

# VALIDATION D'UN OUTIL MOLÉCULAIRE NOVATEUR POUR L'IDENTIFICATION DES LÉPIDOPTÈRES RAVAGEURS DES CULTURES

## Rapport final

### Rapport présenté au :

Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de  
l'Alimentation du Québec.  
Programme de soutien à l'innovation  
agroalimentaire (PSIA)

Projet PSIA no : 810233

Responsable scientifique  
Daniel Cormier, *Ph.D.*

Décembre 2013

### Organisme requérant :

 Institut de recherche  
et de développement  
en agroenvironnement

### Organismes partenaires :

**Ministère  
de l'Agriculture,  
des Pêcheries  
et de l'Alimentation**  
  
**Québec**

 Agriculture et  
Agroalimentaire Canada      Agriculture and  
Agri-Food Canada

### **Chercheurs engagés dans le projet :**

**Gérald Chouinard**, *Ph.D.*, chercheur à l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA).

**Daniel Cormier**, *Ph.D.*, chercheur à l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA).

**Richard Hogue**, *Ph.D.*, chercheur à l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement et responsable du laboratoire d'Écologie Microbienne (IRDA).

**Jean-François Landry**, *Ph.D.*, chercheur et conservateur des Lépidoptères, Collection nationale canadienne d'insectes, arachnides et nématodes, Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC).

### **Support technique et scientifique :**

**Annabelle Firlej**, *Ph.D.*, professionnelle de recherche en entomologie à l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA).

**Franz Vanoosthuysse**, *M.Sc.*, attaché de recherche en entomologie à l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA).

**Mario Fréchette**, *B.Sc.*, technicien au laboratoire de diagnostic du Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ).

**Thomas Jeanne**, *B.Sc.*, attaché de recherche au laboratoire d'Écologie Microbienne de l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA).

**Jean-Philippe Légaré**, *M.Sc.*, biologiste au laboratoire de diagnostic du Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ).

### **Responsable de l'établissement :**

**Stéphane Lemay**, *Ph.D.*, directeur scientifique à l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA).

### **Le rapport peut être cité comme suit :**

Cormier, D., A. Firlej, R. Hogue, J.-P. Légaré, J.-F. Landry, G. Chouinard, M. Fréchette, T. Jeanne et F. Vanoosthuysse. 2013. Validation d'un outil moléculaire novateur pour l'identification des lépidoptères ravageurs des cultures. Rapport final. IRDA. 50 pages.

## **FICHE DE TRANSFERT**

### **VALIDATION D'UN OUTIL MOLÉCULAIRE NOVATEUR POUR L'IDENTIFICATION DES LÉPIDOPTÈRES RAVAGEURS DES CULTURES**

Auteurs : Daniel Cormier, Annabelle Firlej, Richard Hogue, Jean-Philippe Légaré, Jean-François Landry, Gérald Chouinard, Mario Fréchette, Thomas Jeanne et Franz Vanoosthuyse.

Durée 05/2011-11/2013

#### **Faits saillants**

La technique d'identification par codage à barres ADN permet l'identification taxonomique des adultes et des larves de lépidoptères ravageurs des cultures au Québec. Sa mise en application immédiate est possible mais nécessite cependant certaines précautions car la conservation des spécimens et l'extraction ADN sont les étapes les plus critiques de cette méthode. Les résultats montrent que la fraîcheur des papillons et leur analyse rapide sont à privilégier. L'utilisation de pilons de plastique pour le broyage des tissus et de tubes mini-colonne avec membrane de silice augmentent grandement l'efficacité d'extraction de l'ADN. Une fois l'ADN extrait, la réussite de l'identification taxonomique peut se faire grâce aux amorces LEP-F1 et LEP-R1 (648 pb) ou LEP-F1 et LEP-R350 (350 pb).

#### **Objectif(s) et aperçu de la méthodologie**

Les objectifs de ce projet étaient de développer une technique d'identification par codage à barres des papillons ravageurs des cultures pour le laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ. Le premier objectif visait à obtenir les séquences génétiques de référence à partir d'adultes de papillons capturés dans plusieurs cultures et dans plusieurs régions du Québec. Le deuxième objectif consistait à adapter la méthode d'identification par codage à barres aux stades larvaires d'un ravageur d'importance. Le troisième objectif visait à valider la technique développée par codage à barres sur des larves de ravageurs dans différentes cultures durant les deux ans du projet.

#### **Résultats significatifs pour l'industrie ou la discipline**

##### **Établissement des spécimens de référence**

Sur 328 spécimens adultes de papillons capturés, 60% ont pu être correctement analysés par codage à barres ADN avec les amorces LEP-F1 et LEP-R1 (648 pb). Les résultats ont montrés que la conservation prolongée des spécimens adultes en collection avant l'extraction et l'utilisation de plaque AcroPrep™ de 96 puits diminuaient grandement les réussites d'extraction. Cependant l'utilisation d'amorces plus courtes LEP-F1 et LEP-R350 (350 pb) permettaient tout de même d'obtenir une identification taxonomique dans presque 100% des cas selon les espèces ciblées qui n'avaient pas obtenus de résultats positifs avec les amorces LEP-F1 et LEP-R1.

### **Adaptation méthodologique aux larves**

Les résultats ont montré que le broyage des tissus avec des pilons de plastique associé à l'utilisation de tubes mini-colonne augmente la réussite de l'extraction de 20% comparativement à l'utilisation de plaque AcroPrep™ de 96 puits. Également, la quantité optimale de tissus larvaire à utiliser pour l'extraction est de 2 à 4 mm<sup>3</sup>.

### **Validation de la technique**

Sur 295 larves récoltées, l'utilisation du protocole de codage à barres ADN a permis une réussite d'identification taxonomique de 96% pour les spécimens dont l'ADN a été extrait avec succès. L'extraction de l'ADN est également une étape critique pour les spécimens larvaires.

### **Applications possibles pour l'industrie et/ou suivi à donner**

La technique d'identification par codage à barres ADN développée dans ce projet pourra répondre dès maintenant aux demandes d'identification envoyées au laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ par les agronomes et conseillers des cultures au Québec. Plusieurs étapes critiques du protocole ont pu être identifiées et des recommandations ont été énoncées pour obtenir un gain maximal d'efficacité lors du processus d'analyse des échantillons.

### **Point de contact pour information :**

Daniel Cormier

Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA)

335, rang des Vingt-cinq Est,

Saint-Bruno-de-Montarville (Québec) J3V 0G7

Téléphone : 450 653-7368, poste 360;

Télécopie: 450 653-1927

Courriel : [daniel.cormier@irda.qc.ca](mailto:daniel.cormier@irda.qc.ca)

### **Remerciements aux partenaires financiers**

Ce projet de recherche a été réalisé grâce à la contribution financière du MAPAQ par le biais du Programme de soutien à l'innovation agroalimentaire (PSIA).

## ACTIVITÉS DE TRANSFERT AUX UTILISATEURS

-Légaré, Jean-Philippe. **2013**. Identification des principaux lépidoptères ravageurs du maïs sucré. Rencontre du groupe RAP Maïs sucré. (Annexe 2)

### A venir :

-Firlej, Annabelle, Jean-Philippe Légaré, Jean-François Landry, Richard Hogue, Gérald Chouinard et Daniel Cormier. **2014**. Le codage à barres, une méthode pour l'identification moléculaire des lépidoptères internes ravageurs de la pomme. Journées annuelles sur la recherche et l'innovation technologique. 11 et 12 février 2014.

-Firlej, Annabelle, Richard Hogue et Daniel Cormier. **2014**. Protocole pour l'identification moléculaire des lépidoptères par codage à barres. Présentation de transfert au laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ. Février 2014.

## ACTIVITÉS DE DIFFUSION SCIENTIFIQUE

### Présentations sous forme d'affiche :

-Firlej, Annabelle, Mario Fréchette, Michèle Roy, Jean-François Landry, Richard Hogue, Gérald Chouinard et Daniel Cormier. **2011**. Le codage à barres ADN : un outil novateur pour l'identification des lépidoptères ravageurs des cultures. Congrès annuelle de la Société d'entomologie du Québec, Orford (Canada). (Annexe 2)

-Firlej, Annabelle, Jean-Philippe Légaré, Jean-François Landry, Richard Hogue, Gérald Chouinard and Daniel Cormier. **2012**. DNA Barcoding: an Innovative Tool to Identify Internal Lepidopteran in Apples. VIII International Conference on Integrated Fruit Production, Kusadasi (Turquie). (Annexe 2)

-Firlej, Annabelle, Jean-Philippe Légaré, Jean-François Landry, Richard Hogue, Gérald Chouinard and Daniel Cormier. **2013**. DNA Barcoding: an Innovative Tool to Identify Internal Lepidopteran in Apples. Global Conference on Entomology, Kuching, Sarawak (Malaisie). (Annexe 2)

### Article scientifique:

-Firlej, Annabelle, Jean-Philippe Légaré, Jean-François Landry, Richard Hogue, Gérald Chouinard and Daniel Cormier. **2013**. DNA Barcoding: an Innovative Tool to Identify Internal Lepidopteran in Apples. Integrated protection of fruit crops IOBC-WPRS Bulletin Vol. 91: 269-271. (Annexe 2)

## Table des matières

<b>1. Problématique et objectifs</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Problématique</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Objectifs de recherche</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Description des espèces du projet</b>	<b>12</b>
1.3.1. La légionnaire uniponctué, <i>Mythimna unipuncta</i> (Haworth)	12
1.3.2. Le ver-gris noir, <i>Agrotis ipsilon</i> (Hufnagel)	13
1.3.3. Le ver de l'épi du maïs, <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)	13
1.3.4. La légionnaire d'automne, <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith)	14
1.3.5. Le ver-gris panaché, <i>Peridroma saucia</i> (Hübner)	14
1.3.6. Le carpocapse de la pomme, <i>Cydia pomonella</i> (L.)	15
1.3.7. Le petit carpocapse de la pomme, <i>Grapholita prunivora</i> (Walsh)	15
1.3.8. La tordeuse orientale du pêcher, <i>Grapholita molesta</i> (Busck)	16
1.3.9. Période d'observation des larves au Québec	16
<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Établissement des spécimens adultes de référence</b>	<b>17</b>
2.1.1. Collecte et identification des spécimens adultes	17
2.1.2. Protocole d'obtention des séquences génétiques des spécimens adultes	18
2.1.2.1. Protocole d'extraction ADN	19
2.1.2.2. Protocole d'amplification	19
<b>2.2. Adaptation méthodologique aux stades larvaires</b>	<b>20</b>
2.2.1. Élevages des spécimens	20
2.2.2. Plaques versus mini-colonnes	21
2.2.3. Quantité de tissus à utiliser	22
<b>2.3. Validation du codage à barres sur les larves de différentes cultures</b>	<b>22</b>
<b>3. Résultats et discussion</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Établissement des spécimens adultes de référence</b>	<b>23</b>
3.1.1. Collecte et identification des spécimens adultes	23
3.1.2. Obtention des séquences génétiques des spécimens adultes	25
<b>3.2. Adaptation méthodologique aux stades larvaires</b>	<b>31</b>
3.2.1. Individus d'élevage	31
3.2.2. Plaques versus mini-colonnes	32
3.2.3. Quantité de tissus à utiliser	33
<b>3.3. Validation du codage à barre sur les larves de différentes cultures</b>	<b>34</b>
<b>4. Conclusion générale et protocole final d'identification par codage à barres</b>	<b>38</b>

<b>Remerciements</b>	<b>39</b>
<b>Références</b>	<b>39</b>
<b>Annexe 1</b>	<b>41</b>
Liste des solutions pour l'extraction des ADN	41
<b>Annexe 2</b>	<b>43</b>
Documents de transfert	43

## 1. Problématique et objectifs

### 1.1. Problématique

Les lépidoptères ravageurs des ressources agricoles au Québec appartiennent majoritairement aux deux super-familles des Tortricoidae et des Noctuoidae qui totalisent 46 728 espèces décrites à ce jour dans le monde (Nieukerken et al. 2011). Les noctuelles (Famille : Erebidae et Noctuidae) sont des espèces nocturnes qui attaquent principalement les cultures légumières. Elles peuvent être classées comme « terricoles » lorsqu'elles attaquent les racines et sont alors appelées communément ver-gris. Les espèces classées « défoliatrices » sont toutes les autres espèces qui s'attaquent aux parties aériennes de la plante. Les tordeuses (Famille : Tortricidae) quant à elles sont des papillons attaquant tout type de culture et dont les chenilles tissent généralement une toile autour des feuilles et des fleurs de la plante. L'identification taxonomique de ces papillons ravageurs est primordiale afin de développer des nouveaux outils de dépistage, des nouvelles méthodes de lutte pour limiter les dommages occasionnés aux cultures ou simplement pour établir des recommandations agronomiques aux producteurs quant à l'utilisation de méthodes de lutte déjà existantes.

Lorsque les premiers stades larvaires de ces papillons sont observés en parallèle avec des dommages sur les racines, feuilles ou fruits, c'est le premier signe d'infestation des cultures et le diagnostic taxonomique du stade ravageur est alors requis. Chez les lépidoptères, seules les larves provoquent des dommages aux cultures et il est possible de les identifier grâce à des critères taxonomiques morphologiques. Par exemple la présence/absence du peigne anal, le nombre et la disposition des crochets sur les fausses pattes, l'emplacement et les variations de forme des soies sur le corps, la coloration des larves et la présence de lignes colorées sur leur dos sont des critères morphologiques observables utilisés pour leur identification (MacKay 1959; Chapman et Lienk 1971; Stehr 1987). Cependant, certaines caractéristiques sont communes à plusieurs espèces vivant simultanément dans une même culture. Par exemple, les larves de la tordeuse orientale du pêcher, *Grapholita molesta* (Busck) et du petit carpocapse de la pomme, *Grapholita prunivora* (Walsh) peuvent porter respectivement de 26 à 41 et de 21 à 30 crochets sur les fausses pattes ventrales (MacKay 1959). Ce chevauchement du nombre de crochets empêche de distinguer adéquatement ces deux espèces au stade larvaire si elles sont présentes à la même période. Dans ce cas, il est courant de mettre en élevage sur une diète, souvent artificielle, les larves récoltées afin d'identifier, à l'aide des critères taxonomiques morphologiques (patron des ailes et la forme des genitalia), les espèces de papillons adultes qui seront formées (Heinrich 1926; Chambon 1999). Cette méthode diminue les risques de fausse identification mais elle nécessite plus de temps et de main d'œuvre reliés au maintien des élevages des insectes à identifier. De plus, pour certaines espèces, aucune diète artificielle n'est commercialement disponible, ce qui augmente la mortalité larvaire qui peut alors atteindre 30 % pour certaines espèces. Ces méthodes d'identification sont aussi utilisées par les équipes de recherche qui réalisent des études de population ou de validation de modèles phénologiques prévisionnels ainsi que tout autre projet visant la connaissance de ces ravageurs et la lutte à leurs populations.

Avec la venue de la biologie moléculaire, de nouvelles méthodes d'identification taxonomique des insectes ont vu le jour apportant de grands avantages avec un niveau de précision inégalé. L'une des méthodes consiste à identifier des larves à partir d'un marqueur génétique qui est une séquence spécifique dont la longueur et l'ordre des bases nucléotidiques sont propres à chaque espèce de lépidoptère (Barcenas et al. 2005; Timm et al. 2008; Sony et al. 2009). Il s'agit alors d'extraire l'ADN des spécimens, de l'amplifier via une réaction en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques à des gènes portés par le papillon. Les gènes les plus souvent ciblés pour l'identification des insectes sont ceux du cytochrome c oxydase (unité I) et des sous-unités 16S et 18S de l'ADN ribosomale nucléaire (Caterino et al. 2000). Cette technique a cependant ses limites : les séquences amplifiées, utilisées comme marqueurs, sont spécifiques et donc ne permettent pas de détecter de nouvelles espèces exotiques ayant une très grande ressemblance morphologique. Pour chaque spécimen récolté, l'ADN peut être soumis à l'amplification PCR à l'aide de plusieurs paires d'amorces développées pour détecter plusieurs espèces en une seule réaction (méthode multiplexe) ou avec chaque paire d'amorces, une à une lorsque leur température d'hybridation est incompatible (méthode uniplexe), ce qui peut provoquer une répétition importante des manipulations en laboratoire dans ce dernier cas.

Une autre méthode consiste à identifier des larves à partir du codage à barres de l'ADN (DNA-barcoding) (Ratnasingham et Hebert 2007). Cette méthode a été développée en 2003 par plusieurs équipes de recherche de l'Université de Guelph. Elle a permis de cataloguer jusqu'à ce jour plus de 3,5 million d'échantillons ADN de milliers d'organismes vivants sous une bibliothèque appelée « Barcode of Life Data Systems » (BOLD) (Ratnasingham et Hebert 2007). Il est actuellement possible d'identifier à l'espèce jusqu'à 194 000 espèces différentes à travers le règne des eucaryotes. Les lépidoptères font l'objet d'une campagne mondiale de séquençage (Lepidoptera Barcode of life, iBOL) avec l'objectif de pouvoir identifier un maximum d'espèces à n'importe quel stade de leur développement (de l'œuf à l'adulte) et de faciliter la découverte et la description de nouvelles espèces. La méthode repose sur l'amplification PCR d'un marqueur moléculaire dont la séquence spécifique aux lépidoptères a une longueur de 648 paires de bases (pb) portées par le gène du cytochrome c oxydase unité I (COI). Cette région génétique amplifiée est ensuite séquencée et comparée aux séquences connues cataloguées dans la bibliothèque du BOLD (Ratnasingham et Hebert 2007). Chaque espèce de papillon possède une séquence de base spécifique à l'espèce sur cette portion normalisée de 648 pb avec peu de variations intraspécifiques. La séquence utilisée a l'avantage d'être d'une longueur fixe et commune auprès de 76 400 espèces de lépidoptères séquencées à ce jour. Par exemple, sur plus de 11 000 individus représentant 1 300 espèces de papillons récoltées dans l'est de l'Amérique du Nord, le codage à barres a permis d'en identifier à l'espèce 99,3 % avec une divergence intraspécifique aussi faible que 0,43 % (Hebert et al. 2009).

Le codage à barres ADN présente des avantages importants par rapport à la méthode précédente de par l'utilisation d'une unique paire d'amorces commune à tous les lépidoptères (de Waard et al. 2009). Également, le gène du COI utilisé comme marqueur moléculaire présente de

nombreuses copies dans les cellules des organismes vivants, il ne comporte pas d'introns et rarement de délétions. Il est facilement amplifiable par PCR, si bien que le prélèvement d'une patte ou l'antenne d'adulte de papillons suffit pour réaliser les analyses (Floyd et al. 2010). La méthode de codage à barres d'ADN, applicable à tous les eucaryotes, permet de réaliser des recensements exhaustifs d'insectes et de détecter des espèces cryptiques ou de nouvelles espèces exotiques parmi les échantillons récoltés (Hebert et al. 2009). L'utilisation du codage à barres ADN dans les protocoles de détection et régulation des ravageurs d'importance économique est une voie d'avenir dans un cadre réglementaire ou de recherche (Floyd et al. 2010). Il est employé en Nouvelle-Zélande depuis 7 ans dans les protocoles des douanes pour détecter certaines mouches à fruits et notamment trois espèces de lépidoptères de la famille des Lymantriidae (Armstrong 2010). L'identification des spécimens de lépidoptère par codage à barres ADN se fait le plus souvent sur les papillons adultes avec un morceau d'antenne ou de patte. Cependant, des études très récentes ont démontré la possibilité d'utiliser cette technique pour identifier à l'espèce des larves de Geometridae, Lymantriidae et Coleophoridae (Ball et Armstrong 2006; Emery et al. 2009; Strutzenberger et al. 2011). L'ADN étant présent dans toutes les cellules vivantes, le codage à barres ADN peut identifier une espèce quelque soit le stade biologique de l'insecte : œuf, larve, nymphe ou adulte.

Dans le cadre de ce projet de recherche, plusieurs lépidoptères ravageurs d'importance économique au Québec ont été identifiés comme de parfaits candidats pour valider la technique d'identification moléculaire par codage à barres de l'ADN puisque l'identification des stades larvaires sur des critères morphologiques taxonomiques est très difficile. En vergers de pommiers du Québec, il existe trois espèces de papillons ravageurs de la famille des Tortricidae dont les larves partagent la pomme comme ressource alimentaire. Au cours de la saison, les larves de ces trois espèces peuvent se retrouver simultanément dans les vergers et elles sont difficilement différenciables. Il s'agit du carpocapse de la pomme, *Cydia pomonella* (L.), du petit carpocapse de la pomme, *Grapholita prunivora* (Walsh) et de la tordeuse orientale du pêcher, *Grapholita molesta* (Busck) (Agnello et al. 2006; Bellerose et al. 2007; Vanoosthuysen et al. 2010). Les dégâts liés à ces papillons peuvent avoisiner 10 % dans certains vergers à régie de production fruitière intégrée et plus de 40 % dans les vergers à régie biologique (Bellerose et al. 2010). Ces trois espèces ont des cycles de vie très similaires au Québec et occasionnent des dommages similaires et d'importance sur les fruits qui sont alors déclassés pour la transformation ou simplement perdus. Les larves qui éclosent à partir de juin pénètrent le fruit et s'y alimentent en creusant une galerie superficielle ou profonde selon les espèces. La présence d'excréments ou de cicatrices superficielles au point d'entrée dans le fruit témoigne de la présence d'une larve.

Dans les grandes cultures et les cultures maraîchères, plusieurs espèces de noctuelles, notamment la légionnaire uniponctuée, *Mythimna unipuncta* (Haworth), le ver-gris noir, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel), le ver de l'épi de maïs, *Helicoverpa zea* (Boddie), la légionnaire d'automne, *Spodoptera frugiperda*, (J. E. Smith), et le ver-gris panaché *Peridroma saucia* (Hübner), peuvent causer des dommages économiques importants. Ils font l'objet d'un dépistage structuré dans plusieurs cultures dans le cadre du Réseau d'avertissements phytosanitaires afin d'établir la nécessité ou

non de recourir à des interventions phytosanitaires pour limiter les pertes de rendement. L'identification des jeunes larves au niveau de l'espèce s'avère indispensable pour établir la stratégie de lutte contre ces ravageurs mais elle constitue un casse-tête pour les équipes de dépisteurs sur le terrain. Les spécimens doivent être acheminés au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ mais souvent les larves sont trop petites pour être identifiées avec certitude. Elles doivent être mises en élevage jusqu'à ce qu'elles aient atteint un stade assez avancé ou même le stade adulte pour que le critère taxonomique puisse être confirmé puisque les clés disponibles ayant été élaborées uniquement pour les derniers stades larvaires. Des taux de mortalité élevés (larves moribondes acheminées au laboratoire) et des délais constituent un désavantage de cette approche classique de diagnostic.

## 1.2. Objectifs de recherche

Le projet de recherche présenté ici comporte donc trois objectifs qui ont été réalisés de 2011 à 2013 avec pour finalité de développer une technique d'identification par codage à barres pour le laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ :

**Objectif 1** : L'établissement des séquences génétiques de référence à partir d'adultes de papillons capturés dans plusieurs cultures et dans plusieurs régions du Québec.

**Objectif 2** : L'adaptation méthodologique de la méthode d'identification par codage à barres aux stades larvaires.

**Objectif 3** : La validation du codage à barres sur des larves de ravageurs capturées dans différentes cultures.

## 1.3. Description des espèces du projet

### 1.3.1. La légionnaire uniponctué, *Mythimna unipuncta* (Haworth)

La légionnaire uniponctué est un ravageur qui migre annuellement des États-Unis vers le Québec. Les adultes sont habituellement dépistés par un piège à phéromone placé dans les champs dès le mois d'avril. Les infestations sont sporadiques mais comme les femelles peuvent pondre de 25 à 130 œufs sur une même tige, quand les infestations surviennent, elles peuvent être majeures. Les larves et dégâts s'observent principalement dans les champs de maïs, d'avoine, de soya, d'orge et de blé, de la mi-mai jusqu'au mois d'août. Les larves mesurent jusqu'à 35 mm à maturité et elles ont le corps gris verdâtre qui vire au brun verdâtre avec l'âge. Le corps est orné de bandes longitudinales noires et orangées, bordées de blanc. (Maund 2002; Légaré *et al.* 2013; Labrie et Voynaud 2013).



**Figure 1** : Adulte et larve de *M. unipuncta*.

### 1.3.2. Le ver-gris noir, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel)

Le ver-gris noir est une espèce migrante annuellement en provenance du golfe du Mexique. Les adultes sont dépistés grâce à des pièges à phéromone posés dans les champs dès le mois d'avril. Les larves et dégâts s'observent dans les cultures de maïs, soya, canola, luzerne, trèfle et diverses cultures maraichères de la mi-mai à la mi-juillet. La larve atteint 50 mm à maturité et elle est de couleur brun-noir grisâtre avec deux paires de points noirs sur tout le long du corps (Labrie et Voynaud 2013).



**Figure 2** : Adulte et larve d'*A. ipsilon*.

### 1.3.3. Le ver de l'épi du maïs, *Helicoverpa zea* (Boddie)

Le ver de l'épi est une espèce qui migre annuellement en provenance des États-Unis et du Mexique. Les adultes sont dépistés par des pièges à phéromone à partir de la fin mai et cette espèce s'attaque au poivron, à la tomate, au soya et au maïs sucré. Les larves et les dégâts s'observent du début juillet à la fin septembre. La larve à maturité varie de 32 à 49 mm. La couleur de sa tête varie de orange à brun clair et l'abdomen varie de verdâtre à brunâtre avec des rayures latérales pâles et foncées vertes, brunes ou roses. Le dessous de la larve est pâle (Capinera 2008; Jean et Boisclair 2009).



**Figure 3** : Adulte et larve de *H. zea*.

#### 1.3.4. La légionnaire d'automne, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

La légionnaire d'automne est un ravageur qui migre annuellement du sud des États-Unis vers le Québec. Elle se retrouve au Québec partout où l'on cultive du maïs. Les adultes sont habituellement dépistés par un piège à phéromone placé en bordure de champ de la mi-juin à la fin septembre. Les infestations sont sporadiques mais difficiles à prévoir. Les larves et les dégâts s'observent principalement dans les champs de maïs, d'avoine, de soya, d'orge et de blé et les larves sont observées de la mi-mai jusqu'à la fin septembre. Souvent confondues avec la légionnaire uniponctué et le ver-gris de l'épi, les larves mesurent 35 à 40 mm à maturité. Leur tête foncée est réticulée et porte un Y inversé claire. Leur dos est orné de trois rayures pâles étroites et de tubercules noirs. Vers l'extrémité de l'abdomen quatre tubercules forment un carré (Capinera 2008; Jean et Boisclair 2009; Maund 2002; Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales 2009).



Figure 4 : Adulte et larve de *S. frugiperda*.

#### 1.3.5. Le ver-gris panaché, *Peridroma saucia* (Hübner)

Plusieurs espèces de ver-gris peuvent infester les cultures maraichères et sont difficilement identifiables les unes des autres au stade larvaire. On les retrouve sur des cultures aussi diverses que choux, brocolis, laitues, tomates, pommes-de-terre. Le ver-gris panaché est principalement un ravageur migrateur provenant des États-Unis. Puisque les pièges à phéromone sont peu spécifiques et capturent plusieurs espèces de ver-gris, la surveillance régulière des champs est le meilleur moyen de dépister la présence des larves et des dommages à partir du début mai. Les larves mesurent 30 à 45 mm à maturité et sont de couleurs gris-brun à gris-noir avec des taches jaunes-blanchâtres sur chacun des quatre premiers segments abdominaux (Capinera 2008; Chaput 2000; Jean et Boisclair 2009).



Figure 5 : Adulte et larve de *P. saucia*.

### 1.3.6. Le carpocapse de la pomme, *Cydia pomonella* (L.)

Le carpocapse de la pomme est mondialement connu pour être un ravageur important de la pomme. C'est un ravageur interne des fruits à noyaux et à pépins. Ce sont les larves de dernier stade qui hibernent et les premiers adultes sont dépistés à l'aide d'un piège à phéromone spécifique à partir de la fin mai. Les dommages et les larves de ce ravageur sont observables de la mi-juin à la récolte des pommes. Les larves matures de 14 à 19 mm, sont rosées avec la tête et la plaque thoracique brun noire. Les jeunes stades larvaires sont facilement confondables avec les espèces du genre *Grapholita*. Il est cependant possible de les différencier à la loupe binoculaire, grâce à l'absence de peigne anal chez les larves de carpocapse de la pomme (Chapman et Lienk 1971; Chouinard et al. 2000; Shel'Deshova 1967).



Figure 6 : Adulte et larve de *C. pomonella*.

### 1.3.7. Le petit carpocapse de la pomme, *Grapholita prunivora* (Walsh)

Le petit carpocapse de la pomme est un ravageur des pommes, des prunes, des cerises et des bleuets. Les adultes sont dépistés à partir du début mai à l'aide d'un piège à phéromone peu spécifique qui capture aussi d'autres espèces de *Grapholita*. Les larves très semblables au carpocapse de la pomme ne dépassent pas 9 mm de longueur à maturité. Elles forment des galeries sous la pelure du fruit alors que celles du carpocapse percent un tunnel vers le cœur de la pomme et ses pépins. Bien qu'à la loupe binoculaire les larves du petit carpocapse sont différenciables de celles du carpocapse de la pomme, elles sont difficilement identifiables à l'aide de structures morphologiques présentes sur les fausses pattes des trois espèces de *Grapholita* (Agnello et al. 2006; Mackay 1959)



Figure 7 : Adulte et larve de *G. prunivora*.

### 1.3.8. La tordeuse orientale du pêcher, *Grapholita molesta* (Busck)

La tordeuse orientale du pêcher est un ravageur interne des fruits à noyaux et à pépins plus particulièrement de la pomme et de la pêche. Au Québec, elle a été observée pour la première fois en 2002 dans un verger de Montérégie-Ouest. Depuis, un suivi régulier des adultes révèle que l'aire de distribution de ce ravageur augmente continuellement dans les vergers de pommiers. Les adultes sont dépistés à partir du début mai à l'aide d'un piège à phéromone peu spécifique qui capture aussi d'autres espèces de *Grapholita*. Les larves très semblables au carpocapse de la pomme ne dépassent pas 11 mm de longueur. Bien qu'à la loupe binoculaire elles sont différenciables de ce dernier, elles sont difficilement identifiables à l'aide de structures morphologiques présentes sur les fausses pattes des trois espèces de *Grapholita* (Agnello et al. 2006; Bellerose et al. 2007; Mackay 1959).



**Figure 8** : Adulte et larve de *G. molesta*.

### 1.3.9. Période d'observation des larves au Québec

Le tableau 1 ci-dessous dresse les périodes où les larves sont observables dans les cultures au Québec et pendant lesquelles des échantillons peuvent être envoyés au laboratoire de diagnostic du MAPAQ. Comme énoncé précédemment, plusieurs espèces peuvent être confondues telles *M. unipuncta*, *H. zea* et *S. frugiperda* qui peuvent être observés en même temps dans les cultures maraichères et *C. pomonella*, *G. prunivora* et *G. molesta* qui sont présentes en même temps dans les vergers.

**Tableau 1** : Période de présence des larves de huit espèces de lépidoptères ravageurs au Québec dans les cultures.

	Juin	Juillet	Août	Septembre
Légionnaire uniponctué, <i>Mythimna unipuncta</i> (Haworth)				
Ver gris noir, <i>Agrostis ipsilon</i> (Hufnagel)				
Ver de l'épi du maïs, <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)				
Ver-gris panaché, <i>Peridroma saucia</i> (Hübner)				
Légionnaire d'automne, <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)				
Carpocapse de la pomme, <i>Cydia pomonella</i> (L.)				
Petit carpacse de la pomme, <i>Grapholita prunivora</i> (Walsh)				
Tordeuse orientale du pêcher, <i>Grapholita molesta</i> (Busck)				

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1.Établissement des spécimens adultes de référence

#### 2.1.1. Collecte et identification des spécimens adultes

Durant les étés 2011 et 2012, des pièges à phéromone de type MULTI-PHER ont été placés dans différentes cultures d'importance afin de capturer le maximum de papillons adultes pour établir les séquences génétiques de référence servant au projet. Ces pièges ont été placés dans le cadre du dépistage du réseau d'avertissement phytosanitaire (RAP) du MAPAQ dans différentes cultures (pommier, maïs sucré, grandes cultures, cultures maraîchères). Les spécimens capturés ont été envoyés toutes les semaines au laboratoire de diagnostic du MAPAQ et au laboratoire de production fruitière intégrée (PFI) de l'IRDA pour identification taxonomique jusqu'à obtention d'un maximum de 10 individus par espèce et par région. Des photos de chaque spécimen ont été prises avant leur épinglage et une matrice a été créée afin de colliger l'information pertinente sur tous les spécimens reçus. Cette matrice comportait les informations suivantes :

- Le code du spécimen;
- Le code de la photo;
- L'identification potentielle;
- Le stade de l'insecte;
- La région d'échantillonnage;
- La ville d'échantillonnage;
- La culture dans laquelle le spécimen a été récolté;
- Le nom de l'exploitation agricole;
- Les coordonnées géographiques du champ (latitude et longitude);
- Le nom du dépisteur;
- La date de récolte du spécimen.

Tous les spécimens collectés ont été pré-identifiés au laboratoire de diagnostic du MAPAQ et au laboratoire PFI de l'IRDA puis envoyé au laboratoire du Dr. Landry de la Collection nationale canadienne des insectes, arachnides et nématodes (CNC) à Ottawa pour validation finale. Tous les spécimens sont actuellement conservés au laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ.

### **2.1.2. Protocole d'obtention des séquences génétiques des spécimens adultes**

Afin d'obtenir les séquences génétiques des spécimens adultes reçus, une à deux pattes de chaque spécimen choisi ont été prélevées et disposées dans un puits d'une plaque de 96 puits. La récolte des spécimens adultes a eu lieu au cours de l'été 2011. Les plaques contenant les spécimens de pattes des adultes ont été conservées à la température pièce trois mois au laboratoire PFI de l'IRDA à Saint-Bruno. Les plaques ont été transmises au laboratoire d'Écologie Microbienne de l'IRDA à Québec en septembre 2011. Les ADN génomiques des pattes des spécimens adultes ont été extraits, purifiés puis amplifiés selon un protocole d'extraction de l'ADN et d'amplification PCR (Ivanova et al. 2006) détaillés ci-dessous.

Le protocole d'extraction d'ADN a utilisé une plaque AcroPrep™ de 96 puits ayant à sa base une membrane filtrante de fibre de verre au borosilicate qui a une affinité pour les acides nucléiques (PALL Corp. Port Washington, E.U.). Cette plaque filtrante permet d'éliminer les protéines, lipides et autres contaminants cellulaires résultant des étapes de broyage et de lyse dans un tampon chaotropique alors que les ADN sont retenus sur la membrane filtrante lors des cycles de lavages/centrifugation. Les ADN ont été élués par centrifugation dans une plaque de conservation des ADN purifiés de 96 puits. L'amplification PCR du gène marqueur cytochrome c oxydase unité I (COI) a été réalisé avec la paire d'amorces LEP-F1 (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATAT-3') et LEP-R1 (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA-3') qui génèrent après 50 cycles d'amplification un fragment de 648 pb. Les produits d'amplification ont été détectés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% (p/v) coloré au bromure d'éthidium et visualisés sous lumière ultra-violette (UV). Les images des gels ont été obtenues par une caméra CCD.

Les produits d'amplification ont ensuite été envoyés pour séquençage à la plateforme de séquençage et de génotypage du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL). Les séquences obtenues ont finalement été éditées, analysées et alignées avec le logiciel Genieous 6.1 (Biomatters Ltd.). Les séquences ont pu être comparées aux banques de séquences disponibles sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information) qui contiennent des milliers de séquences répertoriées pour le public et notamment des séquences cataloguées dans le BOLD.

Les ADN des spécimens adultes dont l'amplification n'a pas donné de résultats avec les amorces LEP-F1 et LEP-R1 (648 pb) ont été ré-amplifiés avec le couple d'amorces LEP-F1 et LEP-R350 qui génèrent un fragment de 350 pb. L'utilisation de l'amorce LEP-R350 (5'-CTTATATTATTATTCGTGGGAAAGC-3') a permis de vérifier si l'échec de la première amplification était le résultat d'une quantité insuffisante d'ADN extrait. Le produit de 350 pb a également été soumis au séquençage pour déterminer l'identité des spécimens adultes.

### **2.1.2.1. Protocole d'extraction ADN**

Les échantillons de pattes d'adultes ont été soumis à un protocole d'extraction d'ADN utilisant une plaque de 96 puits pour l'extraction sans broyage des tissus et une plaque AcroPrep™ Advance 96 avec membrane filtrante (PALL Corp, Port Washington, NY. E.U.) pour la purification rapide des 96 échantillons d'ADN.

(voir l'Annexe 1 pour la préparation des solutions) :

#### Étapes de lyse des tissus en microplaque de 96 puits

1. Bien mélanger 0,8 mL Protéinase K ( $20\text{mg mL}^{-1}$ ) dans 7,2 mL de tampon de broyage.
2. Déposer dans un puits un échantillon de patte d'un spécimen adulte en s'assurant que les tissus sont brisés pour bien reposer au fond du puits.
3. Ajouter 75  $\mu\text{L}$  de tampon de broyage contenant  $2\text{ mg mL}^{-1}$  de Protéinase K dans chaque puits. Recouvrir la plaque d'une membrane scellante.
4. Incuber la plaque à  $56^{\circ}\text{C}$  pendant 16-20 heures sous une agitation orbitale (60 rpm).
5. Ajouter 150  $\mu\text{L}$  de tampon de fixation (Tampon de lyse + éthanol) préchauffé à  $56^{\circ}\text{C}$  dans chaque puits et incuber la plaque à  $56^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes sous une agitation orbitale (60 rpm).
6. Centrifuger la plaque à 1 000 xg pendant 20 secondes.

#### Étapes d'extraction et de purification des ADN

1. Transférer 150  $\mu\text{L}$  du surnageant de chaque puits dans un puits correspondant d'une plaque AcroPrep™ Advance 96 avec membrane de fibre de verre. Faire attention de ne pas mettre en contact le fond des puits avec une surface contaminée. Placer la plaque AcroPrep™ sur une plaque de 96 puits de 1 mL qui servira à recueillir les débris cellulaires et les lavages.
2. Centrifuger la plaque à 1 500 xg (2 820 rpm) pendant 2 minutes.
3. Laver les puits avec 300  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage 1 et centrifuger la plaque à 1 500 xg (2 820 rpm) pendant 2 minutes. Vider la plaque de réception des lavages. Bien essuyer les rebords de la plaque de réception des lavages avant de replacer la plaque AcroPrep™.
4. Laver les puits avec 800  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage 2 et centrifuger la plaque à 1 500 xg (2 820 rpm) pendant 3 minutes.
5. Placer un adaptateur sur une microplaque et déposer la plaque de filtration AcroPrep™ Advance 96 sur la microplaque de 96 puits. Laisser évaporer l'éthanol en incubant à  $56^{\circ}\text{C}$  pendant 15-30 minutes.
6. Ajouter au centre des puits, 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution réchauffé à  $56^{\circ}\text{C}$  et laisser 1-2 minutes avant de centrifuger à 1 500 xg (2 820 rpm) pendant 3 minutes.
7. Répéter l'étape précédente au besoin. L'ADN est ensuite conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.1.2.2. Protocole d'amplification**

Une fois l'extraction d'ADN réalisée, l'ADN de chacun des spécimens adultes a été amplifié à l'aide des amorces LEP-F1 et LEP-R1 (Hebert et al. 2004). Pour l'amplification réalisée dans un volume réactionnel de 25  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  d'ADN de chaque spécimen a été mélangé à 20  $\mu\text{L}$  d'un mélange de 2,5

µL d'H<sub>2</sub>O stérile, 2,5 µL de tampon PCR 10X contenant 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 12,5 µL de tréhalose 10 %, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,10 µL de dNTPs 10 mM, 0,15 µL de Taq ADN polymérase HotStart (5U/µL) et 0,25 µL de chacune des amorces LEP-F1 et LEP-R1 à 10 µM. Au besoin, lorsqu'aucun amplicon n'est détecté après le PCR LEP-F1/LEP-R1, un second PCR est préparé en utilisant la paire d'amorces LEP-F1 et LEP-R350 selon les mêmes volumes réactionnels et aux mêmes concentrations. Les conditions du thermocycleur sont résumées dans le tableau 2.

**Tableau 2** : Conditions du thermocycleur lors de l'amplification de l'ADN prélevé sur les pattes des insectes.

Étapes	Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (sec.)
Dénaturation initiale		94	1
Dénaturation	5	94	30
Hybridation		45	45
Polymérisation		72	60
Dénaturation	50	94	30
Hybridation		51	40
Polymérisation		72	75
Extension finale		72	600

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose de 2 % coloré au bromure d'éthidium et visualisés sous lumière ultra-violette. Les images des gels ont été captées par une caméra CCD.

*Modifications* : Des modifications à la méthodologie ont été effectuées, nous n'avons pas utilisé les services du laboratoire de Guelph associé au BOLD pour l'analyse des échantillons étant donné que le laboratoire d'Écologie Microbienne de l'IRDA pouvait analyser ces échantillons. Les produits d'amplification ont été séquencés sur un seul brin pour des raisons de budget. Pour ces raisons, nous n'avons pas pu intégrer les séquences obtenues dans le catalogue du BOLD.

## 2.2. Adaptation méthodologique aux stades larvaires

### 2.2.1. Élevages des spécimens

Les élevages ainsi que la préparation des spécimens ont été réalisés au laboratoire PFI de l'IRDA à Saint-Bruno-de-Montarville, l'identification taxonomique des spécimens adulte a été assurée par le Dr J.-F. Landry (CNC) à Ottawa. L'extraction des ADN des échantillons prélevés de larves, l'amplification PCR des ADN extraits, le séquençage des amplicons de 648 pb, l'édition, l'alignement et les comparaisons des séquences ont été réalisés conjointement par les laboratoires du Dr R. Hogue et du Dr D. Cormier de l'IRDA.

Durant l'été 2011, un élevage d'une population sauvage de papillons a été initié à partir de larves prélevées dans des pommes avec des dommages typiques. Les larves ont été récoltées à partir de la fin juin jusqu'à l'obtention de 25 mâles et 25 femelles grâce au sexage qui peut être réalisé par

l'observation des testis au dernier stade larvaire (van des Gest et Evenhuis 1991). Les spécimens ont été déposés individuellement dans des godets contenant de la diète artificielle puis placés dans une chambre d'élevage à 23°C, 60 % HR et 16L:8N jusqu'à la nymphose. Seuls les adultes nouvellement émergés ont été conservés et placés par couple dans des sacs plastiques afin d'obtenir des pontes. Les œufs récoltés ont été mis à incuber et les larves de génération F1 obtenues ont été élevées sur diète artificielle aux mêmes conditions que les adultes jusqu'à l'obtention du stade désiré.

Pour les larves de la génération F1, l'ADN a été extrait à partir de 16 larves de stade L3 et L5. Tous les spécimens ont été mesurés à la loupe binoculaire et des photos ont été prises afin d'obtenir des données morphométriques et visuelles des spécimens. Une portion postérieure de 2-4 mm<sup>3</sup> de tissu de l'abdomen a été prélevée pour les larves L5 alors que la larve complète a été utilisée pour les L3. L'obtention des séquences des spécimens F1 larvaires et adultes F1 parents ont été obtenus avec le protocole énoncé au point 2.2.2.

*Modification : La quantité de larves élevées et utilisées pour l'adaptation méthodologique s'est avérée insuffisante, c'est pourquoi nous avons utilisé d'autres larves issues de collecte afin de valider la méthode et de vérifier les points 2.2.2 et 2.2.3 ci-dessous.*

### **2.2.2. Plaques versus mini-colonnes**

Afin de procéder à une extraction rapide d'un grand nombre d'échantillons simultanément, il est possible d'utiliser des plaques AcroPrep™ Advance de 96 puits avec membrane filtrante de fibre de verre. Ce matériel permet l'utilisation de pipettes à répétition et d'octa-pipette, de même que de centrifuger 96 échantillons simultanément permettant ainsi un gain considérable de temps de réalisation du processus d'extraction de l'ADN. Cependant, avec ce type de matériel, nous avons observé une efficacité d'extraction d'ADN en deçà de nos attentes (voir figure 14) lors du premier essai avec les 264 échantillons de pattes d'adultes des espèces références. Nous avons donc comparé l'efficacité d'extraction d'ADN selon qu'elle soit réalisée sans broyage avec une incubation à la Protéinase K suivi d'une purification des ADN en plaque AcroPrep™ Advance de 96 puits ou qu'elle soit réalisée avec broyage par un pilon suivi d'une purification des ADN en tube mini-colonne avec filtre de silice. Les tissus de larve ont été traités selon le protocole détaillé ci-dessous. Les réactions PCR et l'analyse des produits amplifiés ont été réalisées tel que décrit à la section 2.1.2.2.

(voir l'Annexe 1 pour la préparation des solutions)

#### **Étape de lyse des tissus en tube de 1,5 mL ou de 0,5 mL selon la taille des spécimens à broyer**

1. Déposer dans un tube, un échantillon de tissus de larve en s'assurant que les tissus reposent bien au fond du tube.
2. Ajouter 50 µl de tampon de broyage dans chaque puits.
3. Ajouter 100 µL de tampon de lyse (GuHCl) préchauffé à 56°C dans chaque puit et broyer les tissus à l'aide d'un pilon. Laver le pilon avec 50 µL de tampon de lyse préchauffé à 56°C.
4. Incuber le tube à 56°C pendant 30 minutes.

5. Ajouter 200  $\mu\text{L}$  d'éthanol 96 % préchauffé à 56°C et bien mélanger
6. Centrifuger le tube à 1 000 xg pendant 20 secondes.

#### **Étape d'extraction et de purification des ADN**

1. Transférer 300  $\mu\text{L}$  du surnageant de chaque tube dans une mini-colonne avec membrane de silice. Ajouter 300  $\mu\text{L}$  de tampon de fixation préchauffé à 56°C dans chaque mini-colonne.
2. Ajouter 150  $\mu\text{L}$  d'éthanol 96 % préchauffé à 56°C dans chaque mini-colonne.
3. Déposer chaque mini-colonne sur un tube collecteur des lavages. Centrifuger la mini-colonne à 15 200 xg (13 000 rpm) pendant 1 minute.
4. Laver les mini-colonnes avec 300  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage 1 et centrifuger la mini-colonne à 15 200 xg (13 000 rpm) pendant 1 minute. Vider le tube de réception des lavages.
5. Laver les puits avec 600  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage 2 et centrifuger la mini-colonne à 15 200 xg (13 000 rpm) pendant 1 minute.
6. Laisser évaporer l'éthanol sur le filtre de silice en incubant la mini-colonne à 56°C pendant 5-10 minutes. Placer un tube propre sous la mini-colonne pour recueillir l'ADN élué.
7. Ajouter au centre des filtres de silice, 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution réchauffé à 56°C et laisser 1-2 minutes avant de centrifuger à 15 200 xg (13 000 rpm) pendant 1 minute.
8. Répéter l'étape précédente au besoin. L'ADN est ensuite conservé à -80°C ou -20°C.

L'autre protocole requiert le broyage des tissus d'insecte dans un tube avec un pilon et un tampon de broyage et les ADN sont purifiés par un passage sur une mini-colonne de silice. Ce dernier protocole a été utilisé avec des échantillons qui avaient été conservés longtemps à la température pièce, ou lorsque la quantité de tissus disponible était limitée.

#### **2.2.3. Quantité de tissus à utiliser**

Utiliser 16 larves pour l'adaptation méthodologique s'est avéré insuffisant, c'est pourquoi nous avons utilisé d'autres larves issues de la collecte en 2012 afin de valider la méthode. La quantité de tissu utilisé pour les extractions a été testée selon 3 catégories : 2-4  $\text{mm}^3$  (n=22), 4-8  $\text{mm}^3$  (n=10) et 8-12  $\text{mm}^3$  (n=11) de tissus larvaire prélevé afin de déterminer quelle quantité de tissus favorisait la meilleure efficacité d'extraction d'ADN et d'amplification PCR. Les tissus ont ensuite été extraits de la même manière que précédemment (voir 2.2.2.). Les réactions PCR et l'analyse des produits amplifiés ont été réalisées tel que décrit à la section 2.1.2.2. Lorsque la PCR LEP-F1/LEP-R1 ne générerait pas d'amplicon de 648 pb, une seconde PCR a été réalisée en utilisant la paire d'amorce LEP-F1/LEP-R350.

#### **2.3. Validation du codage à barres sur les larves de différentes cultures**

Durant 2 ans, 295 larves ont été récoltées via le laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ et via des collectes organisées par l'IRDA en vergers. De la même manière que pour les spécimens adultes, les spécimens larvaires ont été numérotés, et un tableau de données a été créé de manière identique à la table de la figure 12. Sur les 295 larves, 269 ont été utilisées pour les analyses afin de valider le protocole d'identification par codage à barre : extraction ADN de 2-4  $\text{mm}^3$  de tissus larvaire, amplification avec les amorces LEP-F1/LEP-R1 (648 pb) ou LEP-F1/LEP-R350

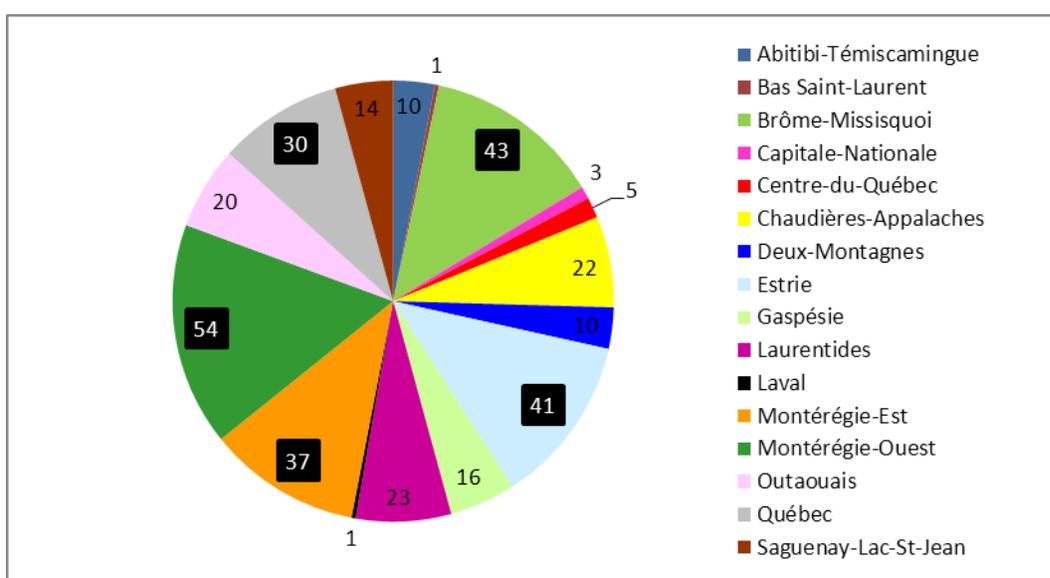
(350 pb), séquençage des amplicons et interrogation des bases de données publics pour identifier les spécimens à l'espèce.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1.Établissement des spécimens adultes de référence

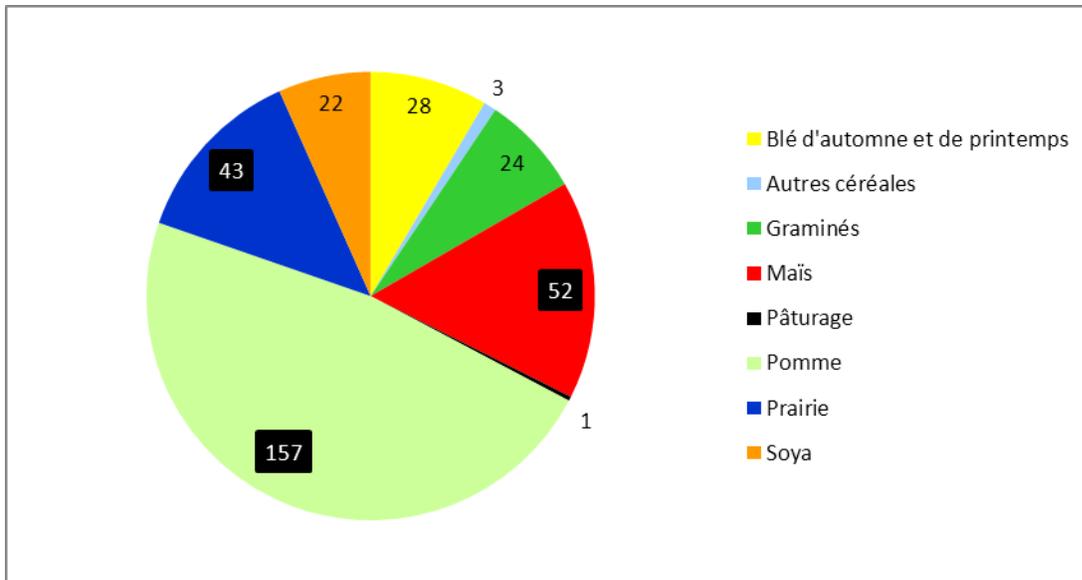
##### 3.1.1. Collecte et identification des spécimens adultes

La figure 9 résume le nombre de spécimens capturés dans les 16 régions administratives du Québec. La majorité des spécimens a été capturée dans les régions de la Montérégie–Ouest, Brôme-Missisquoi, Estrie, Montérégie-Est et Québec.



**Figure 9 :** Sommaire des captures des lépidoptères adultes dans 16 régions administratives du Québec.

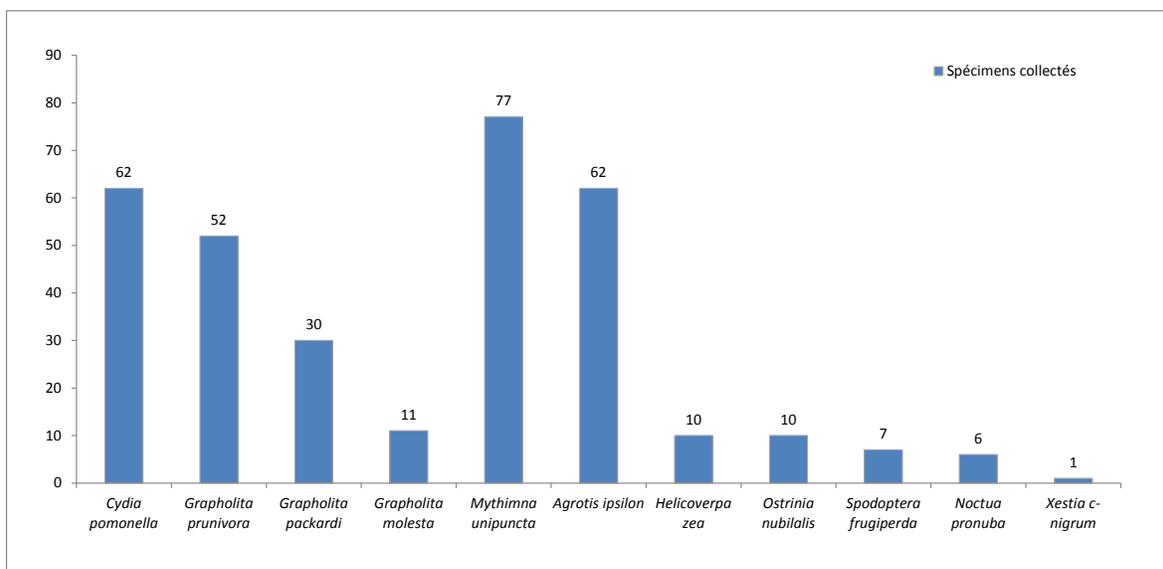
Les spécimens ont été récoltés dans huit types de culture dont la grande majorité provenait des vergers de pommiers, des champs de maïs, et des prairies (Fig. 10).



**Figure 10** : Sommaire des captures des lépidoptères adultes dans les différents types de culture.

La figure 11 dresse l'inventaire des 328 spécimens d'adulte collectés en 2011 et 2012 par le laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ et le labo PFI de l'IRDA. Une courte description de chacune de ces espèces a déjà été réalisée dans la section problématique afin de cerner l'importance de développer une méthode moléculaire pour l'identification des stades larvaires de ces espèces. La légionnaire uniponctué, le ver-gris noir, le carpocapse de la pomme et le petit carpocapse de la pomme sont les quatre espèces qui ont été majoritairement collectées pour le projet.

*Modifications* : Aucun spécimen de ver-gris panaché, *P. saucia*, initialement prévu au projet n'a pu être capturé durant les deux étés du projet mais quatre autres espèces se sont ajoutées à la liste : la noctuelle des cerises, *Grapholita packardi* Zeller, la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), la fiancée, *Noctua pronuba* (Linnaeus) et le ver-gris tacheté, *Xestia c-nigrum* (L.).



**Figure 11:** Nombre de spécimens adultes collectés en 2011 et 2012 pour établir les séquences de référence.

La figure 12 donne un aperçu de la matrice Excel créée pour colliger les informations sur chaque adulte récolté. La même matrice a été créée pour tous les spécimens de larves collectés en 2012.

Code de spécimen	Code de photo	Identification potentielle			Stade (Adulte ou larve)	Région	Ville	Culture	Nom de l'exploitation	Latitude	Longitude	Nom du dépositaire/responsable	Date piégeage
		Famille	Genre	Espèce									
601	IRDA-LEP-AD-601	Tortricidae	Grapholita	packardii	Adulte	Estrie	Sherbrooke	Pomme	Femme Ste-Catherine	45.3659789	-71.9342984	Emilie Turcotte-Côté	2011-06-07
602	IRDA-LEP-AD-602	Tortricidae	Grapholita	packardii	Adulte	Estrie	Compton	Pomme	La pommalbonne	45.1958121	-71.8147185	Emilie Turcotte-Côté	2011-06-07
603	IRDA-LEP-AD-603	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Estrie	Sherbrooke	Pomme	Femme Ste-Catherine	45.3659789	-71.9342984	Emilie Turcotte-Côté	2011-05-31
604	IRDA-LEP-AD-604	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Estrie	Sherbrooke	Pomme	Femme Ste-Catherine	45.3659789	-71.9342984	Emilie Turcotte-Côté	2011-05-31
605	IRDA-LEP-AD-605	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Estrie	Sherbrooke	Pomme	Femme Ste-Catherine	45.3659789	-71.9342984	Emilie Turcotte-Côté	2011-05-31
606	IRDA-LEP-AD-606	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Estrie	Sherbrooke	Pomme	Femme Ste-Catherine	45.3659789	-71.9342984	Emilie Turcotte-Côté	2011-05-31
607	IRDA-LEP-AD-607	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Estrie	Sherbrooke	Pomme	Femme Ste-Catherine	45.3659789	-71.9342984	Emilie Turcotte-Côté	2011-05-31
608	IRDA-LEP-AD-608	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Estrie	Sherbrooke	Pomme	Femme Ste-Catherine	45.3659789	-71.9342984	Emilie Turcotte-Côté	2011-05-31
609	IRDA-LEP-AD-609	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC1 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-13
610	IRDA-LEP-AD-610	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC1 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-13
611	IRDA-LEP-AD-611	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC1 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-13
612	IRDA-LEP-AD-612	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC1 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-13
613	IRDA-LEP-AD-613	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC2 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-20
614	IRDA-LEP-AD-614	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC2 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-20
615	IRDA-LEP-AD-615	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC2 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-20
616	IRDA-LEP-AD-616	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC2 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-20
617	IRDA-LEP-AD-617	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC2 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-20
618	IRDA-LEP-AD-618	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC2 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-20
619	IRDA-LEP-AD-619	Tortricidae	Grapholita	molesta	Adulte	Montréal-Ouest	Franklin	Pomme	IRDA-DC2 (Verger du Clocher)	45.0520878	-73.8868807	Nathalie Tanguay	2011-05-20
620	IRDA-LEP-AD-620	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Montréal-Ouest	Hemmingford	Pomme	Demoy	45.0195802	-73.6201221	Nathalie Tanguay	2011-05-27
621	IRDA-LEP-AD-621	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Montréal-Ouest	Hemmingford	Pomme	Demoy	45.0195802	-73.6201221	Nathalie Tanguay	2011-05-27
622	IRDA-LEP-AD-622	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Montréal-Ouest	Hemmingford	Pomme	Demoy	45.0195802	-73.6201221	Nathalie Tanguay	2011-05-27
623	IRDA-LEP-AD-623	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Montréal-Ouest	Hemmingford	Pomme	Demoy	45.0195802	-73.6201221	Nathalie Tanguay	2011-05-27
624	IRDA-LEP-AD-624	Tortricidae	Grapholita	prunivora	Adulte	Montréal-Ouest	Hemmingford	Pomme	Demoy	45.0195802	-73.6201221	Nathalie Tanguay	2011-05-27

**Figure 12 :** Aperçu de la matrice Excel créée pour référencer les spécimens collectés.

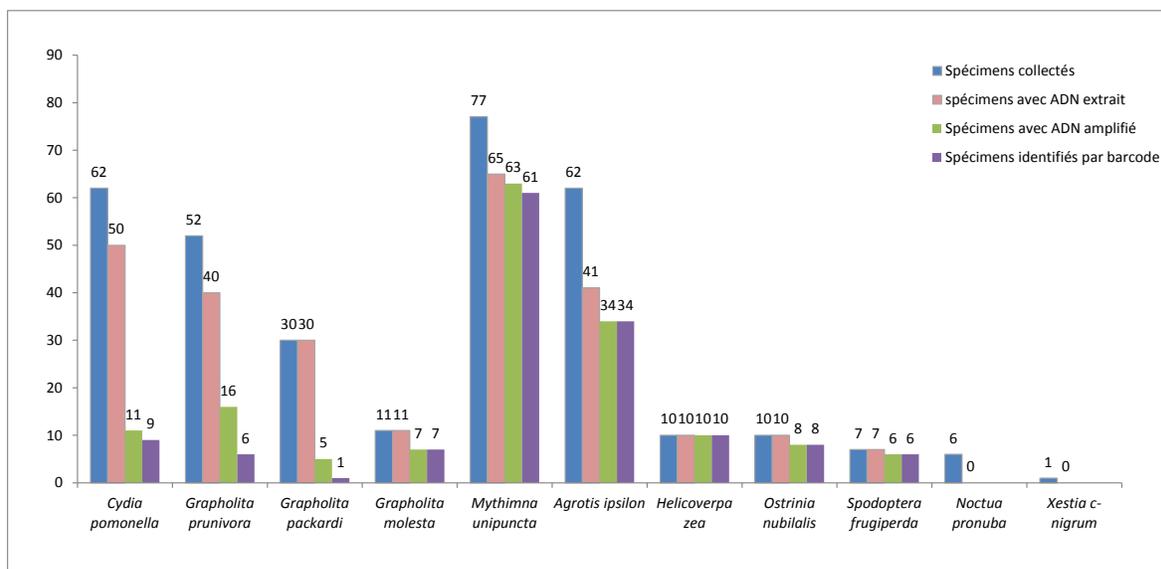
### 3.1.2. Obtention des séquences génétiques des spécimens adultes

Sur les 328 spécimens adultes collectés, nous avons analysés 264 spécimens avec les amorces LEP-F1 et LEP-R1 (Fig. 13). La probabilité de collecter des larves de certaines espèces en particulier ainsi que l'importance d'avoir une diversité régionale ont été des facteurs déterminant le choix des spécimens adultes à analyser.

La figure 13 montre en résumé que sur 264 spécimens adultes utilisés pour l'analyse, 160 ont eu leur ADN correctement extrait et amplifié (60% de réussite) et que 142 spécimens sur ces 160 ont pu correctement être identifiés par leurs séquences ADN (88% de réussite). Certaines espèces de

grosses tailles (ex : *M. unipuncta*, *A. ipsilon*, *H. zea*, *O. nubilalis* et *S. frugiperda*) ont montré un haut taux de réussite quant à l'extraction, l'amplification et l'identification par codage à barres. Par exemple, sur 65 spécimens de *M. unipuncta* analysés, l'ADN de 63 spécimens a été correctement extrait et l'interrogation des bases de données du BOLD a permis d'identifier correctement 61 spécimens sur 63. Au niveau des spécimens de plus petites tailles tels *C. pomonella* et le complexe des *Grapholita*, l'amplification avec les amorces LEP-F1 et LEP-R1 a donné un taux de réussite plus faible. Seulement 63,5% des *G. molesta*, 40 % des *G. prunivora*, 22% des *C. pomonella*, 16,5% des *G. packardi* avaient une amplification positive de leur ADN avec ces amorces. De plus, lorsque des échantillons contenaient des amplicons, l'interrogation des banques de données génétiques ont montré des erreurs d'identification (inversion) entre les trois espèces de *Grapholita*. Ceci étant probablement dû à des incertitudes quant à certains nucléotides que le séquenceur n'a pu identifier.

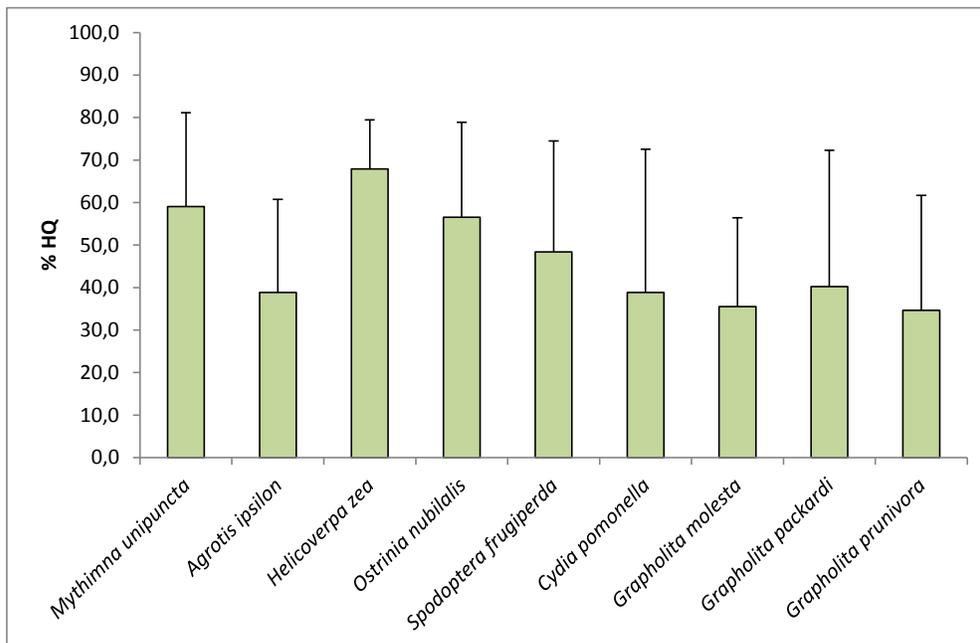
Afin d'expliquer ces résultats, la fraîcheur des spécimens aurait pu jouer un rôle et diminuer la réussite de l'extraction puisque plus les spécimens sont âgés, plus la réussite d'extraction diminue (Hajibabaei et al. 2005). Cependant, la méthode d'extraction de l'ADN peut aussi jouer un rôle puisque Hajibabaei et al. (2005) ont démontré que selon le type de méthode utilisée lors de l'extraction d'ADN de papillons capturés récemment, le succès d'amplification ne dépasse pas 80% et peut même descendre à plus bas que 25%. Il apparaît donc que pour l'utilisation de cette technique en tant que technique d'identification moléculaire, la partie la plus critique est la préservation de l'ADN et son extraction.



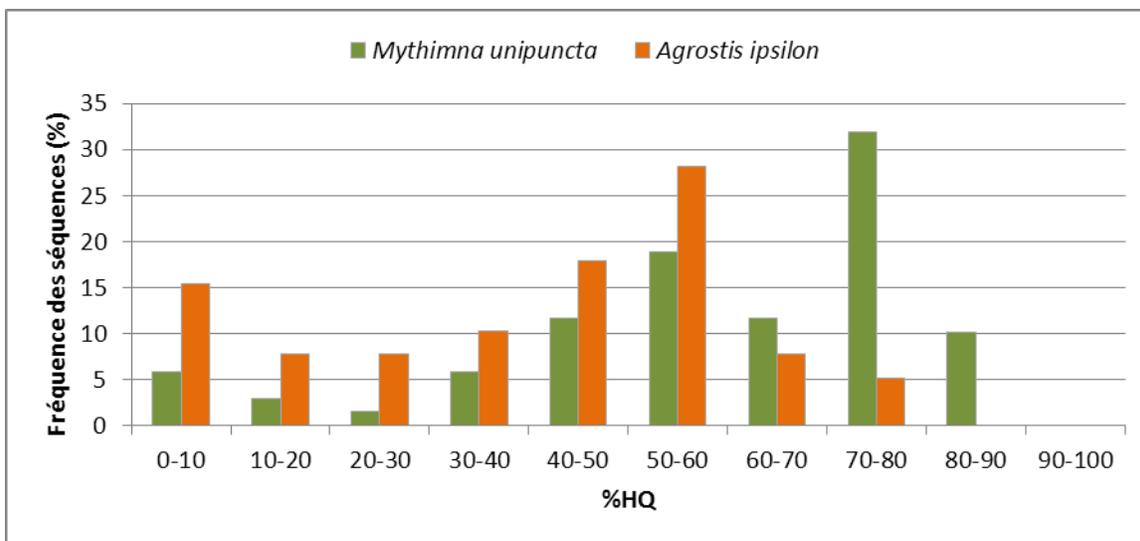
**Figure 13 :** Somme des spécimens adultes collectés, avec ADN extrait et amplifié puis correctement identifiés par codage à barres avec les amorces LEP-F1 et LEP-R1.

Parmi toutes les séquences obtenues les niveaux de haute qualité (% de HQ) différaient selon les espèces (Fig. 14). Par exemple, plus de 30 % des séquences des spécimens de *M. unipuncta*

avaient une haute qualité (de 70 à 80 %) contrairement aux spécimens d'*A. ipsilon* dont la majorité des séquences affichaient des niveaux de haute qualité inférieurs à 60 % (Fig. 15).



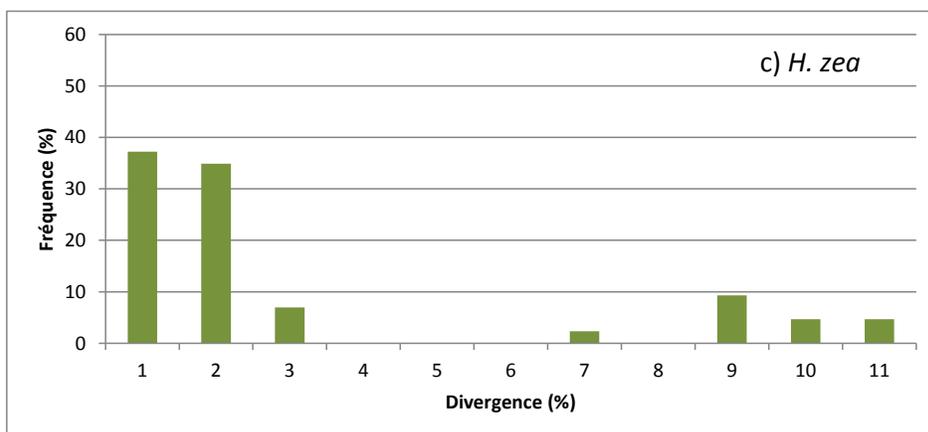
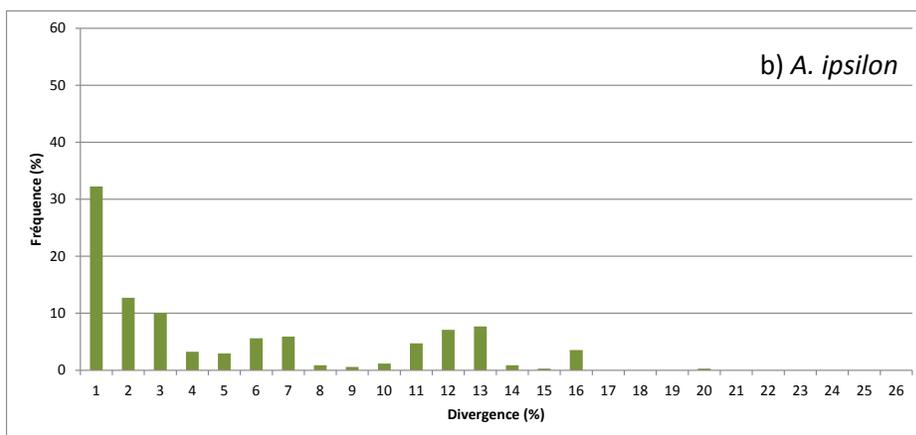
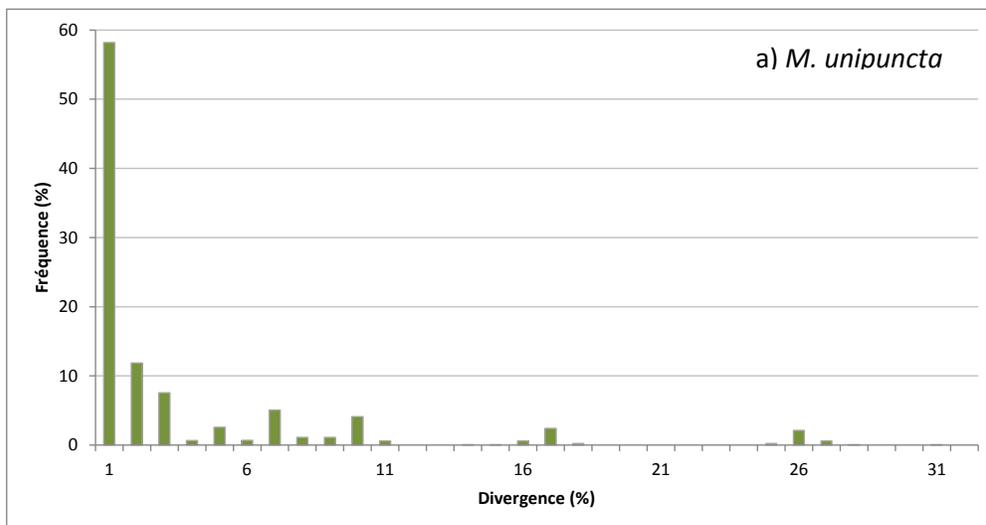
**Figure 14 :** Pourcentage moyen ( $\pm$  écart-type) de haute qualité (HQ) des séquences ADN des spécimens adultes.

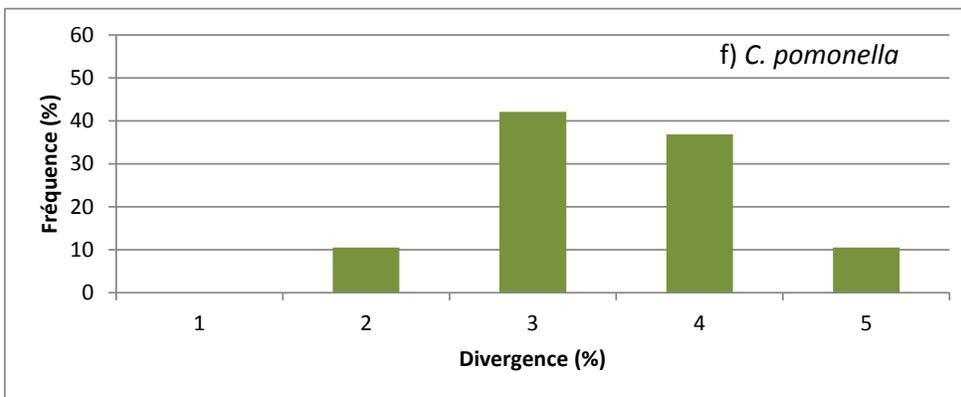
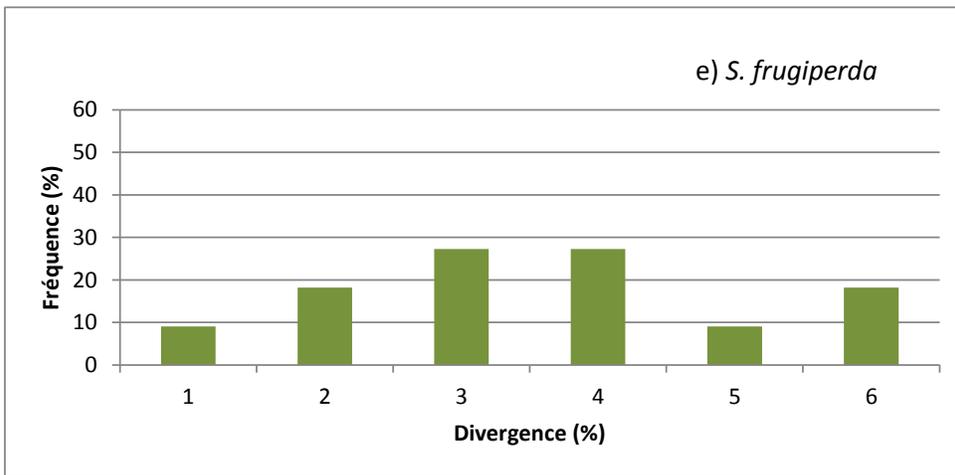
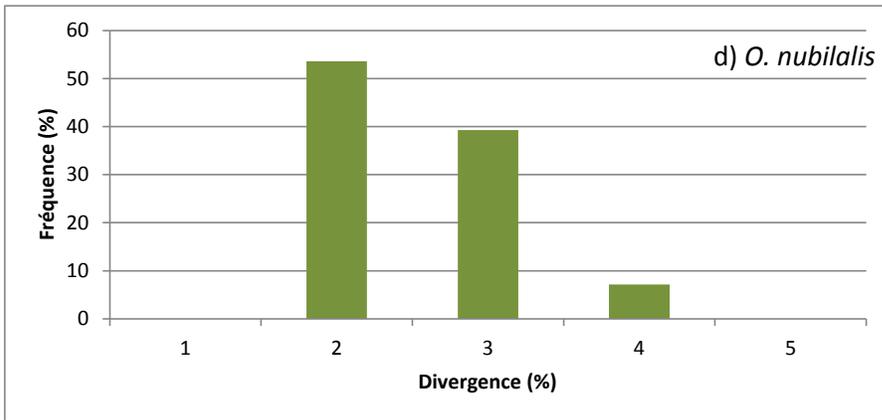


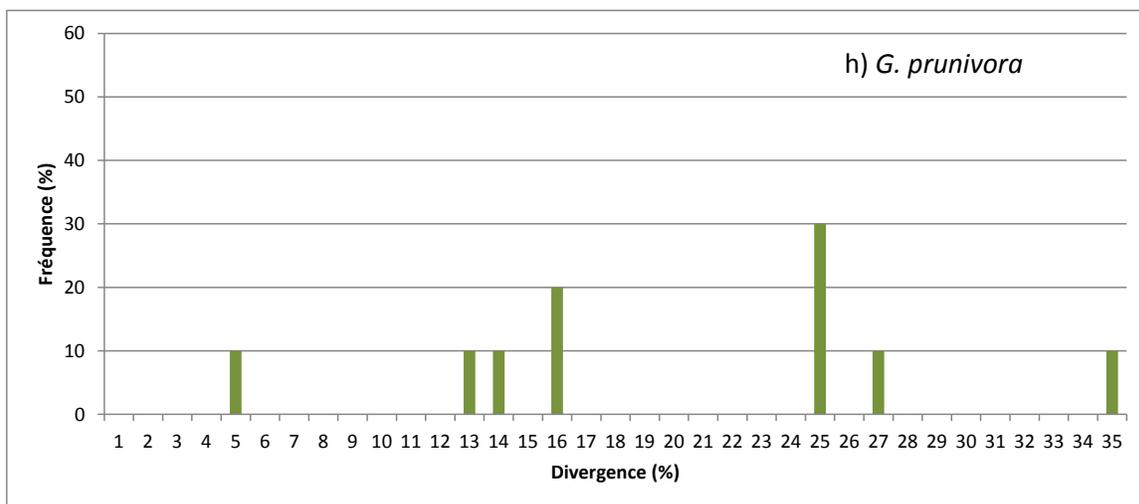
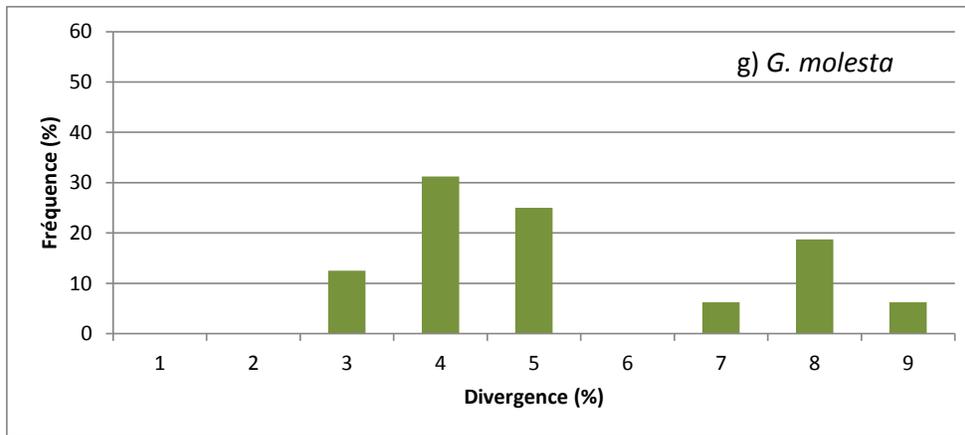
**Figure 15 :** Répartition des pourcentages de haute qualité des séquences pour les espèces *M. unipuncta* et *A. ipsilon*.

Comme énoncé précédemment, les amplicons ont été séquencés dans un sens uniquement. Ainsi les séquences génétiques obtenues n'ont pu être interprétées au niveau des ambiguïtés (nucléotides identifiés par un « N » dans la séquence dans le logiciel Genieous). L'analyse de divergence entre les séquences intra-spécifiques montre donc des pourcentages pouvant être

supérieurs à 2%. Les figures 16 montrent les pourcentages de divergence entre les séquences obtenues pour plusieurs espèces. Même si des divergences de 31% peuvent être observées par exemple pour *M. unipuncta*, il s'avère que la majorité des pourcentages de divergence se situent entre 0 et 3%.

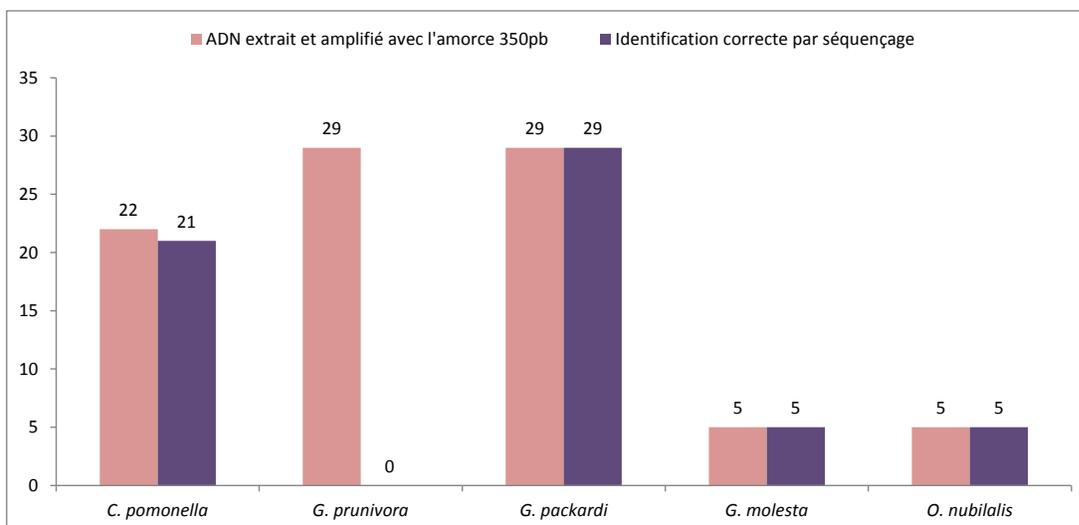






**Figure 16** : Fréquence des pourcentages de divergence des séquences obtenues pour les adultes : a) *M. unipuncta*, b) *A. ipsilon*, c) *H. zea*, d) *O. nubilalis*, e) *S. frugiperda*, f) *C. pomonella*, g) *G. molesta* et h) *G. prunivora*.

Pour certains spécimens pour lesquels les amorces LEP-F1 et LEP-R1 n'ont pas fonctionné, nous avons amplifié l'ADN avec le couple d'amorces LEP-F1 et LEP-R350 (350 pb). Dans le cadre de ces spécimens adultes, nous étions intéressés à savoir si l'interrogation des banque de données ADN fournissaient la bonne identification taxonomique avec une séquence de 350 pb. La figure 17 montre que pour les cinq espèces dont nous avons repris l'amplification de l'ADN déjà extrait avec l'amorce plus courte, nous avons obtenus une très bonne réponse d'identification sauf pour l'espèce *G. prunivora*. Le couple d'amorce LEP-F1 et LEP-R350 est donc une alternative très intéressante dans le cas où le couple LEP-F1 et LEP-R1 ne permet pas d'identifier à l'espèce le spécimen analysé.



**Figure 17 :** Somme des spécimens adultes dont l'ADN a été amplifié avec l'amorce de 350 pb puis correctement identifiés par codage à barres.

### Conclusion

- ✓ 328 spécimens de papillons adultes ont été récoltés dans 11 régions et 8 cultures différentes,
- ✓ 11 espèces ont été échantillonnées,
- ✓ 80,4% des spécimens ont été utilisés pour les analyses génétiques,
- ✓ La fraîcheur du spécimen utilisé pour en extraire l'ADN est un facteur critique pour la réussite de l'identification,
- ✓ Le broyage des pattes des spécimens adultes à l'aide d'un pilon facilite l'obtention d'ADN amplifiable lorsque le traitement de lyse sans broyage avec la Protéinase K échoue,
- ✓ Une fois les amplicons obtenus, le séquençage des amplicons dans les deux sens est à privilégier, puisque la résolution des ambiguïtés dans l'allocation des bases par le séquenceur est alors possible, ce qui améliore de beaucoup l'assignation taxonomique de la séquence obtenue du spécimen analysé,
- ✓ L'utilisation des amorces LEP-F1 et LEP-R350 permet une identification par codage à barres dans plusieurs cas pour lesquels l'amplification initiale LEP-F1/LEP-R1 avait échoué.

## 3.2. Adaptation méthodologique aux stades larvaires

### 3.2.1. Individus d'élevage

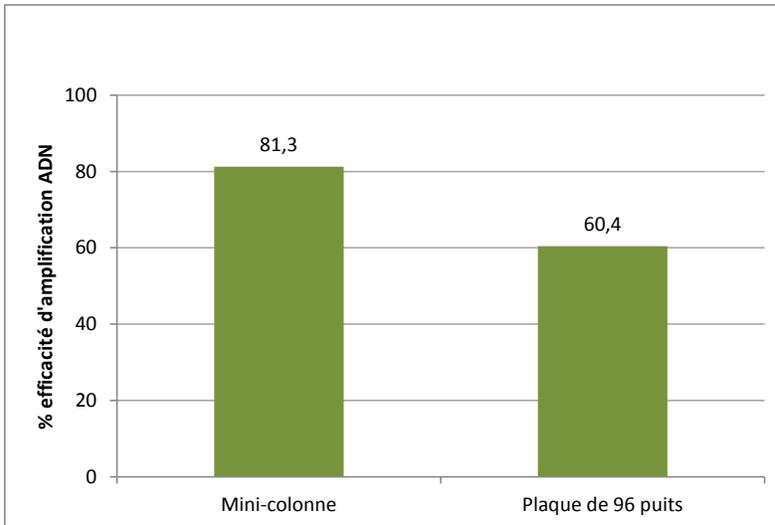
Les adultes F1 et les larves F1 issus de l'élevage en laboratoire de *C. pomonella*, ont été analysés par codage à barres et ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *C. pomonella*. Pour tous les spécimens larvaires obtenus en élevage et sélectionnés, que nous ayons pris la larve complète (L3) ou 2-4 mm<sup>3</sup> de la larve L5, l'extraction d'ADN a été un succès.

**Tableau 3** : Sommaire des informations sur les identifications des spécimens d'élevage par codage à barres.

Spécimens	Nombre	Taille capsule céphalique	Identification <i>C. pomonella</i>
Adultes	2		100%
Larves stade 3	12	0,77 ± 0,15	100%
Larves stade 5	4	1,26 ± 0,26	100%

### 3.2.2. Plaques versus mini-colonnes

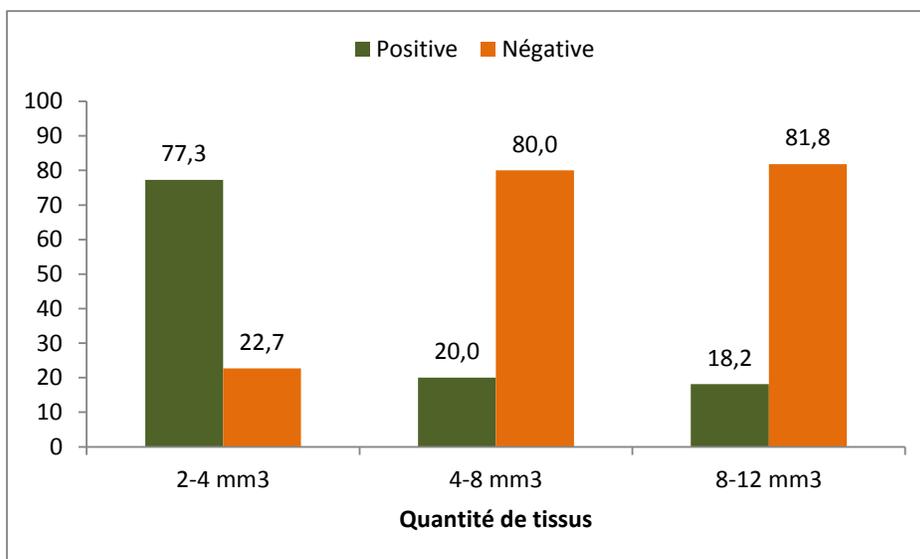
La figure 18 montre que sur 96 échantillons de larves, l'utilisation de pilons et de tubes en mini-colonne permet une meilleure efficacité de l'extraction de l'ADN (81%) que les plaques AcroPrep™ Advance de 96 puits (60%). Le protocole d'extraction des ADN des spécimens d'insectes adultes ou de larves à l'aide d'une simple lyse avec Protéinase K permet de réduire le temps de manipulation requis pour l'extraction d'un très grand nombre d'échantillons (multiples de 96) (Ivanova et al. 2006). Toutefois, nous avons observé deux contraintes majeures à l'efficacité d'extraction des ADN : (1) l'efficacité de l'extraction est très réduite lorsque l'échantillon a été conservé à température de la pièce pendant une période pouvant atteindre 3-4 mois, (2) les vitesses de centrifugation adaptées pour les plaques de 96 puits sont inférieures aux vitesses de centrifugation pour tubes en mini-colonnes, ce qui peut empêcher de bien laver les ADN à extraire, les multiples débris des tissus larvaires peuvent alors obstruer la membrane de fibre de verre rendant ainsi difficile l'élimination des protéines et conséquemment l'élution des acides nucléiques. Le protocole d'extraction des ADN en plaque de 96 puits est vraiment adapté à un emploi lors d'une vaste enquête qui requiert l'échantillonnage de très nombreux spécimens ce qui conduit à rapidement constituer une collection de spécimens. Dans ces conditions, l'extraction de ces échantillons frais se fait sur une courte période de temps. Par contre, lorsque le nombre de spécimen est faible à peu élevé, durant une période prolongée, la constitution d'une collection de spécimens impose des délais avant le traitement des spécimens récoltés. Il est préférable de sacrifier l'économie procurée par le traitement en plaque d'un grand nombre de spécimens, au profit d'un traitement plus rapide de plus petits groupes de spécimens en mini-colonne. Cette dernière solution permet d'extraire des échantillons frais et d'accroître l'efficacité d'extraction des ADN.



**Figure 18** : Comparaison de la réussite de l'amplification en fonction du matériel utilisé pendant l'extraction d'ADN de larve conservées au congélateur.

### 3.2.3. Quantité de tissus à utiliser

La quantité de tissus utilisés influence les résultats de l'extraction des ADN. La figure 19 montre que lorsque 2-4 mm<sup>3</sup> de tissus sont utilisés, les quantités d'ADN extrait génèrent 77,3% d'amplification positives alors que pour les quantités de tissus supérieures à 4 mm<sup>3</sup>, la réussite de l'amplification d'ADN tombe sous 20% car la quantité d'ADN extrait a été moindre. L'obstruction des membranes de silice par de plus grandes quantités de débris de tissus des grosses larves serait la plus plausible explication à la diminution de l'efficacité de l'extraction des ADN. Lors du pipetage du surnageant contenant l'ADN dans les étapes d'extraction, des débris tissulaires, plus abondant lorsque la quantité de tissu est supérieure à 4 mm<sup>3</sup>, sont inévitablement transférés dans le tube de mini-colonne et ils nuisent à l'élimination des protéines lors des étapes de lavage et réduisent l'élution des acides nucléiques liés à la membrane de silice.



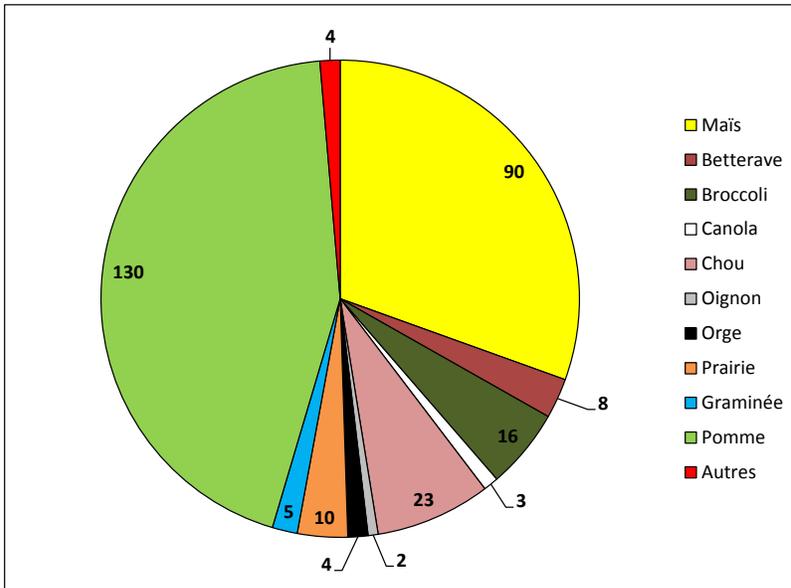
**Figure 19** : Proportion d'amplification d'ADN positive et négative en fonction de la quantité de tissus larvaires utilisés.

### Conclusion

- ✓ *L'utilisation de tube en mini-colonne avec le broyage par pilon est le matériel à privilégier pour extraire l'ADN des spécimens récoltés.*
- ✓ *L'utilisation d'une faible quantité de tissu larvaire de l'ordre de 2 à 4 mm<sup>3</sup> est à privilégier pour augmenter les chances de réussite de l'extraction sur membrane de silice.*

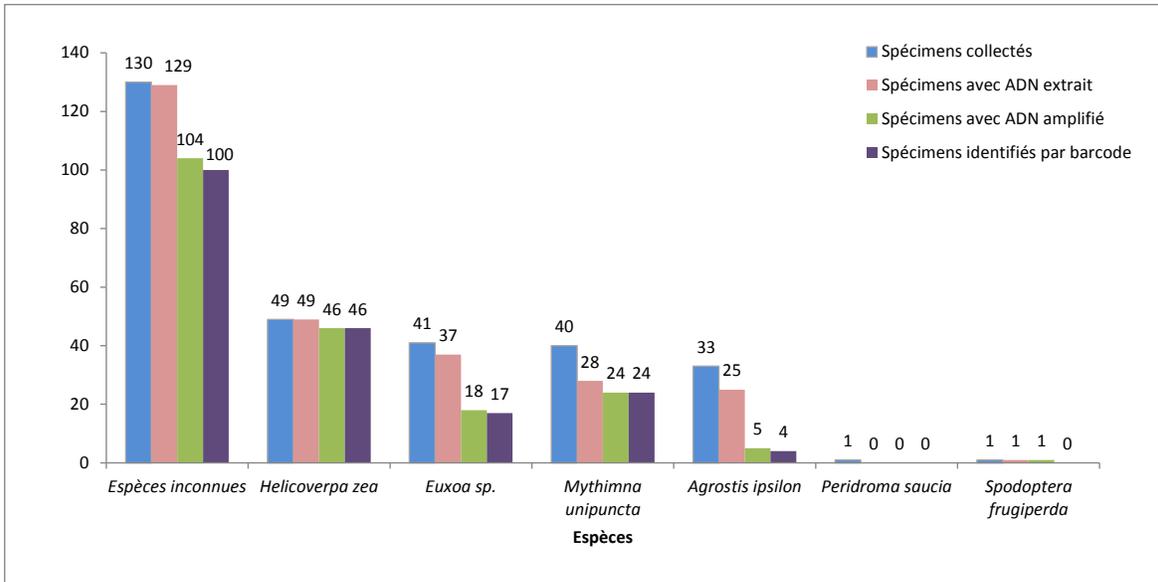
### **3.3. Validation du codage à barre sur les larves de différentes cultures**

Sur les 295 spécimens larvaires récoltés en 2011 et 2012, 130 l'ont été dans la culture de la pomme et 165 l'ont été dans les grandes cultures et cultures maraichères, principalement dans le maïs, chou et brocoli (Fig. 20). La provenance des spécimens larvaires est en concordance avec les ravageurs et cultures visées dans la demande de subvention initialement.



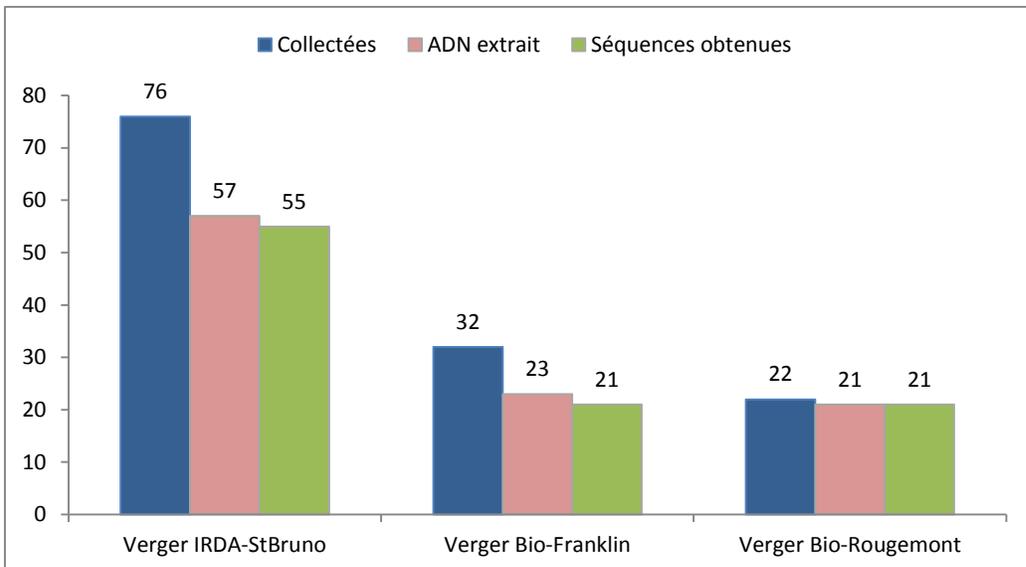
**Figure 20** : Répartition des spécimens larvaires récoltés selon les cultures au Québec.

Parmi les 295 spécimens récoltés, 130 provenant de la pomme n'ont pu être catégorisés selon leurs critères morphologiques, l'identité spécifique des larves ramassées n'a donc pu être pré-établie. Les 165 autres récoltées par le laboratoire de diagnostic en phytoprotection ont été pré-identifiées selon les critères taxonomiques disponibles (Fig. 21), certains spécimens du genre *Euxoa* sp. étaient particulièrement difficile à identifier au niveau de l'espèce. Considérant les ressources financières du projet, 269 échantillons larvaires ont pu être analysés, soit 91%. La figure 21 montre en résumé que sur 265 spécimens larvaires utilisés, 198 ont eu leur ADN correctement amplifié (73% de réussite) et 191 spécimens de ces 198 ont été correctement séquencés et identifiés par codage à barres (96% de réussite). Cela démontre encore que l'extraction de l'ADN est l'étape sensible de la technique alors que le séquençage et l'assignation taxonomique montrent un très haut taux de réussite.



**Figure 21** : Nombre de spécimens larvaires récoltés et « pré-identifié ».

La figure 22 détaille le nombre de spécimens larvaires issus de vergers dont l'ADN a été correctement amplifiés et le nombre de spécimens dont nous avons obtenus une identification via l'interrogation de la base de données du NCBI. Parmi ces trois vergers, sur les 96 larves ayant obtenues une séquence, 98,9% ont été identifiées comme du carpocapse de la pomme (Tableau 4). Un seul spécimen larvaire de tordeuse orientale du pêcher a été capturé dans le verger biologique de Rougemont. Cette espèce exotique a déjà été répertoriée initialement en Montérégie-est à l'aide de piège à phéromone (Bellerose et al. 2007). La technique d'identification du codage à barres a donc permis l'identification d'une espèce exotique qui n'aurait pas été possible juste par l'observation de la larve dans le fruit.

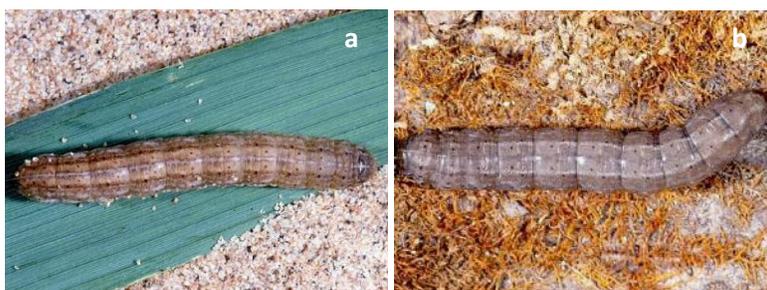


**Figure 22** : Somme des spécimens larvaires collectés dans les pommes, avec ADN extrait, amplifié et séquencé.

**Tableau 4** : Identification taxonomique par codage à barres de larves collectées dans trois vergers en 2012.

	<i>Cydia pomonella</i>	<i>Grapholita prunivora</i>	<i>Grapholita molesta</i>
Verger IRDA-St-Bruno	55	-	-
Verger Bio-Franklin	21	-	-
Verger Bio-Rougemont	20	-	1
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>0</b>	<b>1</b>

Nous avons récoltés 41 spécimens pré-identifiés comme *Euxoa sp.* Il existe plusieurs espèces de ce genre de ver-gris, elles sont toutes polyphages et peuvent infester divers types de cultures maraichères et fruitières. Les larves s’observent de la mi-mai au début juillet selon l’espèce et la culture infestée. La couleur des larves varie selon l’espèce, de gris-brun à gris-blanc avec ou non une bande dorsale de couleur brun rougeâtre translucide (Iriisphytoprotection 2013; Jean et Boisclair 2009). Parmi les 41 spécimens collectés, 18 ont été analysés jusqu’au séquençage et à l’interrogation des bases de données (Fig. 21). Parmi eux 17 spécimens ont pu être identifiés à l’espèce. La majorité appartenant à l’espèce *E. messoria* (Fig. 23.a) et deux autres larves appartenait à l’espèce *E. tessellata* et *A. venerabilis* (Fig. 23.b) (Tableau 5).



**Figure 23** : Photo d’une larve de a) *E. messoria* et b) *A. venerabilis*

**Tableau 5** : Identification taxonomique par codage à barres de larves collectées et pré-identifiées comme *Euxoa sp.*

Culture	<i>Euxoa tessellata</i>	<i>Euxoa messoria</i>	<i>Agrotis venerabilis</i>
Chou	1	2	-
Brocoli	-	12	-
Maïs	-	1	1

Pour les autres spécimens larvaires récoltés, pré-identifiés et dont des amplicons ont été obtenus après extraction et amplification de l’ADN (*H. zea*, *M. unipuncta* et *A. ipsilon*), le résultat de l’interrogation des bases de données ADN a montré que l’identification taxonomique était conforme à la pré-identification réalisée par le laboratoire de diagnostic en phytoprotection.

## Conclusion

- ✓ *L'extraction d'ADN est une étape critique pour le succès de l'utilisation de la technique de codage à barres pour les larves également.*
- ✓ *Les larves de lépidoptères internes à la pomme récoltées en 2012 étaient à 98,9% toutes des larves de carpocapse de la pomme.*
- ✓ *Les larves de ver-gris pré-identifiées comme *Euxoa* sp. ont été identifiées comme trois espèces : *E. messoria*, *E. tessellata* et *A. venerabilis*.*

## **4. Conclusion générale et protocole final d'identification par codage à barres**

Les résultats présentés dans ce rapport montrent que la technique d'identification par codage à barre peut être mise en application mais nécessite certaines précautions énoncées ci-dessous :

- ✓ Les spécimens récoltés doivent être bien conservés et le plus frais possible.
- ✓ L'ADN de ces spécimens doit être extrait le plus rapidement possible et être conservé au congélateur.
- ✓ Si les spécimens ne peuvent être analysés tout de suite, ils doivent être congelés le plus rapidement possible, en morceaux prêts à l'emploi du protocole d'extraction pour ensuite être analysés plus tard.
- ✓ L'assèchement des spécimens doit être évité au maximum lors de leur conservation.
- ✓ L'utilisation pilon de plastique pour le broyage des tissus augmente grandement l'efficacité d'extraction des ADN lorsque des tubes mini-colonne avec membrane de silice sont utilisés comparativement à des plaques AcroPrep™ Advance de 96 puits avec membrane de fibre de verre.
- ✓ La quantité de tissus larvaires optimale à utiliser est de 2 à 4 mm<sup>3</sup>.

La méthode d'Ivanova et al. (2006) avec l'utilisation de plaques AcroPrep™ Advance de 96 puits (section 2.1.2.1.1) est donc une méthode économique lorsque des quantités élevées de spécimens frais doivent être traitées. Dans le cadre des travaux habituels d'identification des larves de lépidoptères au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ et au laboratoire PFI de l'IRDA, compte-tenu du volume des spécimens piégés sur une période relativement longue, il est préférable d'extraire plus rapidement de plus petits nombre de spécimens à l'aide de tubes micro-colonne que d'attendre d'en avoir collectionné un grand nombre.

Nous recommandons l'utilisation de la méthode d'extraction des ADN avec l'aide de pilons de plastique et de tubes mini-colonne pour traiter rapidement des quantités plus limitées de tissus d'insectes qui seront alors plus frais. Le protocole complet d'extraction des ADN est décrit à la section 2.2.2 et le protocole d'amplification PCR est décrit à la section 2.1.2.2.

## Remerciements

Nous tenons à remercier Olivier Ariel, Stefano Campagnero, Edith Plante, Alessandro Dieni, Joseph Moisan-De Serres et de nombreux conseillers agronomes pour leurs contributions à cette étude. Les auteurs remercient le programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec pour leur soutien financier.

## Références

- Agnello, A. et al. 2006. Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service (NRAES). Ithaca, NY, USA. 238p.
- Armstrong, K.F. 2010. DNA barcoding: a new module in New Zealand's plant biosecurity diagnostic toolbox. EPPO. 40: 91-100.
- Ball, S.L. et K.F. Armstrong. 2006. DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). Can. J. Forest Res. 36: 337–350.
- Barcenas, N.M. et al. 2005. DNA diagnostics to identify internal feeders (Lepidoptera : Tortricidae) of pome fruits of quarantine importance. J. Econ. Entomol. 98: 299-306.
- Bellerose, S. et al. 2010. Rapport d'activités du Réseau-pommier - Protection des vergers 2009. IRDA.
- Bellerose, S. et al. 2007. Occurrence of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in major apple-growing areas of southern Quebec. Can. Entomol. 139: 292-295.
- Capinera, J.L. 2008. Encyclopedia of Entomology - Second Edition. Springer, Germany. 4346p.
- Caterino, M.S. et al. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annu. Rev. Entomol. 45: 1-54.
- Chambon, J.-P. 1999. Atlas des Genitalia mâles des lépidoptères Tortricidae de France et Belgique. Éds INRA. Paris, France. 400 p.
- Chapman, P.J. et D.F. Lienk. 1971. Tortricid fauna of apple in New York (Lepidoptera :Tortricidae) New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, New York. 122p.
- Chaput, J. 2000. Lutte contre les vers-gris dans les cultures légumières. Fiche technique du Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales de l'Ontario, imprimeur de la Reine, <http://www.omafr.gov.on.ca/french/crops/facts/00-056.htm>
- Chouinard, G. et al. 2000. Guide d'identification des ravageurs du pommier et de leurs ennemis naturels. Conseil des productions végétales du Québec inc. Québec, Canada. 69p.
- de Waard, J.R. et al. 2009. In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. Biodivers. Conserv. 18: 3825-3839.
- Emery, V.J. et al. 2009. Combining DNA barcoding and morphological analysis to identify specialist floral parasites (Lepidoptera: Coleophoridae: Momphinae: Mompha). Mol. Ecol. Res. 9: 217-223.
- Floyd, R. et al. 2010. Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. Biol. Invasions 12: 2947-2954.
- Hajibabaei, M. et al. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. Phil. Trans. Royal Soc. London. Series B, Biological Science 360: 1959–1967.

- Hebert, P.D.N. et al. 2009. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol. Lett.* doi:10.1098/rsbl.2009.0848.
- Heinrich, C. 1926. Revision of the North American Moths of the Subfamilies Laspeyresinae and Olethreutinae. United States National Museum Bulletin 132. 216 p.
- Iriisphytoprotection. 2013. Fiche technique – Ver-gris tacheté. Publication du CRAAQ. <http://www.iriisphytoprotection.gc.ca/Prive/Recherche/FicheInsecte2.aspx?ID=3302&TI=S>
- Ivanova, N.V. et al. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Mol. Ecol. Notes* 6:998-1002.
- Jean, C. et J. Boisclair. 2009. Institut de recherche et de développement en agroenvironnement inc. Québec, Canada. 88 p.  
[http://www.agrireseau.gc.ca/agriculturebiologique/documents/Guide\\_complet\\_P.pdf](http://www.agrireseau.gc.ca/agriculturebiologique/documents/Guide_complet_P.pdf)
- Labrie, G. et L. Voynaud. 2012. Guide sur les ravageurs de sol en grandes cultures. CÉROM – Centre de recherche sur les grains inc., Saint-Mathieu-de-Beloeil, QC, 78 p.
- Légaré, J.-P. et al. 2013. La légionnaire uniponctué. Publication du laboratoire du diagnostic. <http://www.agrireseau.gc.ca/Rap/documents/a40gc13.pdf>
- Mackay, M.R. 1959. Larvae of the North American Olethreutidae (Lepidoptera). *Can. Entomol.* 338 p.
- Maund, C. 2002. Légionnaire uniponctué, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth), Frédéricton, Nouveau-Brunswick, <https://www.gnb.ca/0057/legionnaire.pdf>
- Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales de l'Ontario. 2009. Légionnaire d'automne. Imprimeur de la Reine pour l'Ontario. 5 p.  
<http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/french/sweet-corn/insects/fall-armyworm.html>
- Ratnasingham, S. et P.D.N. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System *Molecul. Ecol. Notes* 7: 355-364.
- Shel'Deshova, G.G. 1967. Ecological factors determining distribution of Codling moth *Laspeyresia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) in the Northern and Southern hemisphere. *Entomol. Review.* 46: 349-361.
- Sony, S. et al. 2009. Diagnostic molecular markers of six lepidopteran insect pests infesting apples in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 12 : 107-111.
- Stehr, F.W. 1987. Immature insects. Volume 1. Kendall-Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa, 754 p.
- Strutzenberger, P. et al. 2011. DNA barcoding-based species delimitation increases species count of Eois (Geometridae) moths in a well-studied tropical mountain forest by up to 50%. *Insect Sci.* 18: 349-362.
- Timm, A.E. et al. 2008. Morphological and molecular identification of economically important Tortricidae (Lepidoptera) on deciduous fruit tree crops in South Africa. *Afr. Entomol.* 16: 209-219.
- van der Geest, L.P.S et H.H. Evenhuis. 1991. Tortricid pests their biology, natural enemies and control. Elsevier, Amsterdam, 808 p.
- Vanoosthuysse, F. et al. 2010. Mieux prédire pour mieux prévenir : les « à cotés » d'une validation, pp. 50-59. 18es Journées annuelles sur la recherche et l'innovation technologique, Jouvence, Qc. 26-27 jan.

## Annexe 1

### Liste des solutions pour l'extraction des ADN

#### Solutions mères

NaCl à 500 mM	1,46 g dans 50 mL d'H <sub>2</sub> O stérile
Tris-HCl à 200mM pH 8,0	1,21 g dans 50 mL d'H <sub>2</sub> O stérile
EDTA à 200mM pH 8,0	3,72 g dans 50 mL d'H <sub>2</sub> O stérile

#### Solution de travail (50 mL)

##### Tampon de broyage

NaCl à 100 mM	10,0 mL de la solution mère
Tris-HCl à 50 mM	12,5 mL de la solution mère
EDTA à 10 mM	2,5 mL de la solution mère
SDS à 0,5% (p/v)	0,25g
H <sub>2</sub> O stérile	compléter à 50 mL

##### Tampon de lyse

GuHCl à 6 M	28,66g dissoudre dans 20 mL H <sub>2</sub> O stérile
Tris-HCl à 10 mM pH 8,0	2,5 mL de la solution mère
EDTA à 20 mM pH 8,0	5,0 mL de la solution mère
Triton X-100 à 4,0 % (v/v)	2,0 mL
H <sub>2</sub> O stérile	compléter à 50 mL

##### Mélange de fixation

Ethanol à 96 %	25 mL
Tampon de lyse	25 mL
Utilisation à 56°C.	

##### Tampon de lavage 1

Ethanol à 96 %	35 mL
Tampon de lyse	13 mL
H <sub>2</sub> O stérile	compléter à 50 mL
Utilisation à température pièce.	

##### Tampon de lavage 2

Ethanol à 96 %	30 mL
----------------	-------

NaCl à 50 mM	5,00 mL de la solution mère
Tris-HCl à 10 mM pH 8,0	2,50 mL de la solution mère
EDTA à 0,5 mM pH 8,0	0,13 mL de la solution mère
H <sub>2</sub> O stérile	compléter à 50 mL

Utilisation à température pièce.

#### *Tampon d'élution*

Tris-HCl 10 mM pH 8,0	2,5 mL de la solution mère
H <sub>2</sub> O stérile	compléter à 50 mL

Utilisation à 56°C. H<sub>2</sub>O stérile 12,4 mL

Utilisation à température pièce.

#### *Tampon d'élution*

Tris-HCl 10 mM	2,5 mL
H <sub>2</sub> O stérile	47,5 mL

Utilisation à 56°C.

## Annexe 2

### Documents de transfert

# Le codage à barres ADN : un outil novateur pour l'identification des lépidoptères ravageurs des cultures

Annabelle Firløj<sup>1</sup>, Mario Fréchet<sup>2</sup>, Michèle Roy<sup>2</sup>, Jean-François Landry<sup>3</sup>, Richard Hogue<sup>1</sup>, Gérald Chouinard<sup>1</sup> et Daniel Cormier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de recherche et de développement en agroenvironnement; <sup>2</sup> Laboratoire de diagnostic du MAPAQ; <sup>3</sup> Agriculture et Agroalimentaire Canada.

#### Introduction

Les principaux lépidoptères ravageurs des cultures appartiennent aux familles des Tortricidae et Noctuidae et leur identification est primordiale pour mettre en place des méthodes de dépistage et de lutte pour limiter leurs dégâts dans les cultures. Comme certaines espèces se trouvent en même temps dans la même culture, l'identification de leurs stades larvaires nécessite alors souvent une mise en élevage des larves récoltées, quand l'identification taxonomique visuelle est impossible. Le codage à barres ADN est un outil moléculaire de pointe qui permettrait d'identifier avec précision, les spécimens larvaires récoltés, dans un court laps de temps et sans passer par la mise en élevage. La méthode repose sur l'amplification PCR d'un marqueur moléculaire dont la séquence spécifique aux lépidoptères a une longueur de 648 paires de bases (pb) portées par le gène du cytochrome c oxydase unité I (COI). Ce projet vise donc à valider la méthode de codage à barres ADN pour l'identification des larves de lépidoptères avec pour étapes 1) en 2011 d'établir des spécimens de références de papillons adultes dans la bibliothèque du «Barcode of Life Data Systems» (BOLD) et 2) en 2012 de valider la technique sur 500 larves récoltées dans les cultures du Québec.

#### Matériels et méthodes

Sept espèces de lépidoptères ont été ciblées et collectées en 2011 durant toute la saison estivale, dans différentes cultures à l'aide de pièges à phéromone. L'objectif était de capturer au moins 10 spécimens par espèce dans 5-6 régions réparties dans tout le Québec. Ceci afin d'obtenir le codage à barres ADN pour chaque spécimen et ainsi déterminer l'ampleur de la variation génétique au sein des populations naturelles (normalement < 2%).



La lépidoptère unipuncta (*Mythimna unipuncta* (Haworth))    Le ver gris-rose (*Agrotis ipsilon* Hubert)    Le ver de l'igu (*Helioverpa zea* Dübeld)    La lépidoptère d'automne (*Spodoptera frugiperda* L.E. Smith)

#### Et dans la



La caracasse de la pomme (*Carya pomonella* G.)    Le petit carpocapse de la pomme (*Grapholita prunivora* (Haworth))    La tordeuse orientale du pichet (*Grapholita molesta* (Busck))

#### Résultats

Tous les spécimens retenus pour le projet ont été sommairement identifiés, épinglés, géo-référencés, photographiés et conservés dans des boîtes entomologiques. 276 spécimens parmi les sept espèces ont été capturés dans 14 régions du Québec (Tableau 1). Cependant, seuls 267 spécimens seront référencés dans la bibliothèque du BOLD et un nouvel échantillonnage sera réalisé en 2012 pour compléter les spécimens manquants dans certaines régions.

Tableau 1: Nombre de spécimens capturés par espèce et par région.

RÉGIONS	<i>Mythimna unipuncta</i>	<i>Agrotis ipsilon</i>	<i>Helioverpa zea</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Carpocapsa pomonella</i>	<i>Grapholita prunivora</i>	<i>Grapholita molesta</i>
Capitale-Nationale	3	0	0	0	10	10	0
Chaudières-Appalaches	10	11	0	1	0	0	0
Gaspésie	11	0	5	0	0	0	0
Abitibi-Témiscamingue	9	0	0	0	0	0	0
Saguenay-Lac-St-Jean	11	0	0	0	0	0	0
Laurentides	10	11	0	1	0	0	0
Outaouais	11	9	0	0	0	0	0
Centre-du-Québec	0	0	0	5	0	0	0
Oka-Deux Montagnes	0	0	0	0	10	0	0
Laval	0	0	1	0	0	0	0
Montérégie Est	12	11	4	0	10	10	10
Montérégie-Ouest	0	10	0	0	10	10	11
Estrie	0	10	0	0	10	10	0
Brême-Missisquoi	0	0	0	0	10	10	0

#### Perspectives

Une à deux pattes de chaque spécimen adulte ont été collectées et leur ADN sera extrait et amplifié par PCR avec une paire d'amorce COI LEP F1 (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATTGG-3') et COI LEP R1 (5' TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA-3'), selon les conditions d'amplification décrites par de Waard et al. (2009). Les produits d'amplification seront analysés par une électrophorèse en gel d'agarose pour détecter le fragment attendu de 648 pb. Les fragments amplifiés seront ensuite séquencés et les séquences obtenues seront éditées et alignées avant d'être incluses dans le catalogue de séquences du BOLD.

En 2012, 500 larves de lépidoptères seront échantillonnées dans les cultures du Québec durant la saison et sur lesquelles seront validées la technique de codage à barres ADN.

Cette technique permettra, entre autre au laboratoire de diagnostic du MAPAQ, de disposer d'un outil d'identification taxonomique de pointe pour fournir un service rapide et de qualité. Cet outil permettra de déterminer les distributions géographiques des espèces de papillons ravageurs et leur progression mais aussi la détection de nouvelles espèces exotiques.

#### Remerciements

Nous remercions les agronomes de clubs-conseils et les conseillers agricoles du MAPAQ pour la collecte des spécimens ainsi qu'Olivier Ariel et Annie Girard pour l'épandage des spécimens. Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, et Agriculture et Agroalimentaire Canada.

#### Références

De Waard et al. 2009. In the dark in a large urban park : DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. *Biodivers. Conserv.* 18: 3825-3839.



Agriculture et Agroalimentaire Canada

Agriculture and Agri-Food Canada



# DNA barcoding: an innovative tool to identify internal lepidoptera in apples

A. Firlej<sup>1</sup>, J.-P. Légaré<sup>2</sup>, J.-F. Landry<sup>3</sup>, R. Hogue<sup>1</sup>, G. Chouinard<sup>1</sup> et D. Cormier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research and Development Institute for the Agri-Environment; <sup>2</sup> Quebec Department of Agriculture, Fisheries and Food; <sup>3</sup> Agriculture and Agri-Food Canada.

## Introduction

Identification of internal lepidopteran pests of apple can be problematic due to their similar taxonomic characteristics. In Quebec, codling moth (*Cydia pomonella* (L.)), lesser appleworm (*Grapholita prunivora* (Walsh)) and oriental fruit moth (*Grapholita molesta* (Busck)) can be present together in orchard during the season. Larvae of *C. pomonella* can be distinguished from other Tortricidae by its large size and absence of anal comb, but other species possess an anal comb and can have a similar number of crochets on ventral and anal prolegs (1). We are adapting a method of DNA barcoding developed for animal biodiversity identification (2) to identify larvae of internal apple lepidopteran pests. This molecular method uses amplification of DNA and polymerase chain reaction (PCR) with two primers of 658bp-length specific to genes held by cytochrome oxidase unit I of lepidopterans.

This project has two objectives: a) determine DNA barcode variation within adults of *C. pomonella*, *G. prunivora* and *G. molesta* encountered in different regions from Quebec and b) validate the barcoding identification technique on larvae collected in three apple orchards.

## Material and methods

### Adults sampling

Adults of *C. pomonella*, *G. prunivora* and *G. molesta* were collected during the summer of 2011 by using pheromone traps in 14 apple orchards of Quebec, Canada. The target was to obtain 10 specimens by species from six regions to determine variation in DNA barcode sequences (<2% required). Collected specimens were labeled, photographed, mounted and their geographical data recorded.



### Larvae sampling

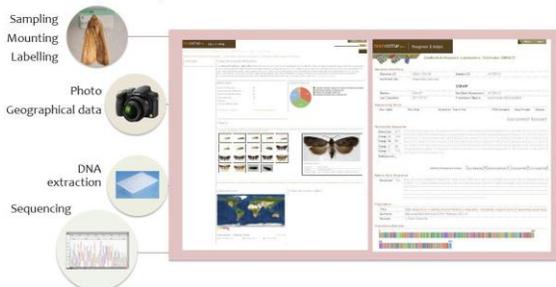
Apples were collected in 2012 in three organic apple orchards from the Monteregian region of Quebec, Canada. Larvae found in apples were extracted, labeled, categorized according to size (small, medium or large) and kept in a 1.5 mL tube (Eppendorf) at -14°C. Sampled orchards were known to have populations of at least *C. pomonella* and *G. prunivora*.

### Acknowledgments

We thank agronomists for the collect of adult specimens, O. Ariel for mounting specimens and T. Jeanne for sequence analysis. This work was supported by the Growing Forward agreement from Quebec Department of Agriculture, Fisheries and Food.

## DNA barcode analysis

Following previously published protocols (3 & 4), DNA from one or two legs of each adult specimen was extracted on minicolumn in individual tubes or plate of 96-tubes and DNA was amplified by PCR with the primers COI LEP F1 (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3'), COI LEP R1 (5'-TAAACTTCTGGATGCCAAAAATCA-3') and COI LEP R350 (5'-CTTATATTATTATTCTGGGAAAGC-3') specific to all Lepidoptera species. After visualization of PCR-products on agarose gel and sequencing, tentative identification was obtained from the online BOLD (Barcode of Life Data Systems) identification systems taxon search (5). For larval specimens, molecular analysis was realized with different sample of frozen tissue (2-4 mm<sup>3</sup> or 4-6 mm<sup>3</sup>).



## Results and conclusion

### Adults sampling

In 2011, we collected 140 specimens of the three species in six regions from Quebec. The first attempt at barcoding adults was unsuccessful because using one leg for DNA extraction with Proteinase K lysis buffer showed very low efficiency of DNA extraction. Protocol was modified and new attempts were made using two legs and/or abdomen of adults and by using pestles (manual grinding) with Guanidine (GuHCl) lysis buffer. This method showed more promising results and is still under development.

### Larvae sampling

In 2012, 130 larvae were collected in three orchards from Monteregian region. First attempt at obtaining PCR-products with *C. pomonella* larvae lab-reared showed positive results when using manual grinding (pestles) with GuHCl lysis buffer. An assay with different amounts of frozen larvae was also performed and 2-4 mm<sup>3</sup> of frozen tissue gave the best DNA extraction result.

### References

- (1) Chapman, P.J. and S.F. Lienk. 1971. Tortricid fauna of apple in New York (Lepidoptera : Tortricidae).
- (2) Ratnasingham, S. and P.D.N. Hebert. 2007. Ecol. Notes 7: 355-364.
- (3) Ivanova, N.V. et al. 2006. Mol. Ecol. Notes 6: 998-1002.
- (4) de Waard, J.R. et al. 2009. Biodivers. Conserv. 18: 3825-3839.
- (5) <http://lepbarcoding.org/organization.php>

## DNA barcoding: an innovative tool to identify internal lepidopterans in apples

Annabelle Firlej<sup>1</sup>, Jean-Philippe L egar e<sup>2</sup>, Jean-François Landry<sup>3</sup>, Richard Hogue<sup>1</sup>,  
G erald Chouinard<sup>1</sup>, Daniel Cormier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de recherche et de développement en agro-environnement, 335 chemin des 25 Est, Saint-Bruno-de-Montarville (Québec) J3V 0G7, Canada; <sup>2</sup>Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, 2700 rue Einstein, Québec (Québec) G1P 3W8, Canada; <sup>3</sup>Agriculture et Agroalimentaire Canada, 960 avenue Carling, Ottawa (Ontario) K1A 0C6, Canada

**Abstract:** The identification of Lepidoptera larvae can be problematic when different species occur at the same time in crops and when their identification requires dissection or laboratory rearing. In Quebec, this is the case for three Tortricidae that feed synchronously in apples: the codling moth [*Cydia pomonella* (L.)], the lesser appleworm [*Grapholita prunivora* (Walsh)] and the oriental fruit moth [*Grapholita molesta* (Busck)]. Codling moth larvae can usually be distinguished from the two other species by their larger size and the absence of anal comb, but larvae of the lesser appleworm and oriental fruit moth are nearly indistinguishable.

The objective of our study is to validate DNA barcoding as a method for identifying major lepidopteran larval pest insects occurring in apple orchards in Quebec. This molecular method uses primers common to all Lepidoptera that target a 658 bp gene fragment coding for cytochrome oxidase I, which are specific to each lepidopteran species. 140 adult moths of the three species were collected in 2011 from six apple-producing regions in Quebec to establish a DNA sequence library that would be included in the "Barcode of Life Data Systems". Lepidoptera larvae were sampled in the 2012 summer season in orchards of Quebec to assess the effectiveness of the molecular method for larval identification. When validated, this method will become a useful identification tool for laboratories specialized in plant pest identification.

**Key words:** barcoding, Lepidoptera, taxonomic tool

### Introduction

Identification of internal lepidopteran pests of apple can be problematic due to their similar morphological characteristics. In Quebec, three species of Tortricidae can occur simultaneously in orchards during the fruit-growing season: the codling moth [*Cydia pomonella* (L.)], the lesser appleworm [*Grapholita prunivora* (Walsh)], and the oriental fruit moth [*Grapholita molesta* (Busck)]. Larvae of *C. pomonella* can be distinguished from the other two species by their larger size and absence of anal comb, but the other two possess an anal comb and can have a similar number of crochets on the ventral and anal prolegs (Chapman & Lienk, 1971). We are adapting the method of DNA barcoding developed for animal biodiversity identification (Ratnasingham & Hebert, 2007) to identify larvae of internal apple lepidopteran pests. This method uses a 658 base-pair segment of the 5' end of the mitochondrial cytochrome c oxidase gene as a standardized genome region useful for species identification and delineation.

This project has two objectives: 1) to determine DNA barcode variation within adults of *C. pomonella*, *G. prunivora* and *G. molesta* encountered in different regions of Quebec; and

2) to validate DNA-based identifications of larvae from different apple orchards by comparing them with those obtained from adult moths .

## Material and methods

### *Adult sampling*

Adults of *C. pomonella*, *G. prunivora* and *G. molesta* were collected during the summer of 2011 in pheromone traps deployed in 14 apple orchards of Quebec, Canada. To determine variation in DNA barcode sequences, we targeted to obtain 10 specimens of the three species from six regions where these species are presents. Collected specimens were labelled, photographed, mounted and their geo-referenced data recorded. Morphological identification was performed by the diagnostic laboratory at the Quebec Department of Agriculture, Fisheries and Food, and confirmed by Lepidoptera taxonomists from the Canadian National Collection of Insects at Agriculture and Agri-Food Canada.

### *Larvae sampling*

Apples were collected in 2012 in three organic apple orchards from the Montereian region of Quebec, Canada. Larvae found in apples were extracted, labelled, categorized according to size (small, medium, or large) and kept in a 1.5 ml tube (Eppendorf) at -14 °C. Sampled orchards were known to have populations of at least *C. pomonella* and *G. prunivora*.

### *DNA barcode analysis*

Following previously published protocols (Ivanova *et al.* 2006; de Waard *et al.* 2009), DNA from one or two legs of each adult specimen was extracted on mini-column in individual tubes or plate of 96-tubes and DNA was amplified by PCR with the primers COI LEP F1 (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3'), COI LEP R1 (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA-3') and COI LEP R350 (5'-CTTATATTATTTATTCGTGGGAAAGC-3') which are universal for Lepidoptera species. After visualization of the PCR-products on agarose gel, they were purified and sequenced. Putative identification was obtained from the online BOLD (Barcode of Life Data Systems) identification systems taxon search (<http://lepbarcoding.org/organization.php>). For larval specimens, molecular analysis was performed from samples of frozen tissues (2-4 mm<sup>3</sup> or 4-6 mm<sup>3</sup>).

## Results and discussion

### *Adult sampling*

In 2011, 140 specimens representing all three species were collected from the sampled orchards. The first attempt at barcoding adults was unsuccessful because using one leg for the DNA extraction process with Proteinase K lysis buffer resulted in very low efficiency of DNA extraction. The protocol was modified and new attempts were made using two legs and/or abdomen of adults and by using pestles (manual grinding) with Guanidine (GuHCl) lysis buffer. This method showed more promising results and is still under development.

### *Larvae sampling*

A total of 130 larvae were collected in three orchards from the Montereian region. The first attempt at obtaining PCR-products with *C. pomonella* larvae lab-reared showed positive results when using manual grinding (pestles) with GuHCl lysis buffer. An assay with different

amounts of frozen larvae was also performed and 2-4 mm<sup>3</sup> of frozen tissue gave the best DNA extraction result. Even if it is more time-consuming, the utilization of mini-columns to extract larval DNA is better than using plates of 96-wells, because, in the later case the accumulation of tissue under the silica membrane disrupt washing and elution efficiency and resulted in low DNA recovery. A method of molecular identification for major lepidopteran larval pests in apple orchard will be available soon.

### **Acknowledgements**

We thank the agronomists who collected adult moths, O. Ariel for mounting specimens, and T. Jeanne for sequence analysis. This work was supported by the Growing Forward program from the Quebec Department of Agriculture, Fisheries and Food.

### **References**

- Chapman, P. J. & Lienk. S. F. 1971: Tortricid fauna of apple in New York (Lepidoptera: Tortricidae) New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, New York, 122 pp.
- deWaard, J. R., Landry, J.-F., Schmidt, B. C., Derhousoff, J., McLean, J. A. & Humble, L. M. 2009: In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. *Biodiv. Conserv.* 18: 3825-3839.
- Ivanova, N. V., deWaard, J. R., & Hebert, P. D. N. 2006: An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Mol. Ecol. Notes* 6: 998-1002.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2007: BOLD: The Barcode of Life Data System *Molecul. Ecol. Notes* 7: 355-364.



## Identification des principaux lépidoptères ravageurs du maïs sucré

Rencontre du groupe RAP Maïs sucré, 3 avril 2013

Jean-Philippe Légaré, M. Sc., biologiste-entomologiste, Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ

Agriculture, Pêcheries  
et Alimentation

Québec 



### Le projet codage à barres

*Collaboration IRDA – Direction de la phytoprotection*

#### Acteurs :

- Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA)
- Laboratoire de diagnostic en phytoprotection – MAPAQ
- Conseillers sur le terrain

#### Problématique :

- Ressemblances importantes entre les stades larvaires d'espèces de papillons ravageurs appartenant aux familles des Tortricidae et Noctuidae
- Augmentation des délais de diagnostic dû à l'élevage des spécimens

#### Objectifs :

- Développer un outil moléculaire pour l'identification des lépidoptères ravageurs des cultures
- Utilisation du profil génétique pour l'identification des larves
- Diagnostic rapide, précis et permettant une intervention immédiate limitant les dommages aux champs



Laboratoire de diagnostic  
en phytoprotection





# Le projet codage à barres

Collaboration IRDA – Direction de la phytoprotection

## Implication de l'IRDA

- Collecte de 95 spécimens adultes de référence d'espèces ciblées provenant de 6 régions agricoles
- Collecte de 130 spécimens de larves appartenant aux mêmes espèces
- Mise au point de la méthode de biologie moléculaire

Espèce	Nom commun
<i>Cydia pomonella</i>	Carpocapse de la pomme
<i>Grapholita molesta</i>	Tordeuse orientale du pêcher
<i>Grapholita prunivora</i>	Petit carpodapse de la pomme



Laboratoire de diagnostic en phytoprotection



# Le projet codage à barres

Collaboration IRDA – Direction de la phytoprotection

## Implication du laboratoire (étés 2011 et 2012)

- Collecte de 167 spécimens adultes de référence d'espèces ciblées provenant de 13 régions agricoles
- Collecte de 164 spécimens de larves appartenant aux mêmes espèces

Espèce	Nom commun
<i>Mythimna unipuncta</i>	La légionnaire uniponctué
<i>Agrotis ipsilon</i>	Le ver-gris noir
<i>Helicoverpa zea</i>	Le ver de l'épi
<i>Spodoptera frugiperda</i>	La légionnaire d'automne
<i>Paralobesia viteana</i>	La tordeuse de la vigne
<i>Episimus argutanus</i>	n/a
<i>Noctua pronuba</i>	La Fiancée
<i>Xestia c-nigrum</i>	Le ver-gris tacheté



Laboratoire de diagnostic en phytoprotection



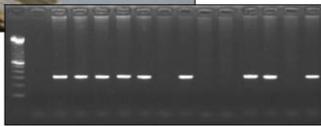
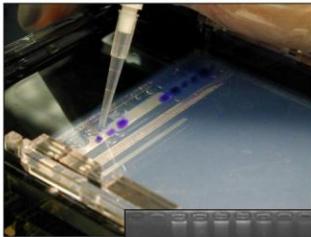


## Le projet codage à barres

Collaboration IRDA – Direction de la phytoprotection

### Résultats

- La méthode d'identification par PCR est une avenue prometteuse
- L'importance de la conservation des spécimens
- Formation de l'équipe du laboratoire à l'automne 2013
- Regarder les étapes subséquentes



Laboratoire de diagnostic  
en phytoprotection



## Références

- Buntin D. *et al.* (Eds.) (1999). *Handbook of small grain insects*. Entomological Society of America, Lanham, USA, 120 pp.
- Capinera J. L. (2001). *Handbook of vegetable pests*. Academic press, New York, New York, 729 pp.
- Jean C. & Boisclair J. (2009). *Les insectes nuisibles et utiles du maïs sucré: mieux les connaître*. IRDA, Québec, 88 pp.
- Steffey *et al.* (Eds.) (1999). *Handbook of corn insects*. Entomological Society of America, Lanham, USA, 164 pp.



Laboratoire de diagnostic  
en phytoprotection

