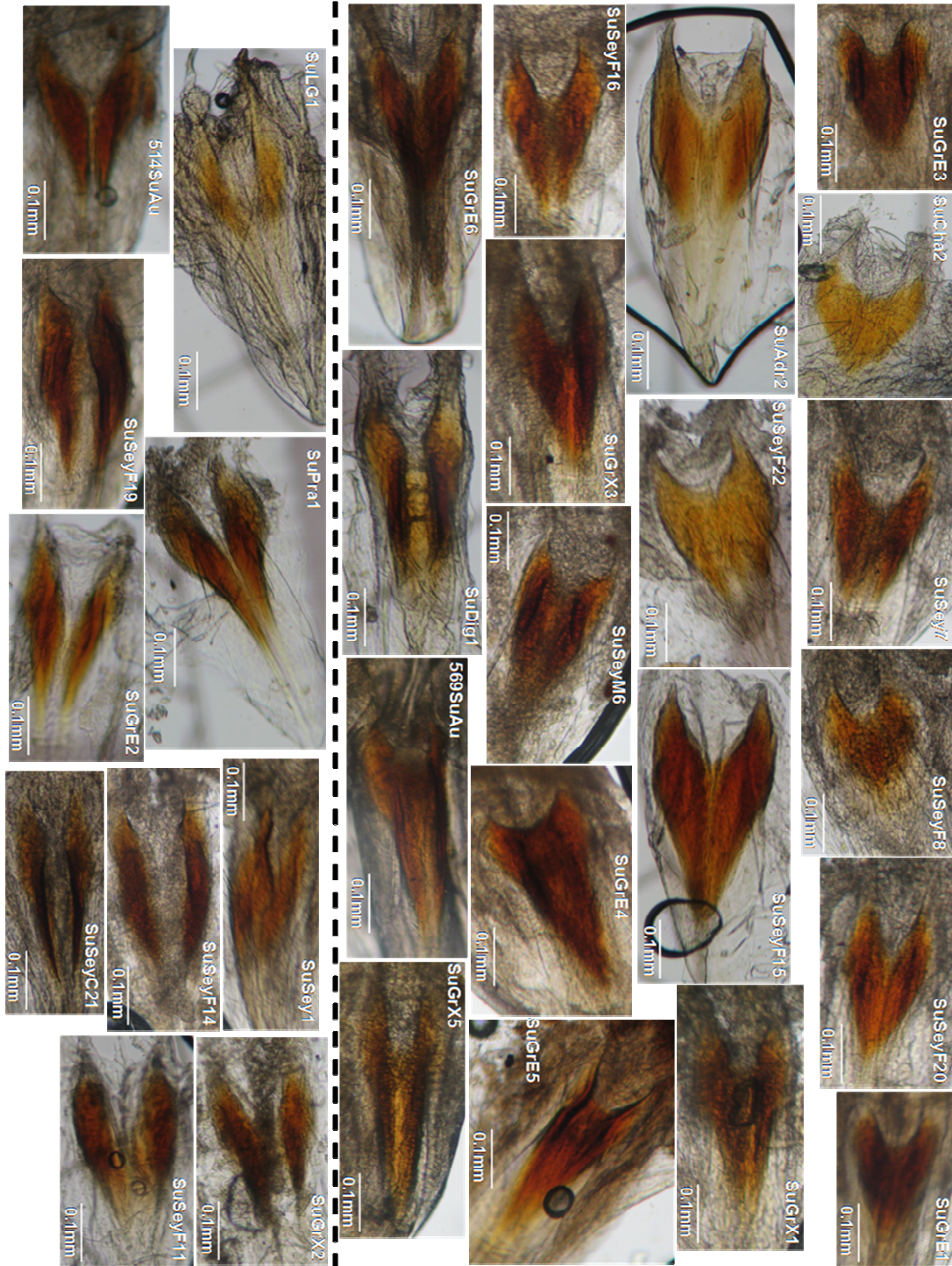
Variations (d'après Villiers 1978) :

- a. Pubescence très épars, presque indistincte sur le pronotum ; élytres mouchetés de blanchâtre ou jaunâtre *sutor*, f. t.
- b. Pubescence plus dense, distincte sur le pronotum ; mouchetures élytrales nombreuses, formant des bandes plus ou moins distinctes..... var. *maculosus* Voet
- c. Surface uniformément noire, sans pubescence ni mouchetures var. *pellio* Germar
- d. Comme c., mais plus allongé et plus luisant var. *longulus* Pic

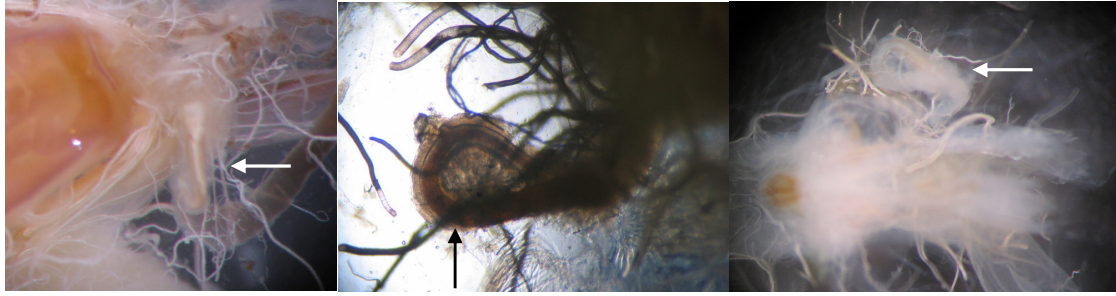
Annexe IV : Accouplement et Système reproducteur de *M. galloprovincialis*



IV.I Accouplement de *M. galloprovincialis* et génitalias mâles (en bas à droite) et femelles (en bas à gauche). Avec des flèches sont indiqués les ovaires de la femelle et la pièce copulatrice pour le mâle. (Photos de l'auteur)



IV.III Variabilité de la pièce copulatrice de l'espèce *M. sutor*. A droite caractère avec le code (1) et à gauche avec le code (0) (voir article de variabilité morphologique et génétique). (Photos prises sous le microscope par l'auteur)



IV.IV Spermathèque de *M. galloprovincialis* indiquée avec des flèches.