

Texte traduit de la version anglaise par N. Gauthier
European Journal of Entomology, 2016, 113, 265-269.

Vingt-deux loci microsattellites polymorphes chez la guêpe parasite, *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae) : outils moléculaires très prometteurs dans l'étude de la génétique des populations de plusieurs espèces de braconides bénéfiques.

Titre court

Loci microsattellites chez des espèces de braconides

Auteurs

Madougou GARBA¹, Anne LOISEAU^{2A}, Laure BENOIT^{2B} et Nathalie GAUTHIER^{2C}

¹ Direction Générale de la Protection des Végétaux, Ministère de l'Agriculture, BP323, Niamey, Niger ; e-mail: garba_madougou@yahoo.fr

² UMR (INRA^A /IRD^C /Cirad^B /Montpellier SupAgro) Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, 755 avenue du Campus Agropolis, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez, France ; e-mails: loiseau@supagro.inra.fr, laure.benoit@cirad.fr, nathalie.gauthier@ird.fr and nathalie.gauthier@supagro.inra.fr

Auteur à contacter: Nathalie GAUTHIER

RÉSUMÉ

En combinant un protocole d'enrichissement par la biotine et une technologie de pyroséquençage *via* un séquenceur de type 454GS-FLX titanium, nous avons caractérisé 22 loci microsatellites polymorphes chez la guêpe parasite, *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera, Braconidae), une espèce cosmopolite communément utilisée dans le contrôle biologique d'un grand nombre de lépidoptères s'attaquant aux denrées stockées et aux cultures de plein champs de part le monde. Trois multiplexes PCRs ont été optimisés et testés sur 46 spécimens de l'espèce *H. hebetor* issus de deux échantillons collectés dans des champs de mil au Niger. Deux à onze allèles ont été observés par locus et l'hétérozygotie observée va de 0.289 à 0.826. Le polymorphisme détecté est caractérisé par un niveau d'hétérozygotie observée (0.482 *vs.* 0.502) et un nombre d'allèles (4.1 *vs.* 3.6) comparables dans les deux échantillons. Un écart par rapport aux attendus à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été détecté aux cinq mêmes loci pour les deux échantillons et à cinq ou sept loci complémentaires dans chaque échantillon. Cet écart n'est pas associé à un déficit en hétérozygotes. Bien qu'il y ait déséquilibre de liaison pour quelques allèles, les nouveaux loci décrits ségrègent indépendamment les uns des autres. La variabilité démontrée pour ces 22 loci permettra une estimation de la diversité génétique et des panels de structuration des populations de *H. hebetor*, ainsi que l'étude de leurs flux de gènes à différentes échelles spatiales. Les tests d'amplifications croisées entre les diverses espèces se sont avérés positifs entre les six espèces de *Bracon* testées et neuf loci seront tout particulièrement appropriés aux études de génétique des populations chez l'espèce *B. brevicornis*.

MOTS CLÉS

Hymenoptera, Braconidae, *Habrobracon hebetor*, *Bracon* spp., contrôle biologique, guêpe parasite, microsatellite, génétique des populations, flux de gènes.

INTRODUCTION

Habrobracon hebetor (Say) (Hymenoptera, Braconidae) est un ectoparasitoïde grégaire de larves d'un grand nombre d'espèces de papillons économiquement nuisibles car infestant les céréales, les noix, les fruits conservés aussi bien en structures de stockage qu'en plein champs, de part le monde entier. Ce parasitoïde est considéré comme l'un des agents de lutte biologique le plus prometteur dans le contrôle d'un grand nombre de ravageurs de denrées stockées, incluant la pyrale indienne des fruits secs *Plodia interpunctella* (Hübner), la pyrale de la farine *Ephestia kuehniella* (Zeller), la mite du riz *Corcyra cephalonica* (Stainton), la fausse teigne de la cire *Galleria mellonella* L., la noctuelle du coton *Helicoverpa armigera* (Hübner), la mineuse de l'épi du mil *Heliocheilus albipunctella* (de Joannis), du fait de sa distribution cosmopolite et de sa capacité à réguler les populations de nombreux papillons ravageurs de denrées alimentaires stockées (Payne et al., 2011 ; Adarkwah et al., 2014 ; Ba et al., 2014 ; Ghimire & Philipps, 2014). Ce parasitoïde est vendu comme agent de lutte biologique par des firmes commerciales. Son élevage aisé a permis que les populations indigènes puissent également être élevées pour ensuite les lâcher en champs ou en stocks pour améliorer le contrôle des espèces de papillons ravageurs dans divers pays du monde (Ghimire & Philipps, 2010; Payne et al., 2011).

De nombreux aspects de sa biologie générale et de son écologie, ainsi que les caractéristiques de son utilisation dans la gestion des populations de ravageurs des cultures, ont déjà largement été développés (Payne et al., 2011 ; Antolin et al., 2003 ; Adarkwah et al., 2014 ; Ba et al., 2014 ; Ghimire & Philipps, 2014). Cependant, rien n'est encore connu sur la structure génétique des populations et la diversité génétique de cet agent largement utilisé en lutte biologique. Pourtant, de telles connaissances amélioreraient notre compréhension de cette espèce et de ses populations à différentes échelles spatiales, apporteraient des informations utiles sur les populations avant et après leur lâcher dans le cadre des programmes de lutte biologique, et faciliteraient la mise en oeuvre de stratégies de contrôle plus efficaces.

Ces lacunes soulignent le besoin que nous avons de posséder des marqueurs moléculaires discriminants pour suivre précisément *H. hebetor* lors des programmes de gestion de populations des ravageurs de cultures et lors d'études de génétique des populations.

Les loci microsatellites sont des marqueurs pertinents communément utilisés de nos jours pour de tels objectifs mais, pour autant que nous sachions, de tels marqueurs n'ont encore jamais été développés pour l'espèce *H. hebetor* ou des espèces phylogénétiquement très proches (i.e. *Bracon* spp.) au sein de la famille très large des Braconidae.

Pour isoler des marqueurs microsatellites chez *H. hebetor*, nous avons par conséquent choisi de combiner un protocole d'enrichissement par la biotine et une technologie de pyroséquençage *via* un séquenceur de type 454GS-FLX titanium. Parmi les 24 marqueurs microsatellites testés, 22 se sont avérés polymorphes. Ils ont ensuite été testés et optimisés dans le contexte de trois multiplexes PCR sur 46 femelles *H. hebetor* issues de deux populations naturelles collectées au Niger (Afrique de l'Ouest).

Au moyen de ces marqueurs microsatellites, des tests d'amplifications PCRs croisées ont été réalisés sur six espèces de braconidés phylogénétiquement proches [*Bracon brevicornis* (Wesmael) *B. nigricans* (Szépligeti), *B. cephi* (Gahan), *B. lissogaster* (Muesebeck), et deux autres espèces *Bracon* spp.], parmi lesquelles certaines sont également des agents de lutte biologique dans des programmes de lutte intégrée contre les espèces de papillons ravageurs des cultures.

MATERIEL ET METHODES

Echantillonnage et extraction d'ADN

Des adultes de l'espèce *H. hebetor* ont été collectés à la fin de l'été 2014 dans des champs de mil de deux localités du Niger séparées de 80km : Dantchandou (13.40634 N, 2.71836 E) et Tondikoarey (13.58236 N, 1.99969 E) (**Tableau 1**). Tous les adultes issus de la même localité sont mis encore vivants dans un tube rempli d'éthanol 80% et sont sexés au laboratoire sous microscope binoculaire. Dans notre étude, 46 femelles parmi lesquelles 24 provenant de Dantchandou et 22 de Tondikoarey ont été stockées à -20°C dans l'attente de leur utilisation pour les expériences moléculaires.

Par ailleurs, 61 femelles appartenant à six autres espèces du genre *Bracon* ont été rajoutées à l'étude : 19 *B. brevicornis* provenant d'un élevage de masse d'un laboratoire initié avec des insectes collectés en 2006 à côté de la ville de Leipzig (Allemagne) et 24 *B. nigricans* provenant d'un élevage de masse d'un laboratoire initié avec des insectes collectés en Sicile (Italie) en 2015, 12 *B. cephi* et 4 *B. lissogaster* ont été collectés en 2015 dans l'état du Montana (EU), et les deux autres espèces de braconidé ont été collectées en 2015 dans l'Ariège (Sud de la France).

Tous les adultes issus de la même localité sont mis encore vivants dans un tube rempli d'éthanol 80% et sont sexés au laboratoire. Ensuite, ils sont stockés à -20°C dans l'attente de leur utilisation pour les expériences moléculaires.

L'ADN génomique total de chaque femelle collectée est individuellement extrait au moyen du Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant.

Banque microsatellite, conception d'amorces et amplification PCR

L'ADN génomique total de 30 individus de l'espèce *H. hebetor* poolés a été extrait au moyen du Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les instructions du fabricant. Les loci ont été isolés par la société de service Genoscreen (Lille, France) en suivant un protocole d'enrichissement par la biotine, adapté du protocole développé par Kijas et al. (1994). La production et le pyroséquençage des librairies enrichies en huit motifs microsatellites [i.e. (TG)₁₀, (TC)₁₀, (AAC)₈, (AAG)₈, (ACG)₈, (AGG)₈, (ACAT)₆, (ACTC)₆] ont été réalisés comme décrit dans Malausa et al. (2011). Les 39 189 séquences obtenues ont ensuite été triées et sélectionnées au moyen du programme libre QDD (Megléczy et al., 2010). Un total de 13 151 séquences de taille supérieure à 100 pb et contenant des motifs microsatellites avec au moins six répétitions et des zones flanquantes libres de motifs répétés ont été obtenues, représentant une source importante d'autres marqueurs potentiels. Des amorces de taille comprise entre 19 et 22 pb ont été dessinées *via* l'algorithme PRIMER3 disponible sur le web (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, Rozen & Skaletsky, 2000) également utilisé par le programme QDD. Ces amorces répondent aussi aux critères suivants: (i) une zone microsatellite avec au moins six motifs répétés ; (ii) un produit PCR compris entre 100 et 420 pb ; (iii) une région flanquante contenant au plus les 3 mêmes mononucléotides d'affilée ou 2 fois le même motif de 2 à 4 pb ; (iv) une température de fixation des amorces *Ta* comprise entre 60 °C et 63 °C, et une différence de la *Ta* entre les amorces forward et reverse ≤ 1.5 °C ; et (v) des possibilités de complémentarités de bases au sein d'une même amorce et entre les jeux d'amorces suivant les critères de qualité définis par défaut dans PRIMER3.

Trente-six paires d'amorces ont ainsi été sélectionnées. Ces 36 nouveaux marqueurs potentiels ont été comparés par Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) aux marqueurs déjà publiés dans GenBank et aucun n'a montré d'identité nucléotide significative avec ces derniers. Par conséquent, ils ont été optimisés *via* des PCRs monolocus avec l'ADN extrait de huit femelles de l'espèce *H. hebetor* provenant d'origines géographiques variées.

Les amplifications PCRs ont été conduites dans un volume final de 10 μ L comprenant 5 μ L de tampon QIAGEN [multiplex PCR Master Mix (1X) (incluant de la *Taq*, 200 μ M de chaque dNTP et 1.5 mM de MgCl₂)], 2 μ M d'amorces, 1 μ L d'ADN génomique et 2.6 μ L d'eau sans RNase. Toutes les PCRs se réalisent selon les étapes suivantes : (i) une dénaturation initiale à

95 °C pendant 15 min; (ii) 30 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 30 s, une renaturation à 57 °C pendant 90 s, une élongation à 72 °C pendant 60 s; et (iii) une élongation finale à 60 °C pendant 30 min. Vingt-quatre des loci testés ont produits sur gel d'agarose des amplifications de bonne qualité c'est à dire avec un pattern allélique sans ambiguïté et du polymorphisme. Ces 24 loci ont été conservés et multiplexés pour réaliser les PCRs avec amorces marquées avec fluorochromes. Grace au logiciel Multiplex Manager v1.1 (Holleley & Geerts 2009), trois multiplexes PCRs minimisant la formation de duplexes entre amorces et maximisant des produits d'amplification de tailles différentes ont été construits (**Tableau 1**).

Analyses génétiques

Pour caractériser les 24 loci, les 46 individus collectés au Niger ont été génotypés (**Tableau 1**). De façon à analyser le polymorphisme de ces loci, les amplifications PCRs des ADNs extraits ont été conduites comme décrit plus haut. Les produits PCRs obtenus ont été séparés sur un séquenceur automatique ABI 3730 (Applied Biosystems, Montpellier, France). Les tailles alléliques sont déterminées au moyen du marqueur de taille standard GeneScan™ 500 LIZ (Applied Biosystems) et du logiciel GeneMapper™ v 4.0, avant d'être finalement confirmées manuellement. Les niveaux de polymorphisme [i.e. nombre d'allèles observés (N_a), hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e)], l'écart aux attendus sous l'hypothèse d'équilibre sous Hardy-Weinberg (HWE) et le déséquilibre de liaison (LD) pour chaque locus ont été estimés avec le logiciel GenePop 4.2 disponible sur le web (Rousset, 2008 ; <http://genepop.curtin.edu.au/>), aussi bien pour chaque échantillon que pour les 46 spécimens considérés ensemble. La correction de Bonferroni a été appliquée dans le cadre des tests de HW et de LD. Quand un écart aux attendus sous l'hypothèse de HWE fut détecté, la responsabilité des allèles nuls ou d'erreurs de lecture durant le génotypage dans cet écart a été estimée via le programme Micro-Checker (van Oosterhout et al., 2004) et le package FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007). Pour évaluer le niveau de différenciation génétique entre les échantillons, les valeurs de F_{ST} ont été calculées via le package FreeNA (avec la correction ENA qui tient compte de la présence des allèles nuls).

Des amplifications PCRs croisées ont été testées au moyen des trois multiplexes PCRs sur les 61 femelles des six autres espèces de braconidés à savoir sur 19 *B. brevicornis*, 24 *B. nigricans*, 12 *B. cephi*, 4 *B. lissogaster* et 2 *Bracon* spp. Les conditions de PCR et de génotypage appliquées sont celles décrites plus haut.

RESULTATS

Diversité génétique, tester les hypothèses d'équilibre sous Hardy–Weinberg et de liaison des marqueurs

Un génotype a été obtenu à chaque locus et pour les 46 spécimens *H. hebetor* (sauf pour un spécimen de Dantchandou au locus Heb3-08). Vingt-deux loci sur les 24 testés sont polymorphes (exceptés Heb3-04 et Heb3-06). Le nombre d'allèles par locus va de 2 à 11 (en moyenne 4.667) et l'hétérozygotie observée (H_O) globale varie de 0.289 à 0.826 ($H_{O\text{-moyenne}} = 0.491 \pm 0.218$). Chaque échantillon présente du polymorphisme avec un niveau d'hétérozygotie observée ($H_{O\text{-Dantchandou}} = 0.482 \pm 0.215$, $H_{O\text{-Tondikoarey}} = 0.502 \pm 0.290$) et un nombre moyen d'allèles ($Na_{\text{-Dantchandou}} = 4.1$, $Na_{\text{-Tondikoarey}} = 3.6$) similaires (**Tableau 1**). Un seul allèle fixé au niveau du locus Heb4-1 et de l'échantillon Tondikoarey a été révélé (**Tableau 1**). Après la correction de Bonferroni, des écarts significatifs à HWE persistent à cinq loci (Heb2-02, Heb2-06, Heb2-03, Heb2-14, Heb2-15) pour chaque échantillon, avec 7 loci supplémentaires pour Tondikoarey et 5 autres pour Dantchandou (**Tableau 1**).

D'après les estimations recueillies avec les logiciels MICROCHECKER and FreeNA, aucune évidence d'erreurs de lecture et de fréquences d'allèle nul significatives ($f > 0.15$) n'est significativement présente dans les données, sauf à trois loci pour Tondikoarey et un locus pour Dantchandou.

Après la correction de Bonferroni, du déséquilibre de liaison demeure entre quelques allèles mais ces allèles ne sont pas les mêmes selon l'échantillon considéré, Dantchandou ou Tondikoarey (donnée non présentée). L'échantillonnage par lui-même au lieu d'une liaison physique entre les loci explique ce LD.

Différenciation génétique

Le niveau de différenciation génétique entre les échantillons Dantchandou et Tondikoarey ($F_{ST(ENA)} = 0.0981$) est très faible et statistiquement non significatif. En accord avec ce résultat, des tests d'assignation génétique de chaque individu génotypé ont montré que les spécimens Dantchandou et Tondikoarey constituait une seule et même population génétique (résultats non présentés).

Amplifications PCRs spécifiques croisées

Les amplifications entre espèces furent majoritairement positives. Vingt-trois loci sur les 24 sélectionnés chez *H. hebetor* amplifièrent tous les spécimens *B. brevicornis*, contre 11 loci chez 22 des 24 spécimens *B. nigricans* testés, 7 et 6 loci chez au moins 50% des spécimens *B.*

lissogaster et *B. cephi*, respectivement, et 9 et 6 loci chez les deux autres espèces de *Bracon* sp. testées (**Tableau 2**). De façon intéressante, certains des loci amplifiés chez *H. hebetor* ont révélé un polymorphisme significatif chez les autres espèces de braconidés testées, tout particulièrement chez *B. brevicornis* avec neuf loci polymorphes, et *B. cephi* plus *B. lissogaster* avec sept loci polymorphes. Certains des allèles pourraient mêmes être diagnostiques d'espèces puisqu'ils sont fixés et privés. Par exemple, au locus Heb2-16, l'allèle 226pb est fixé chez *B. brevicornis* vs. allèle 222pb chez *B. nigricans*, aucune amplification n'est effective chez *B. lissogaster* and *Bracon* sp.1 et une autre gamme de tailles alléliques est observée chez *H. hebetor* et *Bracon* sp.2. (**Tableau 2**).

DISCUSSION

Dans notre étude et pour la première fois chez la micro-guêpe, *H. hebetor*, et – à notre connaissance – chez d'autres espèces bénéfiques de braconidés phylogénétiquement proches, 22 marqueurs microsatellites polymorphes ont été développés.

Bien que cinq loci parmi les 22 caractérisés présentent un écart aux attendus de HWE, aucun locus ne présente de déficit en hétérozygotes et de déséquilibre de liaison. Le comportement reproducteur ainsi que les traits d'histoire de vie de l'espèce *H. hebetor* favorisent les croisements au hasard (dans Antolin et al., 2003). Cependant, les individus *H. hebetor* génotypés dans notre étude provant de petits échantillons et d'une grande culture, les populations ont sans doute subi des pressions de sélection et/ou des possibles goulots d'étranglement. Les fluctuations d'effectifs dans les populations qui en découlent ont sans aucun doute contribué aux écarts à HWE observés à certains des loci.

Ainsi, ces loci nouvellement développés seront potentiellement très utiles dans le cadre d'études, à diverses échelles spatiales dans le monde, de la diversité génétique et des patterns de structuration des populations de *H. hebetor* issus de diverses espèces de larves hôtes et de différents environnements.

La faible différenciation génétique entre les deux échantillons distants de plus de 80km suggère l'existence d'un flux de gènes important à l'échelle régionale. Actuellement, nous sommes en train d'utiliser ces loci microsatellites pour génotyper 1) un grand nombre d'échantillons collectés en de nombreux sites du Niger et des pays voisins d'Afrique subsaharienne pour évaluer la structure génétique de cette espèce à une large échelle spatiale, 2) des souches de laboratoires lâchées contre des ravageurs de denrées stockées dans le cadre de programme de lutte biologique pour pouvoir suivre leur structure génétique et leur dynamique dans l'agro-écosystème. Des résultats préliminaires (données qui seront présentées dans une

autre étude) semblent démontrer que ces nouveaux loci donneront des informations très utiles sur la dispersion de *H. hebetor* à l'échelle du champ puisqu'il semble possible de localement différencier les souches de laboratoires et les souches sauvages, ce qui, nous espérons, nous permettra de réaliser des stratégies de contrôle biologique plus efficaces contre les espèces de ravageurs des cultures ciblées. En outre, certains des loci testés ici semblent pertinents pour des études de génétique des populations d'espèces proches telles que *B. brevicornis* et dans une moindre mesure *B. cephi* et *B. lissogaster*, et pour différencier les diverses espèces lors de populations spécifiquement mélangées.

Remerciements

Cette étude a été rendue possible grâce au soutien financier “du Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest (PPAAO)”, Niger et “de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD)”, France *via* un projet de collaboration entre “la Direction Générale de Protection des Végétaux (DGPV)”, Niamey et l'IRD. Les données présentées dans ce travail ont été pour partie obtenues grâce aux équipements et services présents au “Centre Méditerranéen Environnement Biodiversité” de Montpellier, France. Nous remercions L. Zappalà (Università degli Studi di Catania, Italy), T.A. Rand (USDA-ARS, Sidney, USA), A. Thiel (University of Bremen, Germany) et G. Delvare (CIRAD, Montpellier, France) pour nous avoir procuré des spécimens des espèces *B. nigricans*, *B. cephi* et *B. lissogaster*, *B. brevicornis* et *Bracon* spp., respectivement. Egalement, nous voulons remercier H.D. Loxdale pour tous ses commentaires très pertinents sur le manuscrit. Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts.

REFERENCES

- ADARKWAH C., ULRICHS C., SCHAARSCHMIDT S., BADI B.K., ADDAI I.K., OBENG-OFORI D. & SCHÖLLER M. 2014 : Potential of Hymenopteran larval and egg parasitoids to control stored-product beetle and moth infestation in jute bags – *Bull. Entomol. Res.* **104**: 534–542.
- ANTOLIN M.F., ODE P.J., HEIMPEL G.E., O'HARA R.B. & STRAND M.R. 2003: Population structure, mating system, and sex-determining allele diversity of the parasitoid wasp *Habrobracon hebetor* - *Heredity* **91**:373-381.
- BA M.N., BAOUA I.B., KABORE A., AMADOU L., OUMAROU N., DABIRE-BINSO C. & SANON A. 2014 : Augmentative on-farm delivery methods for the parasitoid *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) to control the millet head miner *Heliocheilus albipunctella* (de Joannis) (Lepidoptera: Noctuidae) in Burkina Faso and Niger - *BioControl* **59**: 689–696.

- CHAPUIS M.P. & ESTOUP A. 2007 : Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation – *Mol. Biol. Evol.* **24**:621–631.
- GHIMIRE M.N. & PHILIPPS T.W. 2010: Mass rearing of *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) on larvae of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): effects of host density, parasitoid density, and rearing containers - *J Stored Prod. Res.* **46**: 214-220.
- GHIMIRE M.N. & PHILIPPS T.W. 2014: Oviposition and reproductive performance of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on six different pyralid host species - *Ann. Entomol. Soc. Am.* **107**: 809-817.
- HOLLELEY C.E. & GEERTS P. 2009: Multiplex Manager1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR - *Biotechniques* **46**: 511-517.
- KIJAS J.M.H., FOWLER J.C.S., GARBETT C.A. & THOMAS M.R. 1994: Enrichment of microsatellites from the citrus genom using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles - *Biotechniques* **16**: 657-660.
- MALAUSSA T., GILLES A., MEGLÉCZ E., et al. 2011: High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol. Ecol. Res.* - **11**: 683-644.
- MEGLÉCZ E., COSTEDOAT C., DUBUT V., GILLES A., MALAUSSA T., PECH N. & MARTIN J.F. 2010: QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects - *Bioinformatics* **26**: 403-404.
- PAYNE W., TAPSOBA H., BAOUA I.B., MALICK B.N., N'DIAYE M. & DABIRE-BINSO C. 2011 : On-farm biological control of the pearl millet head miner: realization of 35 years of unsteady progress in Mali, Burkina Faso and Niger - *International J. Agr. Sustainability* **9**: 186-193.
- ROZEN S. & SKALETSKY H.J. 2000: PRIMER3 on the web for general users and biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (ed. KRAWETZ S., MISENER S.), pp. 365-368. Humana Press, Totowa, NJ.
- ROUSSET F. (2008): GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* **8**: 103-106.
- VAN OOSTERHOUT C., HUTCHINSON W.F., WILLS D.P.M. & SHIPLEY P. 2004: MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**: 535-538.

TABLEAU 1. Caractéristiques des marqueurs microsatellites sélectionnés chez l'espèce *Habrobracon hebetor*. La diversité allélique, l'hétérozygotie et les fréquences d'allèle nul ont été estimés à partir de 46 femelles *H. hebetor* collectées dans deux populations naturelles au Niger (Dantchandou $n=24$, Tondikoarey $n=22$).

Locus (GenBank Accession no.)	Séquence des amorces (5'-3') (F: [fluorochrome]-forward; R: reverse)	Allèle cloné		Global	Dantchandou ($n = 24$)			Tondikoarey ($n = 22$)		
		Motif répété	Taille de l'allèle (pb)	N_a ASR (bp)	N_a	H_0/H_E (P_{HWE} -valeur)	$f_{\text{allele-nul}}$	N_a	H_0/H_E (P_{HWE} -valeur)	$f_{\text{allele-nul}}$
Multiplexe 1 pour les PCRs										
Heb2-02 (KT966690)	F: [PET]- CGTGCTAGCGGTGGAGTTAG R: GCCTGTGCATCATCAAATGT	(CA) ₁₃	118	8 108-130	7	0.708/0.827 (0.001)**	0.048	5	0.818/0.668 (0.039)*	0
Heb3-01 (KT966699)	F: [VIC]- TGCACATTCCTTTACGTCCA R: TGTTGACGATAGCGCTGGTA	(ACC) ₉	127	3 119-128	3	0.542/0.664 (0.233)	0.057	3	0.273/0.613 (0.001)**	0.197
Heb2-13 (KT966694)	F: [VIC]- TGTGACGATGAGGAAACAGC R: TCCGCTCACCATTTCTTAC	(AC) ₁₃	191	5 185-193	5	0.750/0.732 (0.001)**	0.149	2	0.409/0.485 (0.654)	0.045
Heb3-04 (KT9666701)	F: [NED]- CTCCTATCCTTGACATGCG R: GGAGTTGACACCTGACGGAT	(CTA) ₆	182	1 180	1	-/-	0	1	-/-	0
Heb2-17 (KT966696)	F: [6-FAM]- AATGGTGCATGCTTAAAGG R: CGGAGGTGAGCTTATGAAGG	(CT) ₉	241	11 237-266	9	0.667/0.767 (1.000)	0.076	5	0.727/0.707 (0.001)**	0
Heb3-07 (KT966703)	F: [NED]- TGAGACGAGGAATTTCCAGC R: ACACATCAACGCCCAATACA	(CTT) ₉	246	4 252-261	4	0.667/0.645 (0.001)**	0.053	2	0.545/0.474 (0.654)	0
Heb3-09 (KT966705)	F: [VIC]- CAGTTTCGTCGGTTCGTACA R: GGTTGGATTGCGTCACTGT	(CAA) ₆	312	4 295-316	4	0.250/0.364 (0.027)*	0.066	3	0.500/0.449 (0.063)	0
Heb3-08 (KT966704)	F: [PET]- GGCAGCAGAATTAGCTGTTC R: CGGACAAATCTTGAAGGGAA	(CGT) ₆	294	3 292-298	2	0.521/0.510 (1.00)	0	3	0.046/0.521 (0.001)**	0.307
Heb2-25	F: [6-FAM]- CACTGATTCTGAATGCTCATTAC	(AG) ₁₀	412	3	3	0.333/0.595	0.160	3	0.727/0.638	0

(KT966698)	R: GCTTAGCCTGACGATATACATAG			400-404		(0.07)			(0.419)	
Multiplexe 2 pour les PCRs										
Heb2-04 (KT966691)	F: [6-FAM]- TGCGCATATCAATATGTAGCATT R: GAGCAATTGCATTATTCTCGC	(AC) ₁₂	119	4 103-115	3	0.417/0.529 (0.325)	0.075	3	0.364/0.613 (0.001)**	0.125
Heb3-03 (KT966700)	F: [6-FAM]- ATTTGTACACCAGCCGGAAG R: AGCGTCAGCAGTAACAAGCA	(GTC) ₇	177	2 175-178	2	0.375/0.510 (0.232)	0.083	2	0.727/0.507 (0.078)	0
Heb2-16 (KT966695)	F: [VIC]- TGTGGGAACAGACAAACGAA R: GGCTTTGTTTATGGCAAACC	(AG) ₁₀	233	5 216-230	3	0.500/0.457 (0.331)	0	4	0.318/0.612 (0.001)**	0.180
Heb2-21 (KT966697)	F: [6-FAM]- GCTGAGGTAATGGATGGCTC R: CTGCATTAACAAGTCATTTCGG	(CT) ₈	292	4 284-294	3	0.417/0.465 (0.033)*	0.062	3	0.318/0.487 (0.104)	0.110
Heb4-02 (KT966706)	F: [NED]- GAAATTGCCAGATACCGCTC R: CAACTTTGCACAACACGTCC	(GTTT) ₇	316	5 309-325	5	0.667/0.769 (0.560)	0.057	4	0.591/0.551 (0.609)	0
Heb2-06 (KT966692)	F: [NED]- GTGGCCACATCCTGTAATGA R: CCGCTTGAACGATTTAGGAA	(CA) ₁₇	133	8 114-160	8	0.666/0.831 (0.000)**	0.075	5	1.000/0.799 (0.002)**	0
Heb3-06 (KT966702)	F: [PET]- TCGATGTACTCGGTGTGAGG R: TGGAGTCCACTCACCTTTC	(AGG) ₆	243	1 246	1	-/-	0	1	-/-	0
Heb2-09 (KT966693)	F: [PET]- GAGACGAGGCCACTGATTA R: ATATCACGAAGCCAGGAACC	(GA) ₁₂	173	6 168-188	5	0.417/0.481 (0.050)	0.081	6	0.455/0.691 (0.001)**	0.100
Multiplexe 3 pour les PCRs										
Heb3-05 (KT966710)	F: [6-FAM]- GAGCAACATACGTGCGTCATA R: GGAGACATAGTGGAGGCCAA	(AAC) ₆	185	3 181-187	3	0.375/0.549 (0.170)	0.097	3	0.636/0.580 (0.078)	0
Heb4-01 (KT966709)	F: [NED]- CTGTGGAGGGCTCGATTTAG R: AGGAAGCGGGATCCTATC	(GGGA) ₆	127	3 117-129	3	0.417/0.401 (1.000)	0	1	-/-	0
Heb2-03 (KT966707)	F: [6-FAM]- GTGGATGTTTCGTCACTGGA R: AGCCGCTAATCAGAAACCAA	(TG) ₇	118	6 103-113	3	0.833/0.664 (0.001)**	0	6	0.773/0.776 (0.001)**	0

Heb2-07 (KT966708)	F: [VIC]- CGCAGCTTCTGTGGAGTAAAC R: TGTAATGTCGCTACGTGCC	(TC) ₁₀	140	7 137-149	6	0.583/0.508 (1.000)	0	5	0.773/0.757 (0.001)**	0
Heb2-11 (KT966712)	F: [NED]- CAGCTGTAATATCAGCGGCA R: CGGCAGATTGTAATGCGAGT	(TC) ₁₁	190	5 183-193	5	0.583/0.784 (0.000)**	0.113	4	0.773/0.684 (0.351)	0
Heb2-14 (KT966711)	F: [VIC]- TCCCTTCACCATGATCCATT R: TGCATGAGCACTTGTTTCAGA	(AC) ₉	202	5 193-209	4	0.250/0.461 (0.004)**	0.132	4	0.773/0.760 (0.001)**	0
Heb2-15 (KT966714)	F: [PET]- CATCGATCTTCATAAGTTTCC R: CCCTGCATTGACTCAGGTC	(AC) ₁₀	209	6 199-213	5	0.625/0.655 (0.005)*	0	5	0.500/0.661 (0.001)**	0

Loci présentant une déviation significative par rapport aux attendus sous l'hypothèse d'être à l'équilibre de Hardy-Weinberg ($P_{HWE} < 0.05^*$, $P_{HWE} < 0.01^{**}$) après les corrections selon Bonferroni.

En gras déficit en hétérozygotes ($P < 0.05$)

En gras $f_{\text{allele-nul}}$ fréquence d'allèles nuls par locus estimée et statistiquement significative ($f_{\text{allele-nul}} > 0.15$)

n . nombre de spécimens étudiés, Na . Nombre d'allèles, ASR . Gamme de taille allélique, H_O and H_E . hétérozygoties observée and attendue. -/- hors de propos

TABLEAU 2. Amplifications positives chez les espèces *Bracon brevicornis*, *B. nigricans*, *B. cephi*, *B. lissogaster* et deux *Bracon* spp. au moyen des loci développés chez *Habrobracon hebetor*.

Locus	<i>Bracon brevicornis</i> (n = 19)			<i>Bracon nigricans</i> (n = 24)			<i>Bracon cephi</i> (n = 12)			<i>Bracon lissogaster</i> (n = 4)			<i>Bracon spl.</i> (n = 1)			<i>Bracon sp2.</i> (n = 1)		
	<i>Nsa</i>	<i>Na</i>	<i>ASR</i> (bp)	<i>Nsa</i>	<i>Na</i>	<i>ASR</i> (bp)	<i>Nsa</i>	<i>Na</i>	<i>ASR</i> (bp)	<i>Nsa</i>	<i>Na</i>	<i>ASR</i> (bp)	<i>Nsa</i>	<i>Na</i>	<i>ASR</i> (bp)	<i>Nsa</i>	<i>Na</i>	<i>ASR</i> (bp)
Heb2-02	19	2	108-116	24	1	108	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb3-01	19	1	122	1	1	128	2	2	122-128	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb2-13	19	2	181-183	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb3-04	19	1	180	24	1	184	12	2	163-166	4	2	163-166	0	-	-	1	2	163-169
Heb2-17	19	1	253	24	2	227-229	12	1	229	4	1	229	1	2	237-241	1	1	227
Heb3-07	19	1	255	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb3-09	19	1	313	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb3-08	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb2-25	18	1	401	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb2-04	15	1	101	0	-	-	0	-	-	3	1	111	1	1	107	0	-	-
Heb3-03	19	1	175	6	3	175-181	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb2-16	19	1	226	24	1	222	8	1	230	0	-	-	0	-	-	1	1	228
Heb2-21	19	2	290-292	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb4-02	19	1	317	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb2-06	19	2	112-114	24	1	110	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb3-06	19	1	246	24	1	240	12	1	241	4	3	240-243	1	1	243	1	1	250
Heb2-09	19	3	170-174	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
Heb3-05	19	2	181-187	24	1	190	3	2	181-184	2	2	181-184	1	2	181-190	1	1	181
Heb4-01	19	2	125-129	24	1	146	4	1	125	1	1	125	1	1	125	1	1	125
Heb2-03	19	1	105	24	1	110	7	4	105-113	4	4	111-125	0	-	-	1	1	105
Heb2-07	19	2	132-136	24	1	121	3	3	132-138	3	3	117-125	0	-	-	0	-	-
Heb2-11	19	1	189	1	2	183-191	8	4	183-191	4	4	183-191	1	1	189	1	1	189
Heb2-14	19	2	197-199	22	1	190	5	4	194-200	2	2	198-200	0	-	-	1	1	200
Heb2-15	19	1	203	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
<i>Nstotal</i>		23			14			11			10			6			9	
<i>(Npol)</i>		(9)			(3)			(7)			(7)			(2)			(1)	

n. nombre d'individus testés, *Nsa.* Nombre d'amplifications/locus/espèce positives et non ambiguës, *Na.* Nombre d'allèles, *ASR.* Gamme de taille allélique, *Nstotal.* nombre de locus/espèce ayant donné des amplifications positives, *Npol* nombre de loci polymorphes, -. hors de propos