

UNIVERSITE PARIS 6 – PIERRE ET MARIE CURIE

ECOLE DOCTORALE DIVERSITE DU VIVANT

Doctorat

Thèse de Biologie

Gaël J. KERGOAT

Le genre *Bruchidius* (Coleoptera, Bruchidae) : un modèle pour
l'étude des relations évolutives entre les insectes et les plantes

Directeur de thèse : Jean-François SILVAIN

Soutenue le 16 décembre 2004

Jury :

Mr.	Hervé LE GUYADER	(Président du jury)
Mr.	Thierry BOURGOIN	(Rapporteur)
Mr.	Frédéric MARION-POLL	(Rapporteur)
Mr.	Pierre DARLU	
Mr.	Alex DELOBEL	(Directeur de thèse)
Mr.	Jean-François SILVAIN	(Directeur de thèse)

2.1.	Problématique	16
2.2.	La coévolution au sens d'Ehrlich et Raven	17
2.3.	Hypothèses alternatives	19
2.3.1.	La cospéciation ou co-cladogénèse	19
2.3.2.	La spécialisation chimique	20
2.3.3.	La spécialisation écologique (trophique)	21
2.3.4.	La colonisation éco-géographique	21
2.4.	Discussion et perspectives	22
Chapitre second :	Les bruches comme modèle d'étude des relations évolutives plantes-insectes	23
Section I :	Les bruches : généralités	23
1.1.	Diversité et rang taxonomique	23
1.2.	Morphologie	24
1.3.	Biologie, écologie	27
1.4.	Importance économique	28
1.5.	Taxonomie, systématique	29
1.6.	Données fossiles	31
Section II :	Relations avec les plantes-hôtes	32
2.1.	Spécialisation	32
2.2.	Adaptations aux plantes-hôtes	32
2.3.	Le modèle « Bruchidae »	35
Section III :	Le genre <i>Bruchidius</i> Schilsky	36
3.1.	Généralités	36
3.2.	Taxonomie, systématique	37
3.3.	Spécialisation	38

Section IV :	Article.	
	« New data on European <i>Astragalus</i> -feeding <i>Bruchidius</i> , with the description of a new species from Southern Italy (Coleoptera: Bruchidae: Bruchinae) »	40
Seconde partie :	Méthodes d'inférence en phylogénie moléculaire	54
Chapitre premier :	Distance, parcimonie et vraisemblance	55
Section I :	Les méthodes phénétiques	55
1.1.	Généralités	55
1.2.	« Unweighted pair-group method with arithmetic mean »	56
1.3.	« Neighbor joining »	57
Section II :	La méthode cladistique	58
2.1.	Généralités	58
2.2.	Applications	59
Section III :	Les méthodes probabilistes	61
3.1.	Généralités	61
3.2.	Maximum de vraisemblance	62
3.3.	Inférence bayésienne	63
3.4.	Choix du modèle d'évolution	66
Chapitre second :	Analyses de jeux de données multiples et estimateurs	67
Section I :	Analyses séparées vs analyses combinées	67
1.1.	Généralités	67
1.2.	Tests de permutation	68

1.3.	Indices de Bremer partitionnés	69
1.4.	Analyses partitionnées	69
Section II :	Estimation de la robustesse des topologies	70
2.1.	Généralités	70
2.2.	« Bootstrap » non paramétrique	71
2.3	« Bootstrap » paramétrique	72
2.4	Probabilités a posteriori	73
Section III :	Article.	
	« Le genre <i>Bruchidius</i> (Coleoptera: Bruchidae) est-il monophylétique? Apports des méthodes de parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne »	74
Troisième partie :	Le modèle <i>Bruchidius</i>	88
Chapitre premier :	Matériel et méthodes	89
Section I :	Données biologiques	89
1.1.	Echantillonnage	89
1.1.1.	Collecte des échantillons	89
1.1.2.	Identification des spécimens	94
1.2.	Génitalias	95
1.2.1.	Préparation des génitalias	95
1.2.2.	Intérêt des génitalias	95
1.3.	Obtention des données de séquences	98
1.3.1.	Extraction d'ADN	98
1.3.2.	Définition des amorces et amplification	99
1.3.3.	Purification et réaction de séquence	101

Section II :	Traitement des données	102
2.1.	Alignement des séquences	102
2.2.	Stratégie d'analyse	103
2.3.	Programmes utilisés	104
2.3.1.	PAUP*	104
2.3.2.	PHYML	105
2.3.3.	MrBayes	105
Chapitre second :	Résultats et discussion	106
Section I :	Article. « Phylogeny and host-specificity of European seed beetles (Coleoptera, Bruchidae), new insights from molecular and ecological data »	106
Section II :	Article. « Both host-plant phylogeny and chemistry have shaped the african seed-beetle radiation »	118
Section III :	Article. « Parallels in the evolution of the two largest New and Old World seed-beetle genera (Coleoptera : Bruchidae) »	129
Section IV :	Discussion	162
4.1.	Systématique	162
4.2.	Evolution et relations évolutives avec les plantes-hôtes	164
Conclusion		167
Bibliographie		168
Annexes : Table des illustrations et planches illustrées		185

Préface

En 1903, dans ses souvenirs entomologiques, Jean-Henri Fabre avait observé que le haricot, une plante introduite en Europe, n'était pas attaqué par les espèces de bruches autochtones, qui pourtant s'attaquaient à d'autres légumineuses (Fabaceae) cultivées. Il écrivit à propos de la bruche du haricot¹ :

« Tous les haricots lui conviennent, les blancs comme les noirs, les rouges comme les bariolés, les petits comme les gros, ceux de la dernière récolte comme les vieux de plusieurs années, presque indomptables par l'eau bouillante. Ils sont attaqués de préférence à l'état de graines libres, moins dispendieuses au travail d'invasion ; mais, sous le couvert de leur étui naturel, ils sont exploités avec autant de zèle lorsque les dénudés manquent. A travers la cosse, souvent rigide et parcheminée, les vermisseaux naissants savent très bien les atteindre. C'est ainsi que se fait l'invasion dans les champs. Est également reconnu d'excellente qualité le dolique à longue gousse, appelé ici *lou faïoù borgné*, le haricot borgne, à cause de la tache noire qui lui fait à l'ombilic une sorte d'œil poché. Je crois même reconnaître chez mes pensionnaires une prédilection marquée pour ce légume.

Jusque-là rien d'anormal : la bruche ne sort pas du genre botanique *Phaseolus*. Mais voici qui aggrave le péril et nous montre l'amateur phaséolaire sous un jour inattendu. La bruche accepte sans la moindre hésitation le pois sec, la fève, la gesse, la vesce, le pois chiche ; elle va, toujours satisfaite, de l'un à l'autre ; sa famille vit prospère en ces divers légumes, tout aussi bien que dans le haricot. Seule la lentille est refusée, peut-être à cause de l'insuffisance de son volume. Quel redoutable exploitateur que ce curculionide américain !

Le mal deviendrait pire si, comme je l'ai craint d'abord, l'insecte passait, toujours vorace, des légumineuses aux céréales. Il n'en est rien. Etablie dans mes bocaliers avec amas de froment, d'orge, de riz, de maïs, la bruche invariablement périt sans laisser descendance. Même résultat avec les semences cornées, le café ; avec les semences huileuses, le ricin, les graines du grand soleil. Hors des légumes, plus rien ne convient à la bruche. ».

Encore aujourd'hui, on peut se demander quels sont les facteurs qui sont à l'origine de la spécialisation que l'on rencontre chez de nombreux insectes phytophages. Quels sont les mécanismes évolutifs qui sont à l'origine des associations entre les insectes et les plantes ? Peut-on prévoir si un insecte donné va s'attaquer à une plante qui est nouvelle pour lui ? Ce sont autant de questions qui rejoignent la problématique de cette thèse, qui s'intéresse plus particulièrement à un modèle donné : le genre *Bruchidius* (Coleoptera, Bruchidae).

¹ *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae)

Remerciements

Depuis trois ans, j'ai eu la chance de bénéficier du soutien sans failles de mes deux directeurs de thèse. Je tiens donc à remercier chaleureusement Jean-François qui a toujours été là pour me soutenir et m'encourager. Il m'a donné beaucoup de son temps pour approfondir mon travail à tous les niveaux. Alex m'a également apporté beaucoup. Au delà de son expertise sur la famille des Bruchidae, il a su me communiquer son goût de la rigueur. Grâce à lui, j'ai pu remettre en question nombre de mes certitudes de façon à mieux appréhender une complexité que je soupçonnais pas parfois.

Au sein de l'équipe dirigée par Jean-François j'ai bénéficié du support de Bruno Le Rü et de Gilles Fédière qui ont collecté une quantité énorme de matériel inestimable.

Je remercie également Stéphane Dupas, Nathalie Faure, Pascal Moyal et Michel Sezonlin à Gif, et Guy Couturier et Gérard Tavakilian à l'antenne IRD du Muséum.

Je dois beaucoup à de nombreuses personnes présentes au laboratoire du CNRS qui m'a accueilli durant plus de trois ans. Je remercie en premier lieu les directeurs du laboratoire, Marie-Louise Cariou et Pierre Capy, pour leur aide et leur soutien.

Un grand merci aussi à Dominique Vautrin qui a eu la patience de me former aux différentes techniques de Biologie moléculaire.

Je remercie Daniel Lachaise pour ses nombreux conseils.

Merci aussi à David, Frédo, Maïa et Nathalie ; sans leur travail mes tubes de séquences seraient restés des coquilles vides.

Je remercie enfin toute la bande des miameux avec qui j'ai pu déguster chaque jour un nombre incalculable de tartes et de gâteaux *made in* Sodexo ; en particulier les deux David, et Wilfried.

Je remercie Thierry Bourgoïn et Frédéric Marion-Poll d'avoir accepté d'être rapporteurs, et Pierre Darlu de participer au jury de thèse.

Je remercie Hervé Le Guyader de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Enfin ... je ne peux finir sans évoquer le soutien et la compréhension des gens de mon entourage ; famille, amis et petite amie ...

Un grand merci à tous.

Résumé

Les insectes phytophages représentent à eux seuls près de 25 % de la biodiversité terrestre. De nombreuses études établissent un lien entre la diversification des insectes phytophages et la diversification des plantes terrestres, et plus particulièrement celle des Angiospermes. En effet, il apparaît que la majorité des insectes phytophages ne consomment qu'une fraction des plantes hôtes disponibles dans leur environnement, une tendance à la spécialisation qui a probablement favorisé leur diversification. Il est cependant très difficile d'expliciter avec précision les mécanismes évolutifs qui sont à l'origine de la diversité actuelle, et des associations et interactions entre plantes et insectes phytophages. Ce sujet est abondamment débattu actuellement, et de nombreuses hypothèses explicatives souvent redondantes ou complémentaires, ont été formulées.

La présente étude porte sur des insectes phytophages de la famille des Bruchidae (Coleoptera, Chrysomeloideae). Ces insectes présentent une forte spécificité d'hôte qui renforce leur utilité dans des études sur les relations plantes-insectes. Ils sont en effet oligophages ou monophages, et leurs larves se développent exclusivement dans des graines (majoritairement des Fabaceae). Les bruches constituent un modèle biologique pertinent car il est possible de déterminer avec précision la nature de leurs plantes-hôtes. En effet, la collecte des graines de plantes-hôtes potentielles sur le terrain et le suivi de l'émergence des adultes permet d'identifier avec précision les associations plantes-insectes. Cette étude a porté sur près d'une centaine d'espèces de Bruchidae, appartenant majoritairement au genre *Bruchidius* (inféodé à l'Ancien Monde). Afin de reconstruire la phylogénie des espèces de notre échantillon, on a obtenu des données de séquences pour plusieurs marqueurs moléculaires mitochondriaux et nucléaires. Le traitement de ces données a été effectué à l'aide de différentes méthodes d'inférence phylogénétique (parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne), ce qui a permis de mettre en exergue les avantages et les désavantages de chaque méthode. En intégrant les hypothèses phylogénétiques obtenues avec des données écologiques et biogéographiques connues (par exemple la nature des composés secondaires des graines pour les espèces africaines), il a été possible de tester différentes hypothèses explicatives correspondant aux principaux patrons d'interactions évolutives connus entre plantes et insectes phytophages.

Nos résultats mettent en évidence un conservatisme taxonomique marqué dans les associations plantes-insectes chez les Bruchidae (la plupart des espèces apparentées phylogénétiquement sont associées à des plantes-hôtes appartenant à la même tribu botanique). Néanmoins, il n'y a pas congruence entre les phylogénies des bruches et les phylogénies de leurs plantes-hôtes. Pour les espèces africaines étudiées, la nature des composés secondaires des graines apparaît comme le facteur majeur qui explique la diversification des espèces qui se sont spécialisées sur les sous-familles des Caesalpinioideae et Mimosoideae (Fabaceae). Cela correspond au modèle de spécialisation chimique, où les insectes vont se diversifier sur des plantes contenant des composés secondaires similaires. Nos résultats indiquent également que la radiation évolutive qu'a connu le genre *Bruchidius* est très comparable à celle du genre *Acanthoscelides*, qui occupe les mêmes niches écologiques dans le Nouveau Monde. En plus de préciser les facteurs à l'origine de la diversification de ces insectes phytophages, cette étude a permis de clarifier la systématique de la famille des Bruchidae et de mettre en évidence la paraphylie de nombreux groupes. Elle confirme l'intérêt des Coléoptères Bruchidae, et des *Bruchidius* en particulier, comme modèle d'étude de l'évolution des relations plantes-insectes.

Abstract

About 25% of the known biodiversity on Earth account for phytophagous insect species. Numerous studies have linked the evolutive radiation of phytophagous insects with those of land plants, especially Angiosperms. Indeed, it appears that the majority of phytophagous insects only eat a fraction of the available host-plant of their environment, a trend toward specialization which has likely favored their diversification. However, we can hardly determine with precision the evolutive mechanisms at the origin of the observed associations and interactions between plants and phytophagous insects. This topic is actually discussed by many authors, and numerous hypotheses have been advanced so as to explain the observed diversity of patterns.

The present study is focused on phytophagous insects belonging to the family Bruchidae (Coleoptera, Chrysomeloideae). These insects exhibit a strong host-specificity that strengthens their usefulness when studying plant-insect relations. They are strictly oligophagous or monophagous and their larvae only develop inside seeds (mostly from the family Fabaceae). Bruchids constitute a relevant biological model because it is possible to determine accurately the nature of their host-plants. Indeed plant-insect associations can be determined by sampling potential host-plant seeds in the field and further monitoring adult emergences. About a hundred species of Bruchidae have been studied: they mainly belong to the genus *Bruchidius* which is pledged to the Old World. Partial sequences from nuclear and mitochondrial genes were used to reconstruct the phylogenies of the sampled species. Several methods of phylogenetic inference were used (parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference), thus allowing their comparison. The phylogenetic hypotheses obtained for the insects have been analyzed in view of known ecological and biogeographical data (e.g., the nature of the seed secondary compounds for the African species studied), in order to question several possible evolutionary patterns of interaction between plants and phytophagous insects.

Our results highlight a high host-plant use taxonomic conservatism in Bruchidae (most of the species which are phylogenetically related are associated with host-plants which belong to the same botanical tribe). Yet, the phylogenies of bruchids and the phylogenies of their host-plants are not congruent. For the African species studied, the nature of the seed secondary compounds appears to be the major factor driving the diversification of the species specializing on the subfamilies Caesalpinioideae and Mimosoideae (Fabaceae). This result is consistent with the model of chemical specialization in which insects diversify on plants with similar secondary compounds. Moreover, our results indicate that the evolutive radiation undergone by the genus *Bruchidius* in the Old World is very similar to the radiation of the genus *Acanthoscelides*, which occupy the same ecological niches in the New World. Not only this study has specified the factors which could account for the diversification of these insects, but it has clarified the systematics of the family Bruchidae and highlighted the paraphyletic status of several groups. This work confirms the interest of seed-beetles, and especially *Bruchidius*, as a relevant model to study the evolution of plant-insect relationship.

Introduction

Cette thèse s'intéresse à un modèle biologique donné, le genre *Bruchidius* (Coleoptera, Bruchidae), pour avancer dans la compréhension des mécanismes à l'origine de l'évolution des insectes phytophages. L'objectif est ici de préciser, via la prise en compte d'hypothèses phylogénétiques concernant les insectes et leurs plantes hôtes, comment s'est faite la diversification du genre *Bruchidius*. Il semble aussi important de caractériser la spécificité d'hôte des espèces du genre *Bruchidius*, au moyen d'une étude exhaustive qui va inclure des données de la littérature et des données de terrains. Enfin, en plus de l'acquisition de résultats destinés à comprendre les modalités d'évolution du groupe étudié, cette thèse doit permettre de clarifier la systématique des espèces étudiées. La thèse s'articule autour de trois parties distinctes.

La première partie de la thèse est relative aux insectes phytophages et à leur évolution. Elle s'intéresse tout d'abord aux insectes phytophages dans leur ensemble, puis elle se focalise peu à peu sur le modèle d'étude, c'est à dire les coléoptères Bruchidae du genre *Bruchidius*. De nombreux points sont abordés dans cette partie, mais une place importante est réservée à la définition des principaux patrons d'interactions évolutives entre plantes et insectes phytophages.

La seconde partie de la thèse présente de façon synthétique les trois principales méthodes de reconstruction phylogénétique (méthodes phénétiques, méthode cladistique et méthodes probabilistes). Une importance toute particulière est donnée à une méthode probabiliste en particulier, l'inférence bayésienne. Différents points spécifiques relatifs aux analyses des données contenues dans ce rapport sont également présentés dans cette partie comme le traitement de jeux de données multiples, ou encore de l'estimation de la robustesse des topologies obtenues au moyen de différentes méthodes statistiques.

Par ailleurs, deux articles sont inclus à la fin de ces deux parties, afin d'illustrer certains points relatifs à ces parties.

La dernière partie est consacrée à l'étude du modèle *Bruchidius* à proprement parler. Elle permet de tester la validité de certaines hypothèses explicatives relatives à l'évolution des insectes phytophages. Dans cette partie les matériels et méthodes sont détaillés, avant la présentation des résultats majeurs de la thèse sous la forme de trois articles dont les résultats sont discutés.

Première partie : des insectes et des plantes ...

Chapitre premier : L'évolution des insectes phytophages

Section I. Les insectes phytophages : Généralités.

1.1. Diversité des insectes phytophages

Avec près d'un million d'espèces décrites à ce jour et certainement plusieurs millions d'espèces à découvrir, les insectes² représentent plus de la moitié des organismes vivants connus et ils ont ainsi le groupe qui a opéré la plus spectaculaire diversification sur terre (Daly *et al.*, 1998). Ils ont colonisés presque tous les milieux terrestres hormis les plus extrêmes (pôles ou sommets des montagnes par exemple), et ils se sont adaptés à de nombreux milieux aquatiques (à l'exception du milieu marin dont ils sont quasiment absents).

Si l'on considère la diversité actuelle de la faune entomologique, on peut remarquer que plus de la moitié des espèces connues sont des phytophages³ (Southwood, 1973 ; Strong *et al.*, 1984 ; Daly *et al.*, 1998).

Il est important de souligner le fait que le terme de « phytophage » employé ici suit la définition de Strong *et al.* (1984). Ces derniers définissent la phytophagie comme la consommation de tissus vivants provenant de plantes terrestres vascularisées⁴ (Trachéophytes). Cette définition exclue donc les espèces se nourrissant d'algues, de champignons et de mousses mais aussi tous les consommateurs de bois mort, de litière ou encore de nectar. Les espèces se nourrissant de pollen sont également exclues tout comme les espèces dont seul le stade adulte consomme des tissus de plantes (Mitter *et al.*, 1988). Par contre, des insectes dont les stades larvaires consomment des tissus végétaux vivants sont considérés comme phytophages même si leur stade adulte adopte un régime alimentaire différent (Lépidoptères par exemple).

Afin d'appréhender plus facilement les éléments de systématique et de phylogénie qui sont propres aux insectes, une hypothèse phylogénétique « classique » (Kristensen, 1991), représentant les principaux groupes d'insectes et d'Hexapodes, est figurée sur la page suivante (Fig. 1.1.). Par ailleurs, les ordres d'insectes qui comprennent des phytophages sont spécifiquement indiqués sur ce cladogramme.

² le terme 'insecte' est utilisé classiquement pour désigner les Hexapodes présentant des pièces buccales visibles (Ectognathes). Ils sont aussi caractérisés par l'absence de muscles antennaires au delà du premier article (le scape) et la présence d'un organe chordonotal dans le second article des antennes (le pédicelle).

³ issu du grec *phuton* (plante) et *phagein* (manger)

⁴ groupe caractérisé par la présence de xylème et de phloème. Ce groupe rassemble les Ptéridophytes, les Prespermaphytes et les Spermaphytes (les « plantes à graines »)

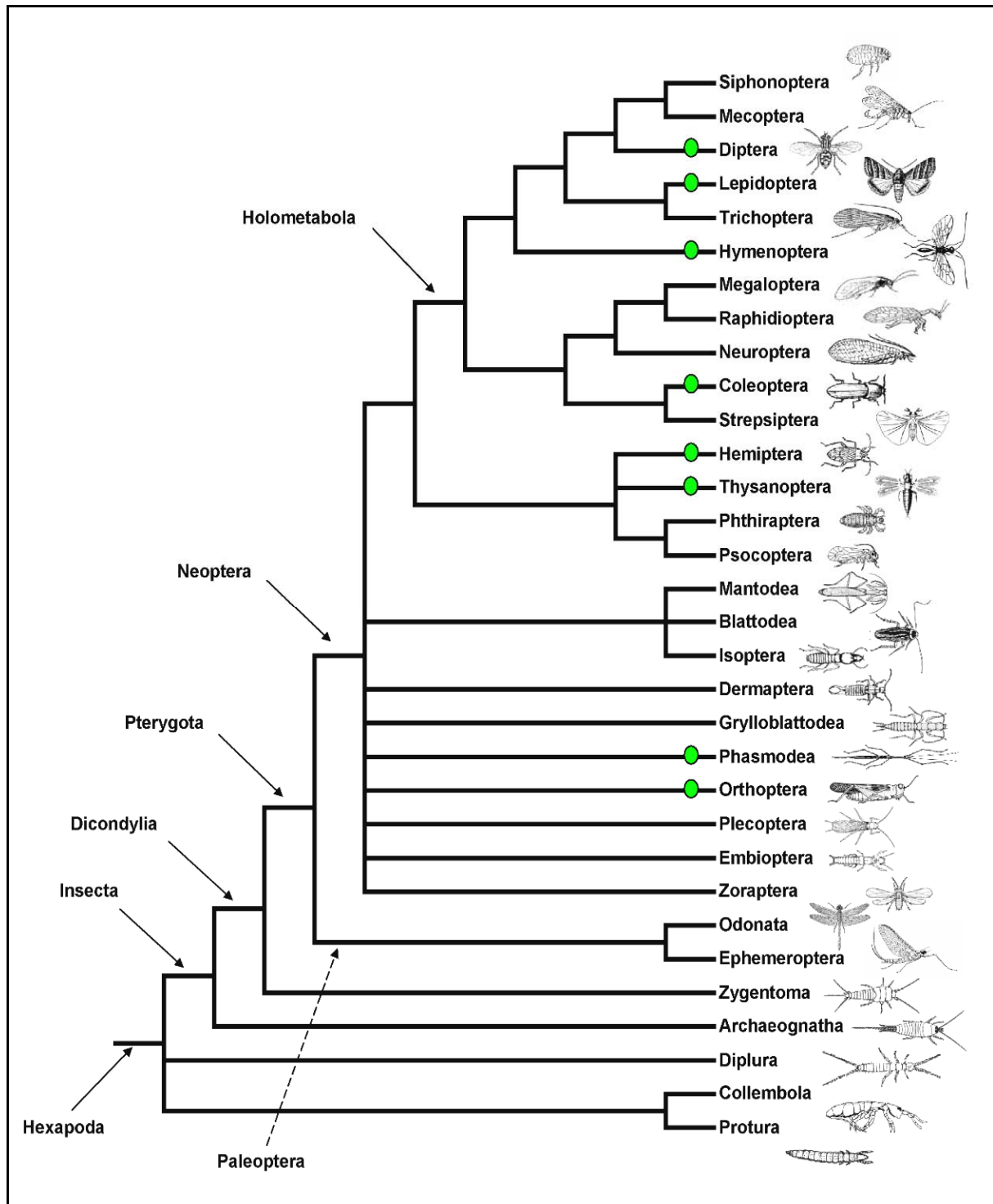


Figure 1.1. Hypothèse phylogénétique pour les Hexapodes (figurant les différents ordres connus⁵) basée sur une analyse cladistique de caractères morphologiques (modifiée d'après Kristensen, 1991). Quelques uns des clades majeurs d'Hexapodes sont indiqués par des flèches (Insecta, Dicondylia, Pterygota, Neoptera et Paleoptera). Les principaux ordres d'insectes comprenant des phytophages (d'après Bernays & Chapman, 1994) sont indiqués par des ronds.

⁵ à l'exception des Mantophasmodea, découverts récemment (Klass *et al.*, 2002)

1.2. Le développement de la phytophagie

Chez les insectes, le passage de la prédation ou d'un régime détritivore vers de la phytophagie s'est fait à de multiples reprises dans plusieurs lignées. Ainsi, Mitter *et al.* (1988) estiment que la phytophagie est apparue cinquante fois dans diverses lignées d'insectes.

Néanmoins cette transition vers la phytophagie ne s'est faite que pour un nombre restreint de groupes d'insectes. Ainsi, l'on trouve la majorité des insectes phytophages dans 8 des 30 ordres d'insectes actuels (Bernays & Chapman, 1994) et les plus nombreux sont les Lépidoptères⁶ et des Coléoptères appartenant pour la plupart au clade Phytophaga⁷ (Fig. 1.2.).

Ce constat est repris par Strong *et al.* (1984) qui considèrent que "l'utilisation des plantes terrestres constitue une barrière évolutive⁸ que la plupart des groupes d'insectes n'ont manifestement pas réussi à franchir. Cependant, une fois l'obstacle franchi, la radiation peut-être extrême". Cette radiation est alors facilitée par l'importante biomasse disponible et par la grande variété des ressources offertes par les plantes terrestres, ainsi que par l'absence probable de compétition interspécifique entre phytophages (Strong *et al.*, 1984) pour une ressource donnée. De nombreuses études rejoignent l'hypothèse de Strong *et al.* (1984) et établissent un lien entre la diversification des insectes phytophages et la diversification des plantes terrestres, et plus particulièrement celle des Angiospermes (Mitter *et al.*, 1988 ; Farrell, 1998 ; Marvaldi *et al.*, 2002). En effet, la quasi totalité des plantes consommées sont des Angiospermes, qui représentent la majorité des espèces de Spermatophytes décrites (257 000 espèces sur près de 270 000 ; Judd *et al.*, 2002).

		Espèces		Nbre d'espèces			
Ordre		phytophages		total	Ordre	phytophages	
	Coleoptera	~ 135,000		~ 300,000		Lepidoptera	~ 140,000
	Diptera	~ 30,000		~ 150,000		Orthoptera	~ 20,000
	Hemiptera	~ 45,000		~ 55,000		Phasmodea	~ 2,500
	Hymenoptera	~ 10,000		~ 150,000		Thysanoptera	~ 4,500

Figure 1.2. Estimation du nombre d'espèces de phytophages (d'après Bernays & Chapman, 1994) et du nombre d'espèce total (d'après Daly *et al.*, 1998) des 8 ordres d'insectes qui regroupent la majorité des insectes phytophages.

⁶ à l'exception de 6 % des espèces qui sont à l'état larvaire des détritivores, des consommateurs de végétaux morts, des prédateurs, des parasitoïdes ou des nécrophages (Powell *et al.*, 1999).

⁷ clade regroupant les superfamilles Chrysomeloidea et Curculionoidea

⁸ Southwood (1973) définit cet obstacle évolutif par les trois points suivants : (i) risques de dessiccation accrus pour des insectes phytophages plus exposés que des insectes se nourrissant dans la litière; (ii) dépendance spatio-temporelle à des hôtes donnés; (iii) faibles valeurs nutritives des tissus consommés qui présentent souvent des défenses associées (chimiques ou physiques)

1.3. La spécialisation chez les insectes phytophages

Le succès évolutif des insectes phytophages a été souvent associé au fait que la majorité des espèces d'insectes phytophages ne consomment qu'une fraction des plantes hôtes potentielles disponibles dans leur environnement, et présentent une spécialisation trophique marquée (Futuyma & Moreno, 1988 ; Bernays & Chapman, 1994 ; Thompson, 1994 ; Marvaldi *et al.*, 2002). Cette spécialisation correspond donc à deux tendances distinctes mais complémentaires.

La première tendance est que la majorité des espèces d'insectes phytophages se nourrit sur des groupes de plantes particuliers (Strong *et al.*, 1984 ; Futuyma & Moreno, 1988 ; Jaenike, 1990 ; Ward & Spalding, 1993 ; Bernays & Chapman, 1994 ; Funk *et al.*, 2002). Cette spécialisation alimentaire (sur un spectre d'hôte limité) est plus ou moins marquée et l'on distingue ainsi, au sein de ces insectes spécialistes, les espèces monophages des espèces oligophages. Les espèces monophages ne se nourrissent que sur une seule espèce de plante donnée⁹, alors que les espèces oligophages se nourrissent sur un nombre limité d'espèces appartenant généralement à un ou plusieurs genres d'une même famille botanique. A contrario, une espèce est considérée comme généraliste quant elle a un régime alimentaire polyphage. Ce dernier se caractérise par le fait de se nourrir sur des plantes appartenant à des familles botaniques différentes. Ces définitions de la monophagie, de l'oligophagie et de la polyphagie ont ici une valeur qualitative et non quantitative. En effet, il est plus informatif de faire un distinguo entre une espèce qui se nourrit sur 10 plantes appartenant à un même genre, et une espèce qui se nourrit sur 10 plantes appartenant à 10 familles botaniques distinctes. Plus de 75 % des espèces de phytophages sont strictement monophages ou oligophages (Bernays & Chapman, 1994) et seuls les Orthoptères comptent une majorité (environ 70 %) d'espèces polyphages. Un des corollaires de cette spécialisation alimentaire est le conservatisme taxonomique dans les associations plantes-insectes. Il y a conservatisme taxonomique dans les associations plantes-insectes quand des espèces d'insectes phytophages apparentées se nourrissent sur des plantes qui le sont également (Dethier, 1954 ; Ehrlich & Raven, 1964 ; Jermy, 1984).

La seconde tendance correspond à une spécialisation trophique marquée sur des parties ou organes bien précis de plantes (bois, graines, feuilles, fruits, racines et tiges par exemple). Cette spécialisation est généralement la règle chez les stades larvaires des insectes holométaboles¹⁰ endoptérygotes et elle est va souvent de pair avec une spécialisation sur des groupes de plantes particuliers. On distingue également les espèces ectophytes (se nourrissant de tissus externes) des espèces endophytes (se nourrissant de tissus internes). Les espèces endophytes sont généralement plus spécialisées (Anderson, 1995 ; Gaston *et al.*, 1992 ; Marvaldi *et al.*, 2002). Chez les microlépidoptères, il apparaît ainsi que 72 % des espèces se nourrissant de tissus internes de plantes sont associés à un seul genre botanique contre moins de 50 % pour les espèces ne se nourrissant pas de tissus internes (Bernays & Chapman, 1994).

⁹ certains auteurs (Bernays & Chapman, 1994 ; Daly *et al.*, 1998) proposent également une définition moins stricte de la monophagie dans laquelle une espèce qui se nourrit sur un nombre restreint de plantes proches appartenant au même genre pourrait être considéré comme monophage *sensu lato*.

¹⁰ insectes à métamorphose complète

Un autre exemple est donné par les bruches, un groupe de Coléoptères cléthrophages¹¹ (Johnson, 1981) où, à de rares exceptions près, chaque espèce est associée à des plantes appartenant à une seule famille botanique.

1.4. La sélection des plante-hôtes

Le fait que la plupart des espèces d'insectes phytophages soient associées à un nombre restreint de plantes-hôtes (ou nourricières) implique la sélection de ces dernières au moyen de différents sens (olfaction, vision, toucher, gustation), à un stade donné de la vie de l'insecte. Pour ce faire, l'insecte doit être capable de détecter des plantes particulières à distance, puis une fois au contact, il doit être en mesure de confirmer la valeur de la plante comme substrat de ponte ou comme source de nourriture (Bernays & Chapman, 1994).

La première étape (détection à distance) met en jeu des stimuli visuels, des composés chimiques volatils, ou les deux à la fois.

Les stimuli visuels correspondent à des couleurs ou encore à des formes (de tailles données). En général, les insectes phytophages vont être attirés par des longueurs d'ondes correspondant à des tons de vert ou de jaune (Bernays & Chapman, 1994). En ce qui concerne les formes, les réponses sont très variables selon l'espèce considérée et son stade de développement. Ainsi chez *Rhagoletis pomonella*, un Diptère Tephritidae dont la larve se développe dans des pommes, les adultes parviennent à associer des formes avec des couleurs données (Prokopy, 1968 ; Prokopy *et al.*, 1983). Les adultes sont ainsi majoritairement attirés par des rectangles jaunes (qui correspondent à des feuilles) et par des sphères de couleur verte ou rouge (qui correspondent à des fruits).

Les composés chimiques volatils qui agissent à distance sont des attractifs, qui induisent chez l'insecte des mouvements orientés vers la source de l'odeur, ou des répulsifs qui ont un effet inverse (Dethier *et al.*, 1960 ; Visser, 1986 ; Bernays & Chapman, 1994).

Une fois au contact de la plante les insectes peuvent faire appel à la gustation ou au toucher (mécanoréception), en plus de l'olfaction et de la vision. De nouveau, des composés chimiques présent à la surface des plantes (ou accessibles si l'insecte mord ou pique la plante) jouent un rôle important dans l'acceptation ou la non acceptation de la plante par l'insecte. Ces composés sont soit des stimulants¹² ou des déterrents¹³ selon leur action sur l'insecte (Dethier *et al.*, 1960). La texture du tégument de la plante (lisse ou pileux par exemple) revêt également une importance certaine dans le choix d'une plante donnée par l'insecte (Bernays & Chapman, 1994).

La sélection des plantes par les insectes phytophages semble donc s'inscrire dans un cadre bien défini. Néanmoins, dans la nature, de nombreuses observations font état d'erreurs dans le choix des plantes nourricières et in vitro il est souvent possible d'induire de telles erreurs expérimentalement (Bernays & Chapman, 1994 ; Delobel *et al.*, 2000).

¹¹ se nourrissant de graines

¹² composés chimiques ayant des actions incitatives sur la nutrition (phagostimulant) ou l'ovoposition d'insectes phytophages

¹³ composés chimiques qui inhibent ou limitent la nutrition ou l'ovoposition d'insectes phytophages

1.5. Données fossiles

Les données fossiles apportent de nombreuses informations sur l'évolution et l'apparition des insectes phytophages.

Les premiers fossiles d'Hexapodes (des Collembolés et des insectes Archeognathes¹⁴) datent du Dévonien inférieur il y a près de 400 millions d'années (Ma) (Labandeira *et al.*, 1988 ; Jarzembowski, 2001). Ils sont aptères et ont des régimes alimentaires détritivores ou de prédateurs. Au Dévonien supérieur apparaissent les premiers insectes Ptérygotes qui sont surtout représentés par des Paléoptères¹⁵ (Ephéméroptères, Paléodictyoptères et Protodonates). La plupart des insectes ont alors des pièces buccales de type broyeur ou piqueur et les données fossiles (dégâts observés sur des fossiles de Lycophytes et de Spermatophytes) indiquent que la phytophagie se développe à cette période. Les premières lignées de Néoptères¹⁶ tel que les Hémiptéroïdes¹⁷ apparaissent également à cette période.

Au Carbonifère supérieur vers -300 Ma, on trouve les premières occurrences fossiles attestant de dégâts (des galles) pouvant être attribués à des insectes Néoptères holométaboles (Labandeira & Phillips, 1996).

Au Permien, d'importants changements climatiques modifient la flore (passage d'une flore paléophytique à une flore mésophytique (Labandeira & Eble, in press) et parallèlement les insectes Néoptères supplantent les insectes Paléoptères. A la fin du Permien, qui voit près de 50 % des espèces animales disparaître, la plupart des groupes de Paléoptères s'éteignent.

Il faut attendre le Trias moyen et supérieur pour voir un réel essor des groupes qui caractérisent la faune entomologique actuelle : Coléoptères Polyphaga, Diptères, Grylloblattodea, Hétéroptères, Hyménoptères, Odonates, Phasmatodea, Thysanoptères et Trichoptères (Labandeira & Eble, in press). Cette radiation s'accompagne d'une très grande diversification et spécialisation des pièces buccales chez les insectes (y compris chez les insectes phytophages).

Au Jurassique (-208, -144 Ma), la grande majorité des ordres et familles d'insectes contemporains sont déjà représentés (apparition des premiers Lépidoptères par exemple) et certains auteurs (Labandeira & Eble, in press) soutiennent que l'accroissement de la diversité familiale des insectes a lieu à cette période. Les travaux de Labandeira sur les Lépidoptères (Labandeira, 1994) suggèrent ainsi que la plupart des clades majeurs de Lépidoptères existaient avant l'apparition des Angiospermes. Ces clades correspondent en outre à des groupes présentant des pièces buccales fortement modifiées (voir Fig. 1.3.).

¹⁴ groupe d'Hexapode basal (insectes *sensu stricto*) présentant des pièces buccales externes (Ectognathes) avec des caractères primitifs (articulation des mâchoires dite mono-condylienne)

¹⁵ groupe qui présente les caractères suivants : (i) ailes rigides non susceptibles de se replier en arrière au repos; (ii) ailes antérieures ne recouvrant jamais les ailes postérieures; (iii) pièces buccales broyeuses; (iv) développement de type hémimétabole

¹⁶ groupe qui présente les caractères suivants : (i) ailes équipées d'un champ jugal ou *neala*; (ii) ailes se repliant en arrière au repos

¹⁷ super-ordre rassemblant les ordres suivants : Hemiptera, Phthiraptera, Psocoptera, Thysanoptera et Zoraptera

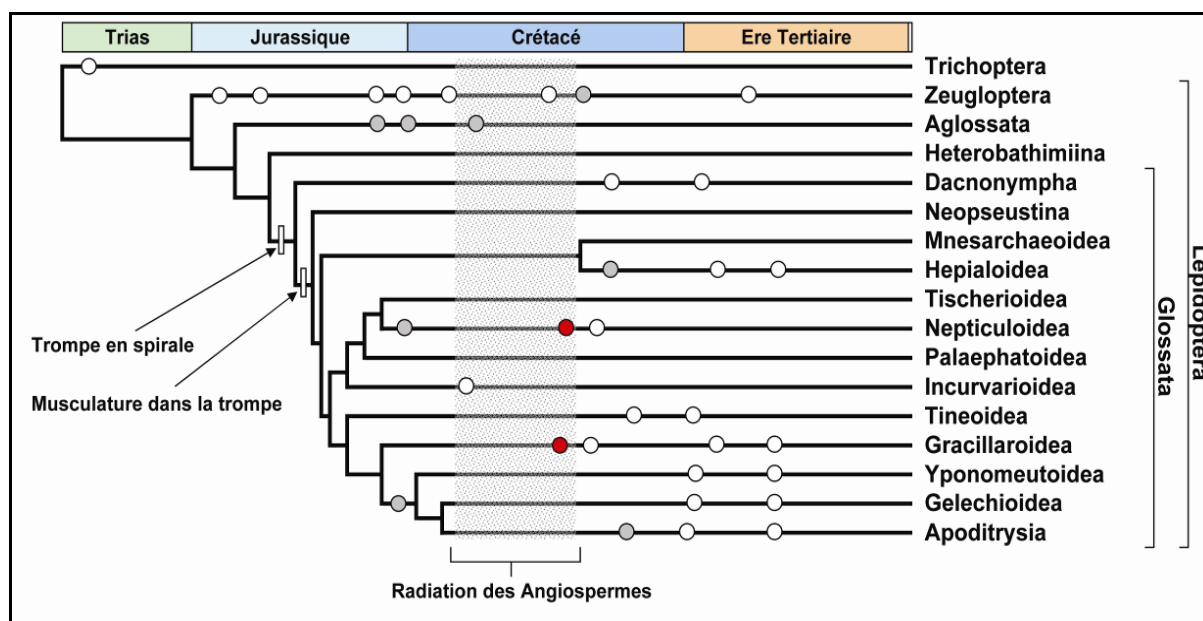


Figure 1.3. Ce cladogramme (modifié d'après Labandeira, 1994) met en correspondance une hypothèse phylogénétique pour les Lépidoptères avec une échelle des temps géologiques (qui situe également la radiation des Angiospermes). Deux synapomorphies importantes sont figurées sur ce cladogramme ainsi que les occurrences fossiles pour les Lépidoptères (des ronds blancs figurent des occurrences fossiles reconnues, des ronds grisés des occurrences incertaines, et des ronds rouges des occurrences proposées par l'auteur).

Néanmoins, cette hypothèse est remise en question par d'autres interprétations des données fossiles (Grimaldi, 1999) et par des analyses moléculaires (Wiegmann *et al.*, 2000) qui indiquent qu'une radiation basale des Lépidoptères sur les Angiospermes (plantes à fleurs) au Crétacé serait plus vraisemblable.

Au Crétacé (-144, -65 Ma) de nombreux groupes d'insectes poursuivent leur diversification et tout particulièrement les groupes associés à la radiation des Angiospermes qui a lieu à la même période (l'apparition des Angiospermes date du début du Crétacé, vers -135 Ma).

La faune entomologique du Crétacé est retrouvée au Cénozoïque et ne semble pas avoir souffert autant que d'autres faunes ou flores des extinctions de la fin du Crétacé (la crise "K/T") même si à un niveau régional la diversité spécifique des phytophages semble avoir diminué après cette période, au détriment principalement des taxons les plus spécialisés (Labandeira *et al.*, 2002). A l'ère Tertiaire cette diversification se poursuit (parallèlement à celle des Angiospermes, en particulier les herbacées), et la faune entomologique de cette ère est très similaire à celle que l'on connaît actuellement (Labandeira & Eble, in press ; Wilf *et al.*, 2001). Ainsi au Pleistocène on retrouve des fossiles d'insectes appartenant à 617 des 1000 familles connues actuellement (Labandeira & Eble, in press).

Les données fossiles apportent aussi des informations très intéressantes sur l'ancienneté de certaines associations plantes-insectes. Certains Coléoptères Phytophaga¹⁸ sont ainsi associées à des Cycadales ou à des Conifères depuis près de 200 Ma (Farrell, 1998). Pour expliquer l'existence d'un tel conservatisme, on doit s'interroger sur la nature des contraintes qui influencent les phénomènes de changements d'hôtes, et donc de spéciation.

¹⁸ des Coléoptères Curculionoidea, Belidae et Nemonychidae

1.6. Apports des études comparatives

Selon Simpson (1953), la diversification d'une lignée d'organismes est accélérée par des opportunités écologiques telles que la dispersion dans un écosystème vierge de compétiteurs, par l'extinction de compétiteurs, ou encore par l'adoption d'un nouveau mode de vie. Ce dernier point fait référence au concept de zone adaptative¹⁹ qui est fréquemment invoqué pour expliquer l'histoire de nombreux groupes d'organismes (Berenbaum, 1983 ; Berenbaum *et al.*, 1996 ; Schluter, 2000). La phytophagie peut être considérée comme l'adoption d'un nouveau mode de vie, et les plantes comme une nouvelle zone adaptative pour les insectes.

Mitter *et al.* (1988) furent les premiers à tester l'hypothèse selon laquelle le passage à la phytophagie pour un groupe d'insecte donné en augmente la diversité spécifique. Pour estimer l'incidence de la phytophagie sur la diversification des insectes ils ont utilisé la méthode dite des contrastes. Cette approche comparative repose sur la comparaison de la diversité spécifique de groupes-frères et fait donc appel à des hypothèses phylogénétiques. Ils observent que les clades de phytophages comptent plus d'espèces que leurs groupes-frères non phytophages (prédateurs ou détritivores) pour 11 des 13 groupes-frères étudiés). En moyenne le nombre d'espèces dans les clades de phytophages est 20 fois supérieur à celui des clades non phytophages (cf. exemple Fig. 1.4.).

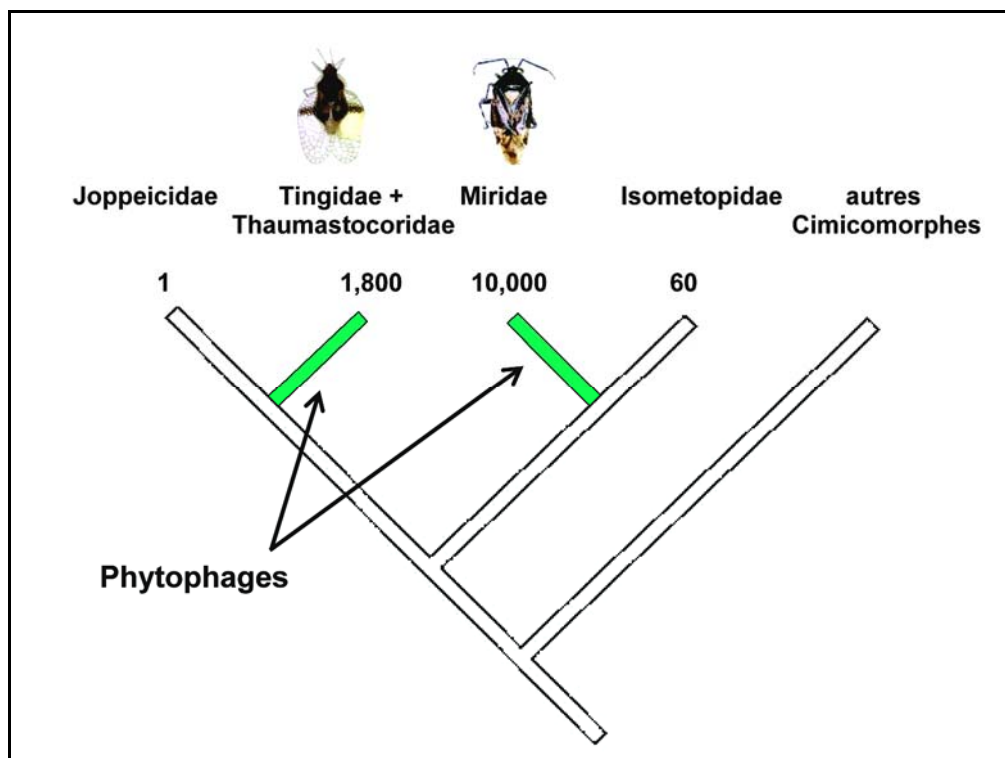


Figure 1.4. Ce cladogramme (modifié d'après Mitter *et al.*, 1988 et Schluter, 2000) illustre l'approche comparative qui a été utilisée par la méthode des contrastes (ici chez des Hémiptères). On observe que les groupes frères (ici des familles) non phytophages présentent une diversité spécifique bien moindre que les groupes strictement phytophages.

¹⁹ 'adaptive zone'

Une étude comparable a été menée ultérieurement (Farrell, 1998) sur les Coléoptères du clade Phytophaga qui rassemble la très grande majorité des Coléoptères phytophages. Cet auteur s'intéresse plus spécifiquement à l'impact de la radiation des Angiospermes sur la diversification des Phytophaga, un groupe primitivement associé aux Gymnospermes d'après les données fossiles.

Farrell constate que les lignées associées aux Angiospermes sont de très loin celles qui présentent la plus grande diversité spécifique (en moyenne leur nombre d'espèces est 170 fois supérieur). Par ailleurs, en calibrant une horloge moléculaire pour sa phylogénie, il estime qu'il y a eu au Crétacé, parallèlement à la radiation initiale des Angiospermes, 5 radiations indépendantes de Coléoptères Phytophaga sur les plantes à fleurs.

Les données fossiles soutiennent en partie cette hypothèse. Elles indiquent qu'au Jurassique la phytophagie est répandue dans près de 50 % des genres de Coléoptères connus (cf. Fig. 1.5.), mais ce nombre est relativement faible. Il l'est encore plus au Crétacé, en raison du faible nombre de fossiles de Phytophaga mis à jour pour cette période, ce qui ne permet pas de préciser l'impact supposé de la radiation initiale des Angiospermes sur la radiation des Coléoptères phytophages.

Au Tertiaire, le nombre de genres fossiles découverts est plus important et il reflète le fort accroissement de la diversité des Coléoptères phytophages, qui est vraisemblablement en liaison avec l'accroissement exponentiel de la diversité des Angiospermes, et en particulier de celle des plantes herbacées.

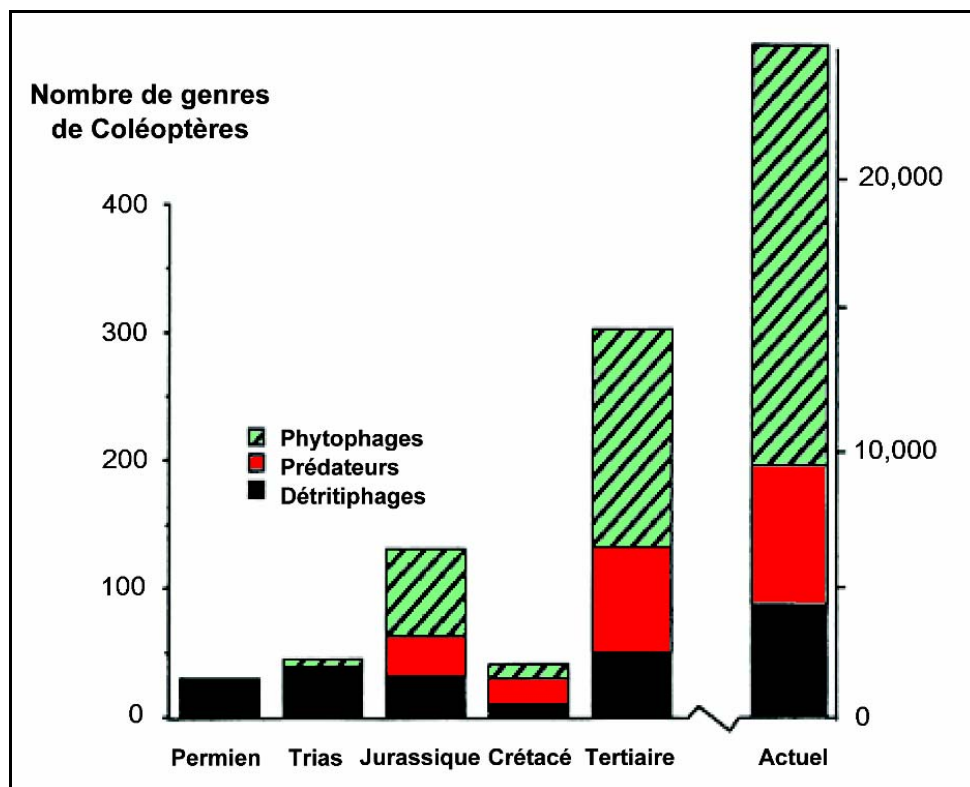


Figure 1.5. Schéma (modifié d'après Farrell, 1998) qui illustre l'accroissement du nombre de genres de Coléoptères Phytophaga à travers les âges géologiques.

Section II. Hypothèses explicatives : Principaux patrons d'interactions évolutives entre plantes et insectes phytophages

2.1. Problématique

Une grande diversité et une certaine complexité caractérisent les relations évolutives entre plantes et insectes phytophages. En effet, si ces derniers ont en général un impact négatif envers les plantes, de nombreuses espèces d'insectes phytophages (des Coléoptères, Diptères, Hyménoptères et Lépidoptères) jouent un rôle important dans la pollinisation des plantes à fleurs (mutualisme).

La plupart des études sur l'évolution des insectes phytophages ont mis en évidence leur spécialisation (spécialisation alimentaire ou spécialisation trophique). Cette spécialisation permet de discuter de nombreux concepts en biologie de l'évolution : niche écologique, spécialisation - spéciation écologique, radiation adaptative. La question de savoir si la spécialisation est toujours un état dérivé chez les insectes phytophages se pose également (la classique opposition spécialistes – généralistes). Plusieurs études récentes (Kelley & Farrell, 1998 ; Scheffer & Wiegmann, 2000 ; Janz *et al.*, 2001 ; Rubinoff & Sperling, 2002) tendent à montrer que la polyphagie peut constituer un caractère dérivé, et que la spécialisation ne constitue pas obligatoirement un état irréversible. Certaines études vont plus loin, et suggèrent un patron évolutif très dynamique dans lequel la polyphagie serait une phase évolutive transitoire qui apparaîtrait régulièrement et temporairement dans le processus de spécialisation (Janz *et al.*, 2001 ; Nosil, 2002).

Cette dynamique de spécialisation est souvent associée à des changements d'hôtes chez l'insecte (y compris envers des plantes phylogénétiquement éloignées). En effet, ces changements d'hôtes peuvent induire une extension du spectre alimentaire de l'insecte, mais ils peuvent aussi être à l'origine d'une dynamique de spéciation si le changement d'hôte est irréversible (Dobler & Farrell, 1999). Néanmoins, les contre-exemples sont nombreux et dans de nombreux groupes les changements d'hôtes envers des plantes phylogénétiquement éloignées sont rares (ce qui se traduit par un conservatisme taxonomique dans les associations plantes-insectes).

Il est très difficile d'explicitier avec précision les mécanismes évolutifs qui sont à l'origine de la diversité actuelle, et des associations et interactions entre plantes et insectes phytophages. Ce sujet est très débattu actuellement et il existe de nombreuses hypothèses explicatives, qui sont d'ailleurs souvent redondantes ou complémentaires. A ce titre, il est important de faire une revue des travaux sur le sujet afin de pouvoir mieux définir la problématique de l'étude de notre modèle et de pouvoir montrer en quoi son étude peut apporter une contribution significative à la meilleure compréhension de ces processus évolutifs.

Dans un premier temps, on rappellera le concept de coévolution au sens d'Ehrlich & Raven (1964). Ce modèle est le premier modèle explicite détaillant des mécanismes évolutifs susceptibles d'expliquer l'évolution des interactions plantes-insectes phytophages. Puis de nombreuses hypothèses alternatives seront présentées, afin d'avoir une vue d'ensemble de ce sujet très débattu.

2.2. La coévolution au sens d'Ehrlich et Raven

En 1964, Ehrlich & Raven publient une étude pionnière sur l'évolution des interactions entre plantes et insectes phytophages, basée sur l'étude des associations entre des Lépidoptères et leurs plantes hôtes. Selon eux les plantes et les insectes phytophages sont engagés dans une perpétuelle course aux armements dans laquelle les plantes développent en permanence de nouvelles défenses (composés secondaires toxiques en particulier).

Suivant ce modèle (« escape and radiation coevolution model of mutual diversification »), les groupes de plantes qui développent de nouvelles défenses échappent temporairement aux insectes phytophages et se diversifient rapidement, forts de cet avantage sélectif. Cependant, ces défenses sont elle-mêmes régulièrement contournées par certains groupes d'insectes phytophages (cf. Fig. 1.6.). Ces derniers bénéficient alors d'un avantage sélectif (nouvelles ressources à exploiter en l'absence de compétiteurs) et il peuvent alors se diversifier en retour sur les plantes dont ils ont neutralisé les défenses.

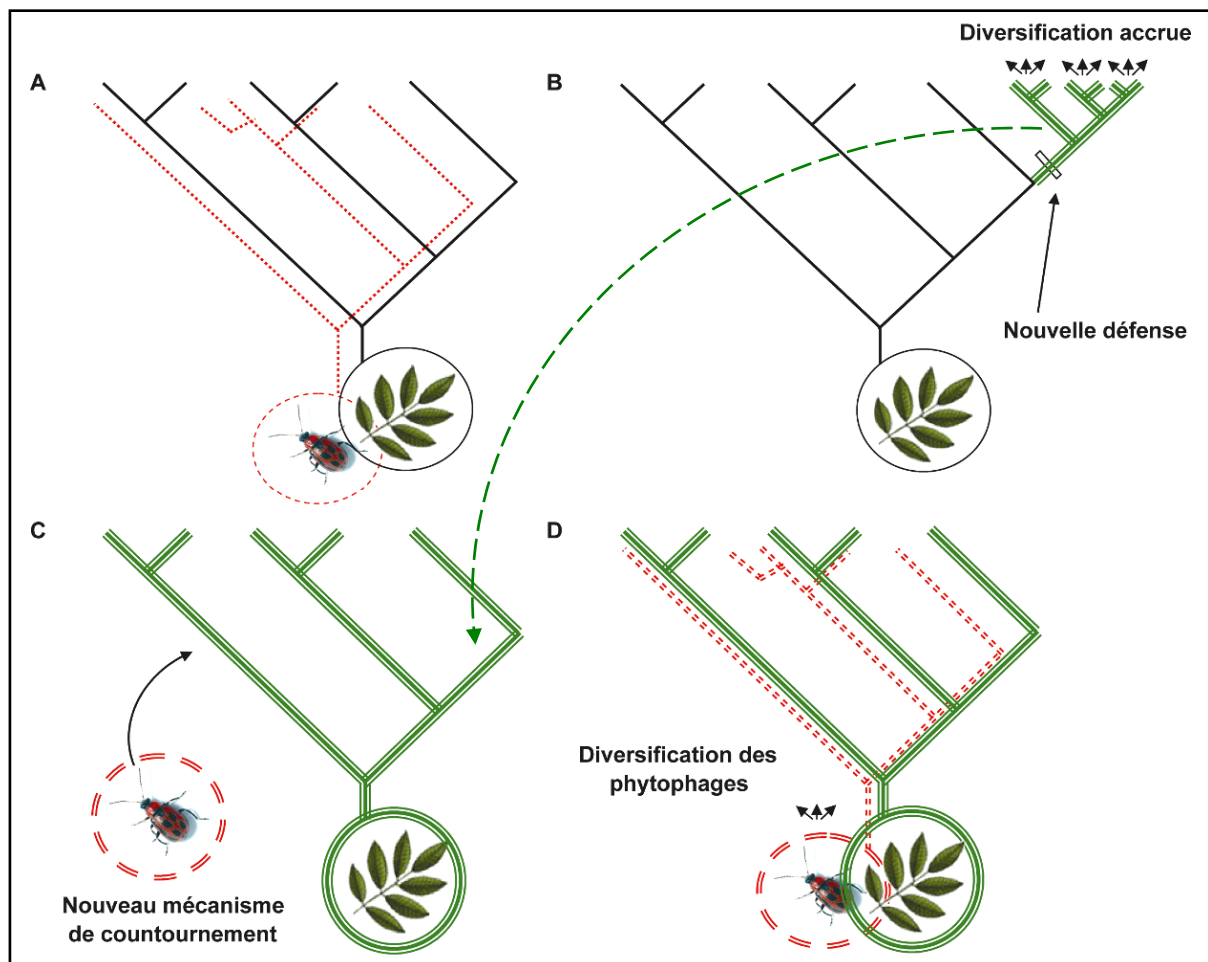


Figure 1.6. Schéma qui illustre la coévolution au sens d'Ehrlich & Raven. Les insectes se diversifient parallèlement aux plantes (A). Une lignée de plante arrive à échapper à la pression des phytophages en développant des nouvelles défenses, et elle se diversifie en conséquence (B). Une lignée d'insecte développe des mécanismes de contournement (C) qui lui permet de se diversifier sur les plantes qui étaient anciennement protégées (D). Ces interactions réciproques se répètent à l'infini lors de l'évolution des deux groupes.

Cette course aux armements stimule ainsi de façon réciproque la diversification des plantes et des insectes phytophages, à travers le développement permanent de nouveautés évolutives (« key innovations » au sens de Simpson, 1953). Selon Ehrlich & Raven, ces nouveautés correspondent majoritairement (pour les plantes) à des composés secondaires toxiques (mais voir aussi Janzen, 1969, 1981), et à des mécanismes de détoxification associés (pour les insectes phytophages).

Ces interactions réciproques entre plantes et insectes phytophages sont bien illustrées par la présence chez certaines plantes de canaux à latex ou à résine. Ces structures assurent une protection efficace contre les attaques d'insectes : à l'air libre, le liquide qu'elles exudent devient collant, et peut obstruer la cavité buccale ou engluier des insectes phytophages de petite taille (Farrell *et al.*, 1991 ; Dussourd, 1995). En plus de leurs propriétés physiques, le latex ou les résines contiennent très souvent des composés secondaires toxiques tels que des alcaloïdes, glycosides cardiaques ou terpenoïdes (Farrell *et al.*, 1991 ; Huang *et al.*, 2003), ce qui renforce fortement leur efficacité.

Ce type de défense est apparu indépendamment dans plus de 40 familles d'Angiospermes (Hunter, 1994), mais également chez des Gymnospermes ou des Gnetales (Farrell *et al.*, 1991). Dans la lignée d'autres études comparatives (Mitter *et al.*, 1988 ; Farrell, 1998), une étude de Farrell *et al.* (1991) a cherché à estimer l'impact de l'acquisition de ces défenses sur la diversification des groupes de plantes qui les ont développées. Les résultats de ces travaux indiquent que dans 13 des 16 groupes frères considérés, le groupe possédant des canaux à latex (ou à résine) est en moyenne 6 fois plus diversifié (Farrell *et al.*, 1991), ce qui rejoint les prédictions du modèle d'Ehrlich & Raven (étape B de la Fig. 5).

De façon intéressante, de nombreux groupes d'insectes phytophages ont développé des mécanismes de contournement de ces défenses, ce qui rejoint les hypothèses du modèle (étape C de la Fig. 5). Ils arrivent en effet à se prémunir du latex ou des résines en sectionnant des veines des feuilles, ou en creusant des tranchées en amont de la partie qui sera ultérieurement consommée (Farrell *et al.*, 1991 ; Zalucki & Malcolm, 1999 ; Becerra, 2003 ; Huang *et al.*, 2003). Ces groupes d'insectes ont également développé des mécanismes de détoxification des composés secondaires toxiques présents dans le latex ou les résines, et ils arrivent même dans certains cas, à séquestrer ces composés toxiques pour leur propre défense (voir par exemple Farrell & Mitter, 1998).

Enfin, plusieurs études récentes ont cherché à estimer le caractère synchrone de ces interactions à l'aide d'horloges moléculaires calibrées indépendamment (Farrell & Mitter, 1998 ; Farrell, 2001 ; Becerra, 2003). Ces travaux suggèrent que le développement de tels mécanismes de défense, et des parades associées, auraient pu se faire de manière synchrone au cours de l'histoire évolutive des plantes et des phytophages. S'il apparaît que les résultats de ces études vont dans le sens de la théorie d'Ehrlich & Raven (voir aussi Berenbaum, 1983), il est très difficile de démontrer que l'évolution de deux groupes donnés (plantes et phytophages) suit pas à pas ce modèle évolutif strict (Thompson, 1994). En effet, il faut : (i) démontrer le caractère synchrone de l'évolution des plantes et des phytophages mais aussi la réciprocité des interactions résultant d'une course aux armements entre plantes et insectes ; (ii) mettre en évidence la diversification accrue des deux groupes par rapport à des groupes frères qui n'ont pas développé des nouveautés évolutives comparables ; (iii) pouvoir inférer et comparer les cladogénèses respectives des plantes et des insectes.

Ceci explique en partie la formulation de nombreuses autres hypothèses explicatives, moins strictes que le modèle de coévolution d'Ehrlich & Raven pour décrire l'évolution des interactions plantes-insectes phytophages.

2.3. Hypothèses alternatives

2.3.1. La cospéciation ou co-cladogénèse

Miller en 1987 propose un modèle d'évolution dans lequel la diversification des insectes phytophages suit très précisément celle des plantes, et génère en conséquence des phylogénies congruentes (co-cladogénèse). Ce genre de patron évolutif se retrouve également dans de nombreux modèles hôtes-parasites des Vertébrés et il peut être vu comme une conséquence possible du modèle de coévolution stricte d'Ehrlich & Raven.

Néanmoins, contrairement à ce dernier, une cospéciation entre des plantes et des insectes phytophages n'implique aucune interaction réciproque entre les deux groupes (Thompson, 1994), et elle peut être temporellement décalée dans le temps (cad que la diversification des insectes peut être très postérieure à celle des plantes).

Malgré le nombre toujours croissant de travaux qui comparent les phylogénies des plantes avec celles des insectes phytophages, il n'existe que très peu d'exemples probants pouvant illustrer cette hypothèse de diversification des insectes phytophages. En outre, ce modèle met en jeu des espèces essentiellement monophages, et il exclu ainsi de facto la très grande majorité des espèces d'insectes phytophages.

On peut noter cependant l'étude publiée par Farrell & Mitter en 1990, où l'on observe une congruence quasi parfaite entre la phylogénie des plantes et des insectes phytophages (voir Fig. 1.7.).

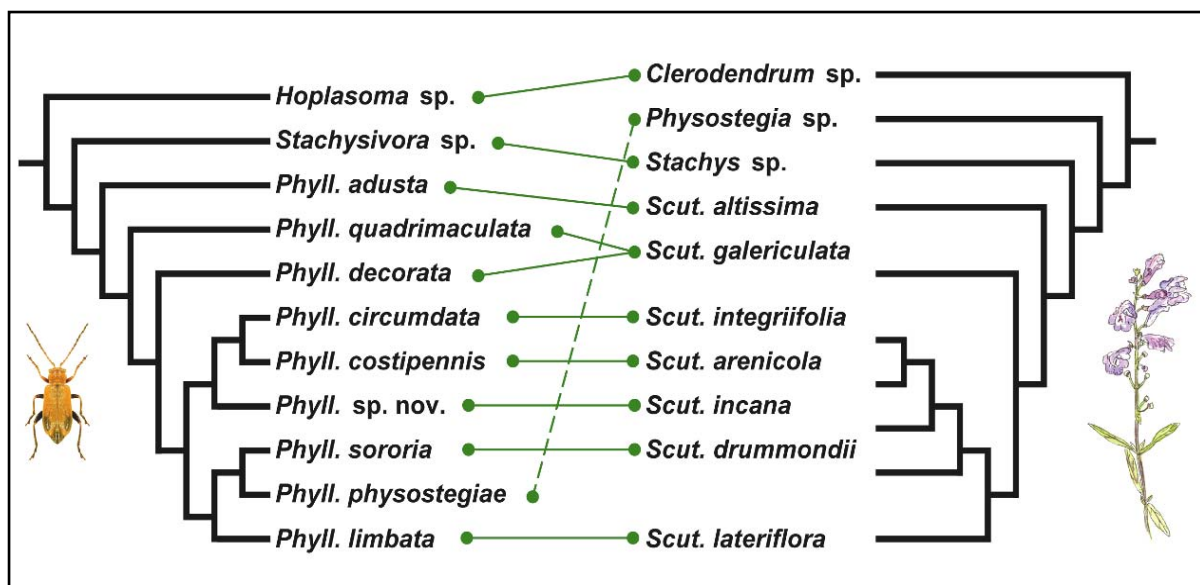


Figure 1.7. Schéma qui illustre la cospéciation entre des insectes phytophages appartenant au genre *Phyllobrotica* (Coleoptera, Chrysomelidae) et leurs plantes-hôtes appartenant au genre *Scutellaria* (modifié d'après Farrell & Mitter, 1990). On observe que la phylogénie des insectes (à gauche) est presque congruente avec celle des plantes (représentée à droite).

2.3.2. La spécialisation chimique

Dans le modèle de spécialisation chimique, la chimie des plantes va constituer la contrainte majeure dans l'évolution des insectes phytophages et les insectes vont se diversifier sur des plantes contenant des composés secondaires similaires. Comme pour le modèle de cospéciation, la spécialisation chimique n'implique aucune interaction réciproque entre les deux groupes et la diversification des insectes peut être postérieure à celle des plantes.

Si des plantes phylogénétiquement proches partagent des composés secondaires identiques le patron d'association plantes-insectes qui va résulter sera alors très conservatif et il sera difficile de distinguer ce qui relève de la spécialisation chimique de ce qui relève du conservatisme taxonomique.

Par contre, si la chémotaxonomie²⁰ des plantes ne correspond pas à leur phylogénie, on n'observera alors aucune congruence entre les phylogénies des plantes et des insectes phytophages (voir Fig. 1.8.). Un nombre limité d'études (Becerra, 1997 ; Garin *et al.*, 1999 ; Termonia *et al.*, 2001 ; Wahlberg, 2001) soutiennent cette hypothèse de spécialisation chimique. En effet, pour pouvoir tester cette hypothèse explicative, il faut donc pouvoir inférer les phylogénies des plantes et des insectes, mais aussi avoir accès à des informations précises sur les composés secondaires toxiques des plantes.

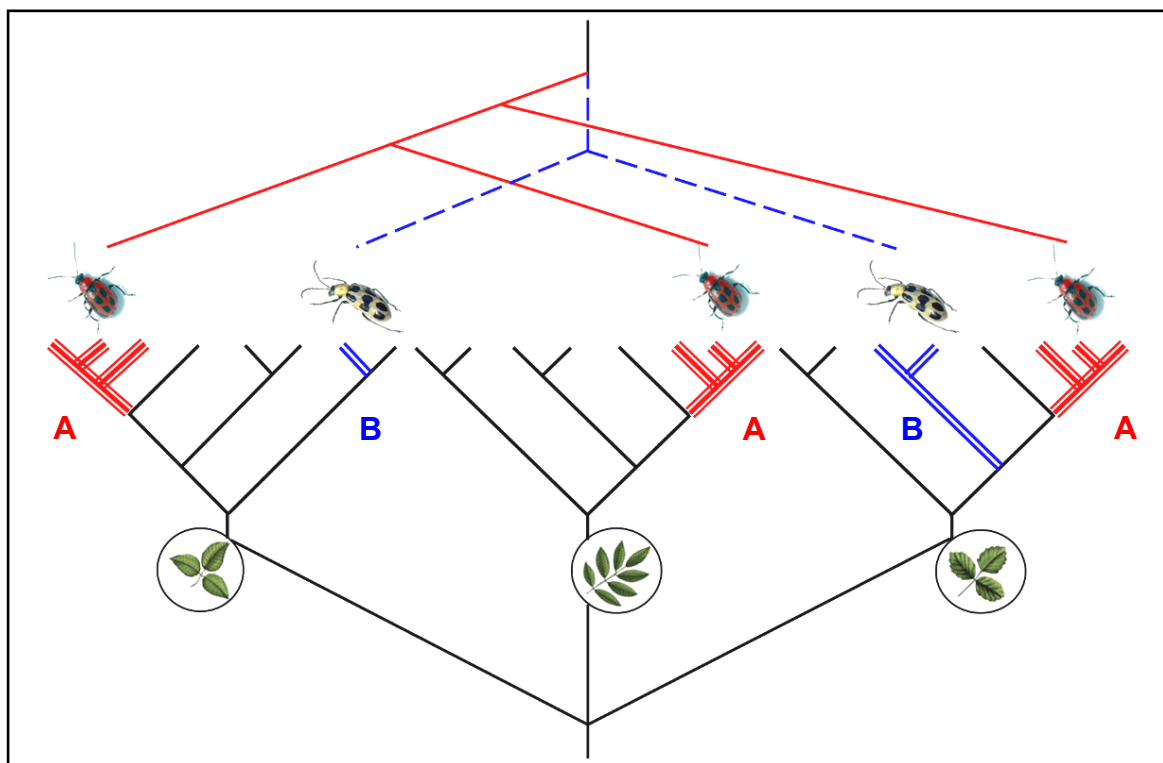


Figure 1.8. Schéma qui illustre le modèle de spécialisation chimique. Deux composés secondaires toxiques distincts (A et B) sont représentés sur la phylogénie des plantes. On observe que les insectes phytophages se diversifient en fonction de la chemotaxonomie des plantes et non de leur relations de parenté.

²⁰ regroupements taxonomiques basés sur des caractères chimiques

2.3.3. La spécialisation écologique (trophique)

Dans ce modèle, on peut distinguer deux facteurs distincts qui peuvent influencer la diversification des insectes phytophages.

Tout d'abord les insectes phytophages peuvent se spécialiser (et se diversifier) sur des plantes présentes dans des biotopes particuliers. Plusieurs études (Dobler *et al.*, 1996 ; Janz & Nylin, 1998) illustrent cette hypothèse: Janz & Nylin montrent ainsi, chez certains Lépidoptères Nymphalidae, que les associations plantes-insectes sont fortement influencées par le choix du biotope. Certaines espèces se spécialisent ainsi sur des biotopes donnés (clairières ou forêt par exemple), et se diversifient sur les plantes qui sont représentées dans ces milieux (et non en fonction de leur parenté phylogénétique, ou de leur chémotaxonomie).

Le modèle de spécialisation écologique peut aussi correspondre à une spécialisation sur des plantes, ou parties de plantes, ayant une architecture similaire. De nombreuses études vont dans ce sens et suggèrent que certains insectes phytophages se diversifient sur des plantes qui ne sont pas forcément apparentées, mais qui présentent des structures physiques similaires (Jordal *et al.*, 2000 ; Bucheli *et al.*, 2002 ; Marvaldi *et al.*, 2002).

Les résultats d'une étude sur le genre *Coleophora* (Lepidoptera, Coleophoridae) montrent ainsi une diversification des différents groupes d'insectes en fonction des parties de plantes consommées (herbacées vs ligneuses et graines vs feuilles), indépendamment des relation phylogénétiques de ces dernières (Bucheli *et al.*, 2002).

2.3.4. La colonisation éco-géographique

Dans le modèle précédent, l'évolution des insectes phytophages et leurs associations avec les plantes sont contraintes par de fortes adaptations envers des biotopes donnés ou des structures anatomiques des plantes.

Dans le modèle de colonisation éco-géographique, la contrainte majeure correspond à une capacité de dispersion limitée de l'insecte. En conséquence, les insectes phytophages vont se diversifier sur les plantes disponibles dans leur environnement géographique immédiat, ce qui favorise les changements d'hôtes entre des plantes qui peuvent être phylogénétiquement éloignées (ou qui sont différentes au niveau de leur chémotaxonomie).

Si plusieurs études illustrent cette théorie (Mardulyn *et al.*, 1997 ; Dobler & Farrell, 1999 ; Powell *et al.*, 1999 ; Gomez-Zurita *et al.*, 2000), les travaux de Gomez-Zurita *et al.* sur le genre aptère *Timarcha* (Coleoptera, Chrysomelidae) sont particulièrement pertinents. Ils montrent ainsi que certaines espèces polyphages de *Timarcha* se nourrissent de plantes appartenant à des familles botaniques différentes (Brassicaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae) selon l'altitude où ils se trouvent et les saisons.

2.4. Discussion et perspectives

Si certaines hypothèses explicatives permettent de mieux comprendre, voir d'expliciter l'évolution de certains groupes d'insectes phytophages, on peut difficilement faire des généralisations. En effet, l'évolution d'un groupe donné ne va que rarement dépendre d'un seul facteur à la fois, et si plusieurs facteurs (par exemple: des composés secondaires spécifiques, un type de biotope pour lequel l'insecte n'est pas adapté) contraignent fortement l'évolution d'un groupe donné, il sera alors difficile de dégager une seule hypothèse explicative (mais voir Bucheli *et al.*, 2002, et Fig. 1.9.).

Par ailleurs, des espèces appartenant à des lignées proches peuvent avoir évolué de façon complètement différente. On peut ainsi imaginer qu'au sein d'une lignée de phytophages très spécialisée, qui va évoluer en fonction de la chémotaxonomie des plantes-hôtes, se trouvent plusieurs espèces polyphages qui vont se spécialiser dans un biotope donné (indépendamment de la chimie des plantes). La plupart des études qui servent de référence (par exemple : Farrell & Mitter, 1990 ; Becerra, 1997) ont ainsi en leur sein des exceptions qui 'confirment la règle'.

Au moment d'étudier l'évolution d'un groupe de phytophage donné, il est important d'évaluer le plus grand nombre de contraintes évolutives possibles, afin de tester le plus grand nombre d'hypothèses explicatives. Ces études impliquent l'obtention d'hypothèses phylogénétiques pour les groupes d'insectes et de plantes que l'on considère, de données sur les composés secondaires des plantes, ainsi que des données biogéographiques et écologiques. Ce n'est qu'en appréciant ainsi le rôle de plusieurs facteurs sur la diversification d'un groupe que l'on pourra alors proposer un modèle synthétique qui décrira au mieux son évolution.

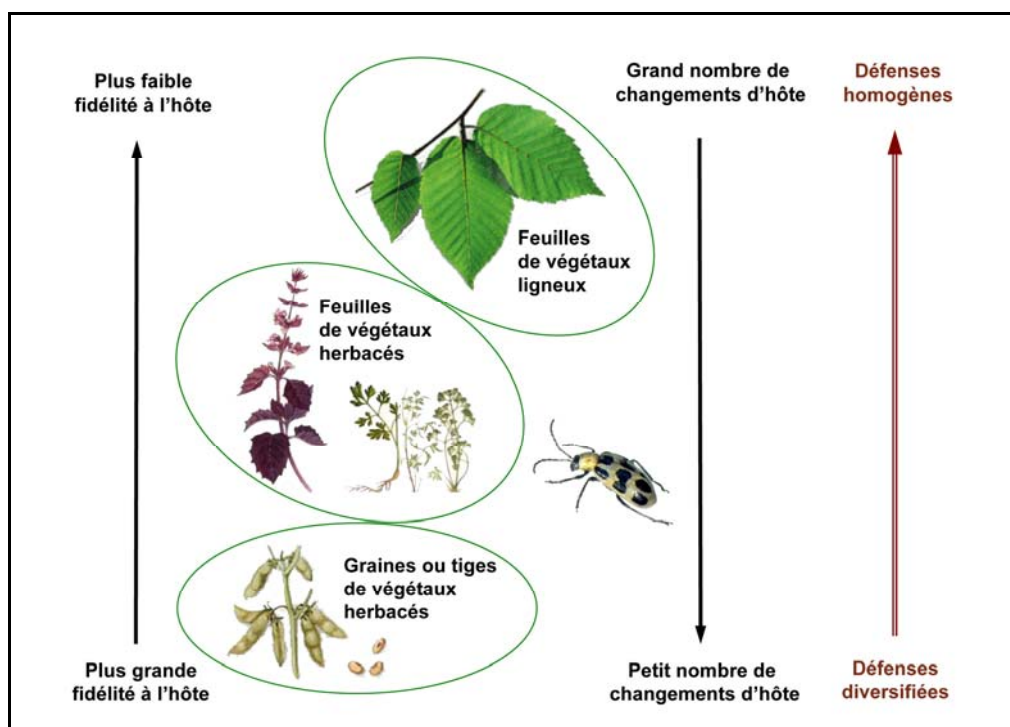


Figure 1.9. Schéma du modèle prédictif d'évolution du choix des plantes hôtes et du degré de spécialisation chez les insectes phytophages (modifié d'après Bucheli *et al.*, 2002).

Chapitre second : Les bruches comme modèle d'étude des relations évolutives plantes-insectes

Section I : Les bruches : généralités

1.1. Diversité et rang taxonomique

On trouve des membres de la famille des Bruchidae sur tous les continents (hormis l'Antarctique) et en particulier dans les régions chaudes du globe, où l'on observe la plus grande diversité spécifique. Avec plus de 60 genres et 1 700 espèces décrites à ce jour (Southgate, 1979 ; Johnson, 1994), les bruches ne représentent qu'une minorité des 135 000 espèces de Coléoptères phytophages (Lawrence, 1982). Néanmoins, en raison de leur écologie particulière²¹ et de nombreuses synapomorphies²², ils ont longtemps occupé une place à part au sein de la superfamille des Chrysomeloidea, et ils sont encore considérés comme une famille à part entière (au même titre que les Cerambycidae et les Chrysomelidae) par de nombreux auteurs. Jusqu'au milieu du 19^{ème} siècle les bruches sont incluses dans la famille des Curculionidae en raison de la segmentation homologue de leurs tarses (quatre segments apparents) et du profil allongé de leur tête (Borowiec, 1987a). Il faut attendre les travaux de Spinola en 1843, pour voir leur regroupement dans une famille distincte, la famille des Bruchidae. Par la suite, en 1845, Lacordaire rattache cette famille à l'ensemble des Phytophaga, Chrysomeloidea, et ce rattachement sera confirmé ultérieurement par LeConte & Horn (1883).

Le status de famille des Bruchidae n'est que rarement remis en question durant un siècle et demi (mais voir : Böving & Craighead 1931 ; Crowson 1953) et il faut attendre les travaux de Mann & Crowson en 1981 pour voir une remise en cause de leur rang taxonomique. Cette question fit récemment l'objet de nombreux débats (Kingsolver, 1995 ; Reid, 1996 ; Verma & Saxena, 1996 ; Lingafelter & Pakaluk, 1997 ; Schmitt, 1998) qui semblent déboucher actuellement sur un consensus croissant dans lequel les bruches sont considérés comme formant la sous-famille des Bruchinae, au sein des Chrysomelidae (C.D. Johnson, com. pers ; G. Morse, com. pers.). En effet, les bruches forment un groupe monophylétique (bien soutenu par des données morphologiques et moléculaires) qui a pour groupe-frère des Chrysomelidae de la sous-famille des Sagrinae (Kingsolver & Pfaffenberger, 1980 ; Borowiec, 1987a ; Kingsolver, 1995 ; Verma & Saxena, 1996 ; G. Morse, com. pers.). En conséquence, le rang taxonomique des bruches doit être similaire à celui des Sagrinae si l'on veut être en accord avec la classification des Chrysomeloidea (Borowiec, 1987a ; Reid, 1996), ou alors, pour ne pas rendre la famille des Chrysomelidae paraphylétique, il faudrait donner à toutes les sous-familles de Chrysomelidae le rang de famille (Böving & Craighead 1931 ; Reid, 1996).

²¹ le développement larvaire a lieu exclusivement dans des graines

²² état de caractère dérivé (apomorphe) partagé par plusieurs taxons

Dans la présente étude, qui ne s'intéresse qu'aux bruches, le rang de famille des Bruchidae est cependant maintenu, de façon à ne pas obscurcir la discussion sur la systématique des différents groupes de rangs inférieurs à la famille (à savoir sous-familles et tribus).

1.2. Morphologie

Les bruches sont des coléoptères de petite taille (4 mm en moyenne, mais certaines espèces peuvent atteindre 25 mm), au corps généralement trapu et de couleurs ternes (à dominante brunâtre). A l'instar des autres Coléoptères Phytophaga, seuls les 3 premiers articles et le dernier article des tarses (les tarsomères)²³ (voir détail de la Fig. 1.10.). Ils se différencient des autres Chrysomeloidea par leur tête allongée en museau, et bien dégagée du prothorax, ainsi que par la contiguïté des procoxas (Daly *et al.*, 1998).

En vue dorsale (cf. Fig. 1.10.), la tête qui est opisthognathe (sauf chez les Rhaebinae) est cachée par la partie dorsale du prothorax²⁴, le pronotum. Les deux élytres recouvrent le ptérothorax²⁵, à l'exception d'un petit écusson de forme rectangulaire ou triangulaire, le scutellum. Les élytres recouvrent également tous les tergites abdominaux à l'exception du dernier, le pygidium.

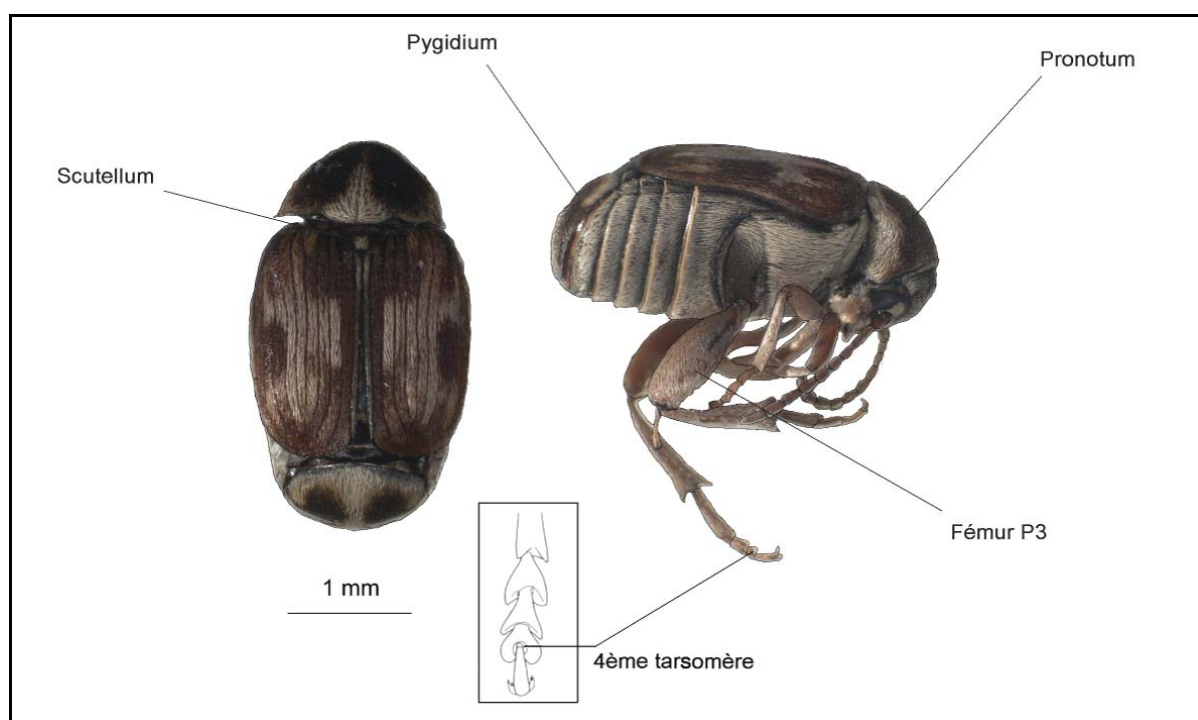


Figure 1.10. Vue dorsale (à gauche) et vue de profil (à droite) de *Bruchidius incarnatus* (Coleoptera, Bruchidae, Bruchinae). On remarque en particulier la position opisthognathe de la tête, la vestiture dense sur tout le corps et sur les pattes, ainsi que la forme du fémur de la patte 3 qui est très renforcé. Le schéma en médaillon (d'après Daly *et al.*, 1998) précise la position du 4ème tarsomère.

²³ cryptopentamérie

²⁴ nom donné au premier segment thoracique

²⁵ chez les coléoptères les segments 2 et 3 du thorax sont fusionnés et portent les ailes.

Un dimorphisme sexuel plus ou moins marqué existe chez certaines espèces. Il correspond en général à des variations dans la taille et la forme des antennes (qui sont plus dentées, voire pectinées chez les mâles), et celles des yeux (plus globuleux et convexes chez les mâles). Dans certains genres, des différences sont également visibles au niveau des pattes (tibia des pattes 2 des mâles du genre *Bruchus*) et au niveau du pygidium (présence de fossettes pygidiales dépourvues de vestiture chez les femelles). Borowiec, dans son travail de référence de 1987 sur les différents genres de Bruchidae, a utilisé une approche cladistique dans son analyse de l'évolution de la famille. Le tableau qui en résulte (cf. Tab. 1.1) donne un bon aperçu de l'évolution de nombreux caractères de morphologie externe chez les Bruchidae (état plésiomorphe vs état apomorphe). Néanmoins, Borowiec estime qu'une analyse phylogénétique de la famille à partir de ces seuls caractères est problématique, en raison de l'existence de nombreux cas de réversions et de convergences dans plusieurs lignées de Bruchidae. Aussi, cet auteur et de nombreux autres (Kingsolver, 1970 ; Johnson *et al.*, 2004 ; K.-W. Anton, com. pers.) insistent sur l'utilité de l'étude de la morphologie des génitalia (voir Fig. 1.11.), qui présentent moins de caractères homoplasiques.

Tableau 1.1. Caractères de morphologie externe²⁶ (modifié d'après Borowiec, 1987a)

#	Caractère	Etat plésiomorphe	Etat apomorphe
1	Couleur du corps	métallisé	non métallisé
2	Vestiture	absente, ou uniforme	présente et non uniforme
3	Orientation de la tête	prognathe	opisthognathe
4	Yeux	faiblement échancrés	fortement échancrés
5	Carène frontale	présente	absente
6	Lobe post-oculaire	court, non caréné	long, caréné
7	Antennes	filiformes ou faiblement dentées	dentées ou pectinées
8	Carène latérale pronotale	présente	absente
9	Processus prosternal	long, épais, séparant les procoxas	court, étroit, ne séparant pas les procoxas
10	Processus metasternal	plat	anguleux
11	Scutellum	carré, non échancré à son extrémité	triangulaire, ou allongé, ou carré échancré aux extrémités
12	Stries élytrales	régulières	non régulières
13	1 ^{ère} strie élytrale	atteint la base de l'élytre	n'atteint pas la base de l'élytre
14	Tubercules basaux élytraux	absents	présents
15	10 ^{ème} strie élytrale	non abrégée	abrégée
16	plaque mesoépimérale	épaisse, atteint la cavité mesocoxale	courte, triangulaire, n'atteint pas la cavité mesocoxale
17	Sillon parasutural	présent	absent
18	Fémur P3	épais	mince
19	Epines fémorales	nombreuses	simples ou absentes
20	Sillon fémoral ventral	absent	présent
21	Bord externe ventral du Fémur P3	sans dents	avec des dents
22	Tibia P3	courbé	droit
23	Carène du tibia 3	présente	absente
24	Mucron	long	réduit
25	Eperon du tibia 3	présent	absent
26	P1 ou P2	sans dimorphisme sexuel	avec dimorphisme sexuel
27	Pygidium	petit	grand
28	Sternites abdominaux	non modifiés	modifiés

²⁶ voir glossaire en annexe pour les définitions de certains caractères

D'autres auteurs ont également proposé d'utiliser comme source de caractères informatifs les différentes structures de la capsule céphalique des larves (Pfaffenberger *et al.*, 1984 ; Borowiec, 1987a), ou encore les ornementsations des œufs (Caron *et al.*, 2004).

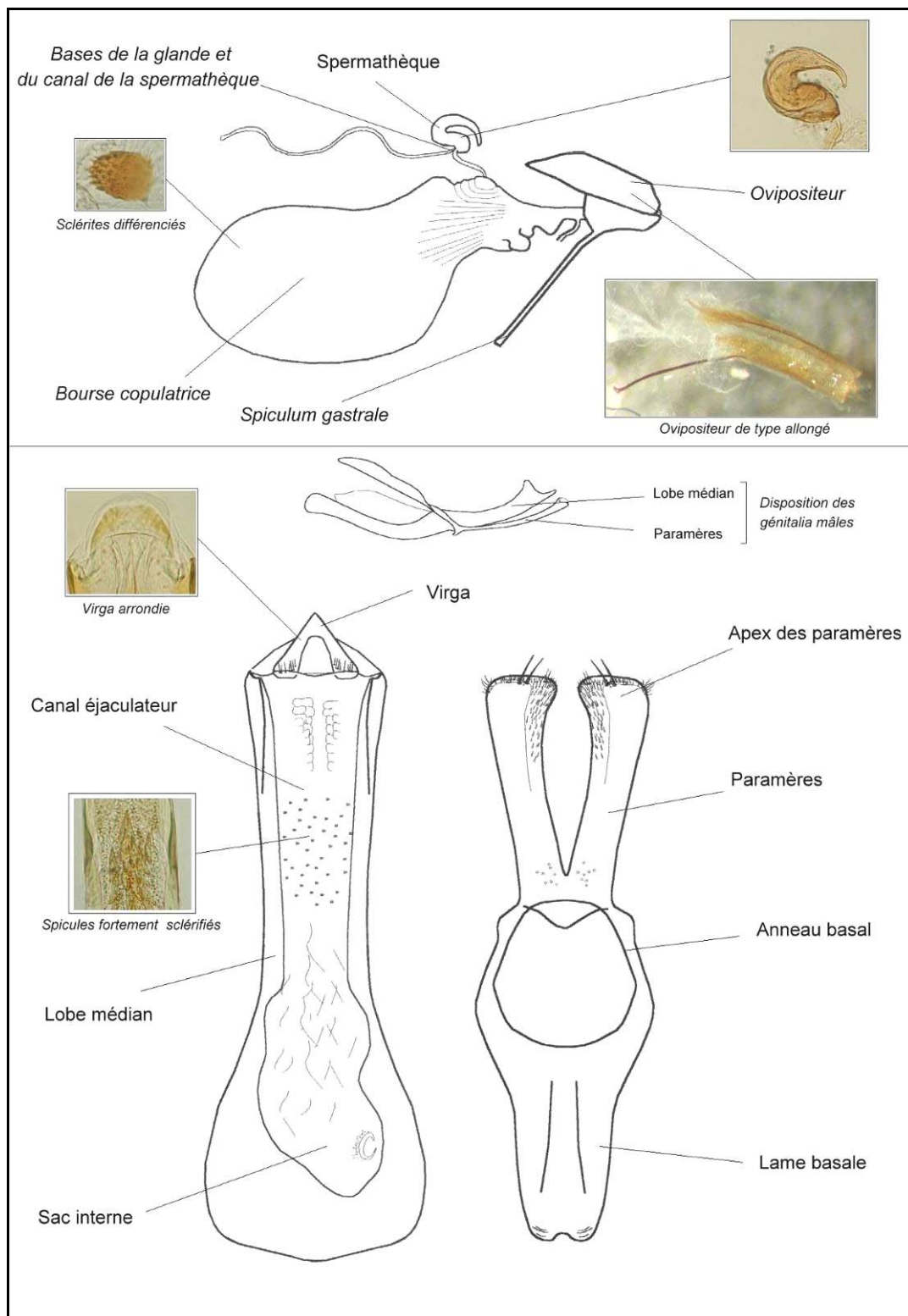


Figure 1.11. Schéma de génitalia femelles (en haut) et mâles (en bas), caractéristiques de la famille des Bruchidae. (modifié d'après Delobel, non publié). Elles correspondent à des génitalia d'un type dérivé, si l'on se réfère à Borowiec (1987a).

1.3. Biologie, écologie

Les bruches sont surtout connues par leur appellation anglo-saxonne de ‘seed-beetles’. En effet, les larves de ces insectes sont cléthrophages et se développent en général au sein d’une seule et même graine (Johnson, 1981 ; Delobel & Tran, 1993).

La plupart des espèces de Bruchidae ont un cycle de vie similaire. Les femelles déposent généralement leurs œufs directement sur les gousses ou les graines. Cette ponte se fait de façon très spécifique, mais il arrive que les femelles se trompent de plantes-hôtes (Delobel *et al.*, 2000). La larve néonate qui émerge de l’œuf se distingue alors des autres stades larvaires par des structures particulières²⁷ qui l’aident à sortir de l’œuf (Johnson, 1981, 1988 ; Johnson & Siemens, 1991 ; Delobel & Tran, 1993 ; Daly *et al.*, 1998). Elle est en outre très mobile, et elle peut percer des téguments très épais et durs de façon à pénétrer dans les graines. Peu de temps après être entrée dans la graine, la larve du premier stade (L1) mue. Les stades larvaires suivants sont apodes et se développent dans la graine. Néanmoins, chez certaines espèces associées à des graines de très petite taille, les larves restent mobiles et peuvent consommer plusieurs graines. La situation inverse existe et parfois plusieurs larves de la même espèce peuvent se développer dans une même graine : De Luca (1967) trouve ainsi jusqu’à 36 larves d’*Acanthoscelides obtectus* dans une seule graine d’haricot. Par ailleurs, au moins une espèce, *Bruchidius cinerascens*, se nourrit partiellement hors des graines (A. Delobel, com. pers.).

En général, le dernier stade larvaire se nymphose à l’intérieur de la graine consommée (après avoir préparé un orifice de sortie), mais certaines espèces (du genre *Caryedon* par exemple) tissent un cocon, et se nymphosent à l’extérieur de la graine (Delobel & Tran, 1993). Chez d’autres espèces, la larve du dernier stade se fabrique un abri en agglomérant plusieurs graines autour d’elle (Johnson, 1981). Après son émergence, l’imago est en mesure d’amorcer un nouveau cycle de vie. Il peut alors y avoir des différences notables dans le mode de vie des adultes selon les espèces considérées. En général²⁸, les adultes se nourrissent peu et ne consomment qu’un peu de pollen et de nectar (Johnson, 1981). Cette consommation de pollen a néanmoins un rôle essentiel chez certaines espèces, car elle permet la maturation des organes reproducteurs mâles et femelles (Huignard *et al.*, 1990). Chez plusieurs espèces du genre *Bruchus*, la maturation des oocytes femelles est en outre conditionnée par la nature du pollen²⁹ (Huignard *et al.*, 1990).

Au niveau de l’oviposition, la phénologie des plantes-hôtes a une grande importance et ainsi certaines espèces pondent uniquement sur des graines (ou gousses) en développement, d’autres sur des graines (ou gousses) à maturité, et d’autres sur des graines (ou gousses) sèches (Delobel & Tran, 1993). Des variations existent aussi dans les comportements de ponte (Johnson & Siemens, 1997). Si une ressource adaptée (graine ou gousse) n’est pas disponible, la plupart des espèces de bruches peuvent alors entrer dans une période de diapause plus ou moins longue (diapause hivernale par exemple) (Huignard *et al.*, 1990). Certaines espèces (en général dans les régions chaudes) peuvent également avoir plusieurs générations dans l’année (espèces dite plurivoltines)(De Luca, 1967 ; Huignard *et al.*, 1990).

²⁷ elle est caractérisée par la présence de deux structures prothoraciques spécifiques : l’ovirupteur, et une épine située au-dessus du premier stigmate prothoracique (Delobel & Tran, 1993)

²⁸ certaines espèces n’ont pas besoin de se nourrir à l’état adulte pour se reproduire (Johnson, 1981 ; Huignard *et al.*, 1990)

²⁹ seul du pollen de Fabaceae induit la vitellogénèse chez les femelles

1.4. Importance économique

Un grand nombre de bruches (appartenant principalement aux genres *Acanthoscelides*, *Bruchidius*, *Bruchus*, *Callosobruchus*, *Caryedon* et *Zabrotes*) sont économiquement nuisibles car elles s'attaquent à des légumineuses (Fabaceae) cultivées par l'homme, comme l'arachide, le haricot, ou le pois (Johnson, 1981). Elles peuvent causer des dégâts au champ, mais elles sont surtout nuisibles dans les stocks de graines (Borowiec, 1987a ; Delobel & Tran, 1993). Plusieurs espèces polyvoltines (par exemple *Callosobruchus maculatus*) sont ainsi capables de se multiplier dans des greniers à grains tout au long de l'année (Delobel & Tran, 1993). De nombreuses espèces de ravageurs ont également une large aire de répartition (plusieurs espèces sont devenues cosmopolites), suite à des introductions involontaires liées au transport des graines qu'elles infestent.

A contrario, certaines espèces de Bruchidae sont utilisées comme auxiliaires biologiques pour lutter contre des plantes invasives arborescentes (Van Tonder 1985 ; Rohner & Ward 1999 ; Coetzer, 2000) ou herbacées (Downey & Smith 2000).

1.5. Taxonomie, systématique

En 1845, peu de temps après sa création, la famille des Bruchidae compte neuf genres distincts (*Amblycerus*, *Bruchus*, *Caryedes*, *Caryedon*, *Caryoborus*, *Kytorhinus*, *Megacerus*, *Pachymerus* et *Spermophagus*), et la majorité des espèces est décrite dans le genre *Bruchus* (Borowiec, 1987a). Dans les cinquante années qui suivent, deux nouveaux genres sont décrits (*Caryopemon* et *Zabrotes*), et les membres de l'actuelle sous-famille des Rhaebinae sont rattachés aux Bruchidae par Kraatz (1879). Il faut attendre 1905 pour voir un premier tournant dans la systématique des Bruchidae, avec les travaux de Schilsky, qui va reprendre toute la faune Paléarctique. Cet auteur décrit en particulier deux nouveaux genres dans lesquels il place de très nombreuses espèces anciennement placées dans le genre *Bruchus*, les genres *Acanthoscelides* et *Bruchidius*. Par la suite, les travaux de Bridwell (Bridwell, 1929, 1932, 1946) donnent naissance à la classification moderne des Bruchidae, avec toutes les sous-familles et les principales tribus actuelles (il décrit également 18 nouveaux genres).

A partir des années soixante et jusqu'à aujourd'hui de nombreux auteurs³⁰ vont contribuer à l'essor de l'étude de la taxonomie et de la systématique des Bruchidae. Durant cette période³¹ vont se généraliser les descriptions détaillées des nouvelles espèces (et les redescriptions d'anciennes espèces), l'emploi de clés de détermination, et l'inclusion des données relatives aux associations plantes-insectes et à la biogéographie (Kingsolver, 1990).

Actuellement la famille comprend 64 genres qui sont classés dans six sous-familles distinctes (sources : Borowiec, 1987a ; Nilsson & Johnson 1991 ; Anton, 1994, 1999d ; Romero & Johnson, 2001, 2003b ; Johnson & Romero, sous presse) (voir Tab. 1.2.)

³⁰ K.-W. Anton, L. Borowiec, J. Decelle, A. Delobel, C.D. Johnson, J.M. Kingsolver, K. Morimoto, D. Whitehead

³¹ qualifiée de « monographic period » par J.M. Kingsolver

Tableau 1.2. Classification³² et estimation du nombre d'espèces pour la famille des Bruchidae

Famille : Bruchidae - Latreille 1802		(nombre estimé d'espèces)
Sous-famille : Bruchinae - Latreille, 1802		
Tribu : Bruchini - Latreille, 1802		
<i>Bruchus</i> - Linnaeus, 1767		34+
Tribu : Acanthoscelidini - Bridwell 1946		
<i>Caryedes</i> - Hummel 1827		22+
<i>Callosobruchus</i> - Pic 1902		20+
<i>Acanthoscelides</i> - Schilsky 1905		250+
<i>Bruchidius</i> - Schilsky 1905		250+
<i>Pygiopachymerus</i> - Pic 1911		2
<i>Gibbobruchus</i> - Pic 1913		13+
<i>Cosmobruchus</i> - Bridwell 1931		1
<i>Dahlibruchus</i> - Bridwell 1931		2
<i>Rhipibruchus</i> - Bridwell 1932		7
<i>Sulcobruchus</i> - Chujo 1937		8
<i>Specularius</i> - Bridwell 1938		9
<i>Algarobius</i> - Bridwell 1946		2
<i>Althaeus</i> - Bridwell 1946		1
<i>Meibomeus</i> - Bridwell 1946		20
<i>Merobruchus</i> - Bridwell 1946		15+
<i>Mimosestes</i> - Bridwell 1946		15
<i>Neltumius</i> - Bridwell 1946		3
<i>Sennius</i> - Bridwell 1946		31+
<i>Sator</i> - Bridwell 1946		22+
<i>Stylanthus</i> - Bridwell 1946		2
<i>Conicobruchus</i> - Decelle, 1951		8+
<i>Tuberculoobruchus</i> - Decelle 1951		20+
<i>Bonaerius</i> - Bridwell 1952		1
<i>Lithraeus</i> - Bridwell 1952		1+
<i>Pseudopachymerina</i> - Zacher, 1952		1
<i>Pectinibruchus</i> - Kingsolver, 1967		1
<i>Scutobruchus</i> - Kingsolver, 1968		6
<i>Penthobruchus</i> - Kingsolver 1973		2
<i>Ctenocolum</i> - Kingsolver & Whitehead 1974		8
<i>Megasennius</i> - Whitehead & Kingsolver, 1975		1
<i>Acanthobruchidius</i> - Borowiec 1980		1
<i>Salviabruchus</i> - Decelle 1982		1
<i>Horridobruchus</i> - Borowiec 1984		1
<i>Megabruchidius</i> - Borowiec 1984		3
<i>Palaeoacanthoscelides</i> - Borowiec 1985		2
<i>Decellebruchus</i> - Borowiec 1987		3
<i>Kingsolverius</i> - Borowiec 1987		1
<i>Palpibruchus</i> - Borowiec 1987		1

³² sources : Borowiec, 1987a ; Nilsson & Johnson 1991 ; Anton, 1994, 1999 ; Romero & Johnson, 2001, 2003b ; Johnson & Romero, sous presse

<i>Spatulobruchus</i> - Borowiec 1987	1
<i>Borowiecus</i> - Anton 1994	5
<i>Parasulcobruchus</i> - Anton 1999	1
<i>Margaritabruchus</i> - Romero & Johnson 2001	1
<i>Meganeltumius</i> - Romero & Johnson 2003	1
<i>Neobruchidius</i> – Johnson & Romero 2004	1
Tribu : Megacerini - Bridwell 1946	
<i>Megacerus</i> - Fahraeus 1839	50+
Sous-famille : Kytorhininae - Bridwell 1832	
<i>Kytorhinus</i> - Fischer von Waldheim 1809	15
Sous-famille : Rhaebinae - Chapuis 1874	
<i>Rhaebus</i> - Fischer von Waldheim 1824	5
Sous-famille : Pachymerinae - Bridwell, 1929	
Tribu : Pachymerini - Bridwell 1929	
<i>Pachymerus</i> - Thunberg 1805	6
<i>Caryoborus</i> - Schoenherr 1833	2
<i>Caryobruchus</i> - Bridwell 1929	16+
<i>Butiobruchus</i> - Prevett 1966	1
Tribu : Caryedontini - Bridwell 1929	
<i>Caryedon</i> - Schoenherr 1823	30+
<i>Afroredon</i> - Decelle 1965	4
<i>Caryotrypes</i> - Decelle 1968	1
<i>Exoctenophorus</i> - Decelle 1968	1
<i>Mimocaryedon</i> - Decelle 1968	1
Tribu : Caryopemini - Bridwell 1929	
<i>Caryopemon</i> - Jekel 1855	10+
<i>Diegobruchus</i> - Pic 1913	4
<i>Oligobruchus</i> [†] - Kingsolver 1965	5
Sous-famille : Amblycerinae - Bridwell 1932	
Tribu : Amblycerini - Bridwell 1932	
<i>Amblycerus</i> - Thunberg 1815	150+
Tribu : Spermphagini - Borowiec 1987	
<i>Spermphagus</i> - Schoenherr 1833	115+
<i>Zabrotes</i> - Horn 1885	15+
Sous-famille : Eubaptinae- Bridwell 1932	
<i>Eubaptus</i> - Lacordaire 1845	4

[†] genre fossile

D'après les estimations de Borowiec (1987a), environ 70 % des espèces décrites appartiennent à la sous-famille des Bruchinae, 20 % appartiennent à la sous-famille des Amblycerinae, 5 % appartiennent à la sous-famille des Pachymerinae, et les espèces restantes se répartissent dans les trois dernières sous-familles. Cette répartition n'est pas statique car la taxonomie et la systématique des Bruchidae sont en perpétuelle évolution. En effet, de nouvelles espèces (Anton, 1999a, 1999b, 1999c, 2000 ; Anton & Delobel, 2003, 2004 ; Delobel & Anton, 2003 ; Delobel *et al.*, 2004 ; Romero & Johnson, 2002 ; Tuda & Morimoto, 2004), et même de nouveaux genres (Romero & Johnson, 2001, 2003b ; Johnson & Romero, sous presse) sont régulièrement décrits.

Par ailleurs, un important travail de révision a été engagé par de nombreux auteurs afin de clarifier de nombreux points relatifs à la taxonomie et à la systématique de la famille. Ainsi récemment les genres *Sulcobruchus*, *Zabrotes* et *Neltumius* ont été révisés, respectivement par Anton (1999) et Romero & Johnson (2000, 2003a), tandis que la tribu des Caryedontini a été révisée par Johnson *et al.* (2004). Ces révisions sont nécessaires pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, la définition des contours de certains genres ou de certaines tribus est peu précise, et en conséquence plusieurs groupes existant sont très certainement paraphylétiques (Borowiec, 1987). En outre, de nombreuses descriptions d'espèces sont peu détaillées et obsolètes³³, et il existe encore de nombreuses synonymies dans la littérature.

Ce travail de révision est souvent compliqué par la difficulté d'accès à de nombreux types qui ont été déposés dans différentes institutions à travers le monde (Kingsolver, 1990).

1.6. Données fossiles

Les données fossiles sur les Bruchidae sont extrêmement fragmentaires, à l'instar des données fossiles relatives aux Chrysomelidae (Wilf *et al.*, 2000), et seuls trois gisements ont livré à ce jour des fossiles clairement identifiés comme appartenant à la famille des Bruchidae (Poinar, 1999).

Les premiers fossiles de Bruchidae sont décrits par Wickham (1914), et placés par Kingsolver (1965) dans le genre *Oligobruchus* (Pachymerinae, Caryopemini). Ils proviennent d'un gisement fossilifère de schiste argileux du Colorado (Amérique du Nord) qui daterait d'environ 35 Ma (début de l'Oligocène). Ce n'est que bien plus tard que Poinar (1999) identifie un autre fossile de Bruchidae, conservé dans de l'ambre issu de la République Dominicaine. Ce fossile a été rattaché au genre *Caryobruchus* (Pachymerinae, Pachymerini). Pour ce taxon, la datation est peu précise, et les estimations lui donnent un âge compris entre - 15 et - 45 Ma (Poinar, 1999). Récemment, le plus ancien fossile de Bruchidae a été identifié (Archibald & Mathewes, 2000). Il correspond à un Pachymerinae de la tribu des Caryopemini. Ce fossile est issu d'un gisement fossilifère de schiste argileux lacustre situé en Colombie-Britannique (Amérique du Nord), vieux de plus de 52 Ma (Eocène inférieur).

En plus des fossiles d'insectes à proprement parler, des dégâts fossiles attribués aux Bruchidae (sur des graines fossilisées) ont été découverts à de multiples occurrences (Wilf *et al.*, 2000). Les plus anciennes traces de dégâts fossiles connues remontent à - 46 Ma (Eocène moyen, site de Singida en Tanzanie)(Herendeen, non publié).

³³ les nombreux types déposés par M. Pic par exemple.

Section II. Relations avec les plantes-hôtes

2.1. Spécialisation

Les Coléoptères Bruchidae sont des insectes extrêmement spécialisés (Johnson, 1981).

Ils présentent une spécialisation trophique marquée qui est en rapport avec leur développement larvaire qui a lieu exclusivement dans les graines de leurs plantes-hôtes.

En plus de cette spécialisation trophique, les bruches exhibent également une spécialisation alimentaire importante (Johnson, 1981 ; Borowiec, 1987a). Ainsi, la totalité des espèces dont le régime alimentaire est bien connu sont oligophages ou monophages et près de 84 % de leurs plantes-hôtes appartiennent à la famille des Fabaceae (Johnson, 1981). Trois autres familles botaniques sont connues pour servir d'hôtes aux bruches : les Convolvulaceae (4.5 %), les Palmae (4.5 %) et les Malvaceae (2 %) (Johnson, 1981). Les 5 % restant correspondent à des plantes appartenant à près d'une trentaine de familles botaniques distinctes (De Luca, 1967 ; Johnson, 1981 ; Borowiec, 1987a ; Johnson *et al.*, 2001). Cette spécialisation alimentaire est très poussée chez certains groupes où il existe un important conservatisme taxonomique des associations plantes-insectes. Ainsi la trentaine d'espèces du genre *Bruchus* (Bruchinae, Bruchini) est strictement associée à des plantes de la tribu des Vicieae (Fabaceae) (Borowiec, 1987a). Un autre exemple est donné par les bruches de la tribu des Pachymerini qui sont associés à la famille botanique des Palmae, ce qui leur a valu leur appellation anglo-saxonne de « palm bruchids » (Poinar, 1999).

2.2. Adaptations aux plantes-hôtes

La diversification des différents groupes de Bruchidae a été vraisemblablement facilitée, ou au contraire limitée, par la plus ou moins grande capacité de chacun de ces groupes à contourner les défenses des plantes. La nécessité de s'adapter aux particularités de la ressource alimentaire a probablement conduit de nombreux groupes de Bruchidae à s'associer de manière très stricte à certaines familles, genres ou espèces botaniques aux dépens d'une exploitation plus large des ressources théoriquement disponibles (d'où le conservatisme taxonomique que l'on observe chez certains groupes).

En 1969, Janzen reprend la théorie d'Ehrlich & Raven (1964) et s'intéresse à une possible coévolution entre les Bruchidae et leurs plantes-hôtes. Janzen établit une liste de 31 défenses distinctes, notamment la présence de composés secondaires toxiques dans les graines, qui ont pour effet probable de limiter la pression de sélection des bruches. L'étude de Janzen est reprise cinq ans plus tard par Center & Johnson (1974) qui détaillent à leur tour une liste de d'adaptations spécifiques (voir Tableau 1.3.), qui selon ces auteurs, permettent aux bruches de contourner en partie les défenses des plantes. Ils concluent donc à une possible coévolution entre les bruches et leurs plantes-hôtes (qui constituerait une course aux armements entre les plantes et les insectes). Néanmoins, comme le souligne Johnson en 1990, ces études sont corrélatives et il est difficile d'imaginer avec précision l'incidence évolutive des forces sélectives exercées par les insectes sur les plantes hôtes, en l'absence d'une perspective historique. Cet argument est aussi celui de Jermy (1984) qui considère qu'il est hautement improbable que les bruches exercent une pression de sélection assez forte pour mettre en péril la survie de légumineuses perennes qui produisent des quantités importantes de graines.

Tableau 1.3. Mécanismes de contournement des défenses des plantes dans la famille des Bruchidae (d'après Center & Johnson, 1974)

Défense de la plante	Mécanisme de contournement de la défense
1. Sécrétion abondante de gomme (résine) quand une larve s'attaque à une gousse qui contient des graines immatures. Cette gomme peut engluier les jeunes larves ou d'autres œufs déposés sur la gousse.	1a. Résistance à la gomme chez des larves de certaines espèces. (ex. <i>Acanthoscelides submuticus</i>, <i>Algarobius prosopis</i>) 1b. Période de quiescence dans le développement embryonnaire de l'œuf, jusqu'à la maturation des graines (à ce moment la gousse est desséchée et ne produit plus de gomme). (ex. <i>Caryedon albonotatum</i>) 1c. Œufs pondus individuellement, et non en grappe (cela limite l'effet nocif de la gomme qui se répand à proximité du point où les larves pénètrent dans la gousse).
2. Déhiscence ou fragmentation des gousses prématurée qui met à distance les œufs des graines à maturité.	2a. Ponte tardive des œufs directement sur les graines après la déhiscence ou la fragmentation des gousses. (ex. <i>Caryobruchus buscki</i>, <i>Pachymerus</i> sp.) 2b. Ponte d'œufs au niveau des valves et collage des valves des gousses pour en limiter la déhiscence où la fragmentation. (ex. <i>Merobruchus julianus</i>, <i>Sennius morosus</i>)
3. Gousses parfaitement lisses et/ou indéhiscentes, ce qui ne convient pas à certaines espèces qui pondent dans des anfractuosités).	3a. Creusement de trous de ponte par les femelles sur le tégument de gousses en croissance. (ex. <i>Acanthoscelides obtectus</i>, <i>Pygiopachymerus lineola</i>) 3b. Ponte d'œufs rendus collants par la femelle. (ex. <i>Bruchus</i> spp., <i>Caryedon</i> spp., <i>Mimosestes</i> spp.)
4. Couche superficielle de la gousse qui se détache quand la gousse s'ouvre, et ainsi met à distances les œufs des graines à maturité.	4b. Œufs solidement attachés aux téguments non superficiel de la gousse. (ex. <i>Merobruchus julianus</i>, <i>Sennius</i> spp.)
5. Composés secondaires toxiques dans les graines.	5. Mécanismes de détoxifications. (ex. <i>Caryedes brasiliensis</i>)
6. Modification du tégument externe des gousses (développement d'écailles ou d'une forte pubescence qui peut faire se détacher les œufs ou gêner les larves.	6a. Développement embryonnaire de l'œuf très rapide. 6b. Ponte à des endroits précis où le tégument n'est pas modifié. (ex. <i>Acanthoscelides collusus</i>, <i>Acanthoscelides fraterculus</i>)
7. Graines immatures de très petite taille qui croissent très rapidement juste avant leur dispersion.	7a. Période de quiescence dans le développement embryonnaire de l'œuf, jusqu'à la maturation des graines. (ex. <i>Caryedon albonotatum</i>) 7b. Consommation de plusieurs graines immatures par les larves. (ex. <i>Algarobius</i> spp., <i>Mimosestes</i> spp.)
8. Graines très fines ou très petites tailles dans lesquelles les bruches ne peuvent croître.	8. Larves mobiles qui peuvent se nourrir sur plusieurs graines et faire leur mue imaginale en dehors d'une graine.

Cependant, le développement indépendant d'un si grand nombre de défenses (et en particulier de défenses chimiques) dans de nombreuses lignées évolutives d'Angiospermes rejoint en partie la démonstration de Farrell *et al.* (1991) sur la diversification des plantes à canaux à latex, et l'on ne peut totalement écarter a priori l'idée d'une course aux armements qui aurait stimulé la diversification des bruches et de leurs plantes-hôtes.

Selon Johnson (1990a), la toxicité des graines constituerait l'une des contraintes majeures qui expliquerait l'extrême spécialisation des bruches envers leurs hôtes. Les adaptations des bruches à certains composés toxiques chimiques ont été bien étudiées par de nombreux auteurs (Rosenthal 1976, 1977, 1990 ; Janzen, 1981 ; Bleiler *et al.* 1988 ; Oliveira *et al.* 2002) et les mécanismes de détoxification de certains composés sont désormais connus.

Ainsi les voies de détoxification de la L-canavanine³⁴, un acide aminé non-protéique, ont été bien étudiées chez *Caryedes brasiliensis* (Bruchinae, Acanthoscelidini). Cette bruche arrive à se développer dans les graines extrêmement toxiques du *Dioclea megacarpa* (Fabaceae, Phaseoleae) qui contiennent entre 8 et 13 % de L-canavanine (poids sec). Cet acide aminé non-protéique est un analogue de la L-arginine et, dans différentes réactions des voies du métabolisme d'un insecte sensible, la L-canavanine va être substituée à la L-arginine par une enzyme, l'arginyl-ARNt synthétase. La L-canavanine a une basicité moindre que la L-arginine, et son incorporation dans les voies de synthèse des protéines génère une altération structurelle et fonctionnelle des protéines qui sont produites, ce qui a un effet négatif sur le développement des larves d'insectes (Rosenthal, 1990). L'arginyl-ARNt synthétase de *Caryedes brasiliensis* arrive à discriminer la L-canavanine de la L-arginine avec un ratio de 1 pour 365 (Rosenthal, 1990), et en conséquence, la L-canavanine n'a pas d'effet antagoniste sur la croissance des larves de *Caryedes brasiliensis*. Les molécules de L-canavanine sont dégradées par une enzyme arginase (commune chez les insectes) en urée et L-canaline. L'urée est dégradée en ammoniacque (par une uréase que *Caryedes brasiliensis* a en très grande quantité), et sert ultérieurement dans la synthèse des acides aminés. La L-canaline (qui est toxique) est aussi dégradée par des enzymes spécifiques en homosérine et ammoniacque. Ainsi toute la molécule de L-canavanine est intégralement dégradée et recyclée par la larve de *Caryedes brasiliensis* (Janzen, 1981).

Un autre exemple d'adaptation est relatif aux inhibiteurs de protéases. Certaines plantes, et en particulier des Fabaceae comme *Prosopis juliflora* (Fabaceae, Mimosoideae), concentrent dans leur graines des inhibiteurs de protéases de type Kunitz³⁵. Ces inhibiteurs agissent contre les cystéines protéases que l'on trouve chez la plupart des intestins d'insectes (Oliveira *et al.*, 2002), et notamment dans les intestins de nombreuses espèces de bruches (comme *Acanthoscelides obtectus* ou *Callosobruchus maculatus*). Oliveira *et al.* montrent dans leur étude, que certaines espèces de bruches (comme *Mimosestes mimosae* qui se développe sur *Prosopis juliflora*) arrivent à se développer sur des plantes possédant ces inhibiteurs de protéases. L'étude de l'intestin de larves de *Mimosestes mimosae* révèle qu'elles synthétisent une majorité d'enzymes digestives de type sérine protéase, qui ne sont pas inhibées par les inhibiteurs de protéases de type Kunitz (Oliveira *et al.*, 2002). Par cette utilisation préférentielle d'une enzyme digestive spécifique, les larves de *Mimosestes mimosae* arrivent à contourner la défense chimique présente dans les graines de la plante.

³⁴ formule chimique : $(H_2N-C(=NH)-NH-O-CH_2-CH_2-CH(NH_2)CO_2H)$

³⁵ famille d'inhibiteurs de protéases fréquemment présentes chez les Fabaceae

2.3. Le modèle « Bruchidae »

De nombreux travaux portant sur l'étude des relations évolutives entre les insectes et les plantes se sont intéressés à des membres de la famille des Bruchidae (voir par exemple : Janzen, 1969, 1977 ; Center & Johnson 1974 ; Janzen *et al.* 1977 ; Johnson & Slobodchikoff, 1979 ; Johnson, 1981, 1989, 1990a ; Bleiler *et al.*, 1988 ; Jermy & Szentesi, 2003).

Les bruches constituent un très bon modèle d'étude (Johnson, 1981 ; Jermy & Szentesi, 2003) en raison de leur spécialisation marquée, et de la précision avec laquelle on peut déterminer leurs plantes-hôtes. Ce dernier point est en effet essentiel, car les données de la littérature relatives aux associations plantes-insectes comprennent un nombre extrêmement important de relevés de plantes-hôtes erronés ou non vérifiés (Ehrlich & Raven, 1964 ; Delobel & Delobel, 2003 ; Jermy & Szentesi, 2003 ; Johnson *et al.*, 2004). En effet, les informations relatives aux plantes-hôtes sont souvent erronées, car elles correspondent souvent à des données de capture d'adultes sur des plantes, et non à des données d'élevage.

Pour les coléoptères Bruchidae, il est possible d'avoir d'obtenir simplement des informations fiables en deux temps : (i) collecte des gousses ou des graines de plantes-hôtes potentielles dans la nature; (ii) suivi de l'émergence des imagos en cage d'élevage. Cette démarche a été suivie par de nombreux spécialistes des Bruchidae, principalement dans le Nouveau Monde³⁶ (Kingsolver, 1990), mais aussi plus récemment pour les espèces de l'Ancien Monde³⁷. Quand cette démarche n'est pas suivie, la précision des informations relatives aux relations trophiques entre les bruches et leurs plantes-hôtes est très variable (Delobel & Delobel, 2003). Ainsi certaines études compilent toutes les données disponibles sans analyse critique (Zacher, 1952a, 1952b ; Udayagiri & Wadhi, 1990), ce qui est source de nombreuses erreurs, alors que d'autres travaux distinguent généralement nutrition larvaire et imaginale (Hoffmann, 1945 ; Lukjanovitch & Ter-Minassian, 1957).

Pour Johnson (Johnson, 1990a), l'avenir des recherches sur les interactions entre les bruches et leurs plantes-hôtes passe par l'intégration d'hypothèses phylogénétiques avec des données écologiques et biogéographiques robustes. En effet, une mise en perspective historique est nécessaire si l'on veut tester les hypothèses explicatives correspondant aux principaux patrons d'interactions évolutives entre plantes et insectes phytophages. En 1998, cette démarche méthodologique (utilisation de données d'élevage pour caractériser les associations plantes-insectes, et reconstruction de phylogénies) fut retenue par Silvain & Delobel (1998) dans une étude sur l'évolution des *Caryedon* (Bruchidae, Pachymerinae) ouest-africains. C'est aussi la démarche qui a été retenue pour ce travail de thèse, où presque toutes les données relatives aux plantes-hôtes des bruches étudiées correspondent à des données d'élevage.

L'utilisation des Bruchidae comme modèle d'étude des relations évolutives entre les insectes et les plantes, dans un cadre phylogénétique historique, est amenée à se généraliser comme en témoigne différents programmes de recherches sur le sujet lancés par plusieurs groupes distincts³⁸.

³⁶ voir en particulier les travaux de L.J. Bottimer, D.H. Janzen et C.D. Johnson

³⁷ voir en particulier les travaux de K.-W. Anton, A. Delobel, Y. Gillon, T. Jermy, J.-Y. Rasplus, A. Szentesi

³⁸ aux Etats-Unis : G. Morse, C.D. Johnson et B.D. Farrell; en Hongrie : T. Jermy et A. Szentesi; au Japon : M. Tuda

Section III : Le genre *Bruchidius* Schilsky

3.1. Généralités

Selon Udayagiri & Wadhi (1989), le genre *Bruchidius* (Bruchinae, Acanthoscelidini) comprend 253 espèces distinctes. Comme le souligne Johnson (1989) pour le genre *Acanthoscelides*, ce chiffre est très certainement en-dessous de la réalité. Le genre *Bruchidius* est bien représenté dans l'Ancien Monde, et l'on trouve des espèces du genre en Afrique, en Asie (y compris au Japon), en Australie et en Europe (Borowiec, 1987a). Il est absent du Nouveau monde à l'exception de quelques espèces introduites accidentellement, ou délibérément³⁹ par l'homme.

Au niveau morphologique, il est difficile de donner une diagnose unique pour toutes les espèces du genre, car il regroupe un nombre important d'espèces morphologiquement hétérogènes (Borowiec, 1987a; Kergoat & Silvain, 2004). Les combinaisons d'états de caractères qui définissent le genre (cf. Tableau 1.4) sont peu discriminantes et elles correspondent souvent à des simplésiomorphies⁴⁰ ou à des caractères continus peu explicites (taille des antennes ou du lobe médian par exemple). L'identification des espèces se fait sous la loupe, et nécessite le plus souvent la préparation des génitalia mâles (Borowiec, 1987a).

Tableau 1.4. Combinaisons d'états de caractères pour le genre *Bruchidius* (d'après Borowiec, 1987a)

-
1. Taille des antennes variable (de courtes à extrêmement longues), avec un dimorphisme sexuel ou pas de dimorphisme sexuel.
 2. Pronotum campaniforme, ou conique, ou transverse, sans carène latérale.
 3. Base des élytres avec, ou sans tubercules basaux.
 4. Fémur de la patte 3 sans épines, ou avec des épines très réduites.
 5. Tibia de la patte 3 droit, avec de 2 à 4 carènes.
 6. Abdomen généralement non télescopé, le pygidium de la femelle sans fossettes pygidiales.
 7. Taille du lobe médian variable (de court à extrêmement long), valve ventrale généralement triangulaire, sac interne avec, ou sans sclérites.
 8. paramères aplatis, pouvant être modifiés à leurs extrémités, plus ou moins divisés, ou modifiée, lame basale avec ou sans carène perpendiculaire.

³⁹ exemple de l'introduction de *Bruchidius villosus* aux Etats-Unis pour lutter contre la plante invasive *Cytisus scorparius* (Fabaceae, Cytiseae)

⁴⁰ état de caractère non dérivé (plésiomorphe) partagé par plusieurs taxons

3.2. Taxonomie, systématique⁴¹

En 1905, les travaux de J. Schilsky sur la faune Paléarctique conduisent à la division du genre *Bruchus* en trois genres : *Acanthoscelides*, *Bruchus* et *Bruchidius*.

En 1932, ces trois genres sont rattachés à la sous-famille des Bruchinae par Bridwell. En 1946, Bridwell distingue quatre tribus au sein de la sous-famille des Bruchinae : Acanthoscelidini (genre type⁴² : *Acanthoscelides*), Bruchidiini (genre type : *Bruchidius*), Bruchini (genre type : *Bruchus*) et Megacerini (genre type : *Megacerus*). Mais, en 1984, Borowiec invalide la séparation des tribus Acanthoscelidini et Bruchidiini, car les espèces des genres types de chaque tribu (cad les genres *Acanthoscelides* et *Bruchidius*) ne sont pas distinguables entre elles. En conséquence, les genres autrefois associés à la tribu Bruchidiini (et donc le genre *Bruchidius*) sont rattachés à la tribu des Acanthoscelidini (sensu Borowiec). Par la suite Borowiec définira sur des bases morphologiques (Borowiec, 1987a) un groupe de genre, le groupe *Bruchidius*, qui rassemble les genres *Bruchidius*, *Megabruchidius*, *Salviabruchus* et *Sulcobruchus*. Il définira également pour les espèces européennes des groupes d'espèces (en utilisant en particulier la structure des génitalia mâles) (Borowiec, 1988). Depuis près de 20 ans, un important et nécessaire travail de révision a été entrepris pour des espèces Africaines et Européennes (Anton, 1998a, 1998b, 1999c, 2001 ; Anton & Delobel, 2003 ; Borowiec, 1984, 1985a, 1985b, 1986, 1987b, 1988 ; Delobel & Anton, 2003 ; Delobel *et al.*, 2004).

La systématique du genre *Bruchidius* présente de grandes difficultés, dues au premier chef à l'approche purement descriptive qui a été la règle au cours du siècle (Delobel, com. pers.). En effet, la définition même du genre *Bruchidius* par Schilsky (1905) est trop vague et trop peu discriminante (voir la sous-section 3.1.), et elle ne repose pas sur des synapomorphies (états de caractère dérivés partagés). Ainsi, la plupart des espèces du genre *Acanthoscelides*, qui ont été arbitrairement distinguées du genre *Bruchidius* sur la seule base de leur origine géographique, présentent les mêmes combinaisons d'états de caractères que les espèces du genre *Bruchidius* (Borowiec, 1987a).

Par ailleurs, de nombreuses espèces du genre *Bruchidius* ont été nommées, mais non décrites⁴³, et les synonymies sont nombreuses et difficiles à établir (Delobel, com. pers.). Enfin, des espèces décrites dans le genre *Bruchus* ne présentent aucun des caractères-clés de ce genre et devraient, selon certains auteurs, être placées dans le genre *Bruchidius*, ce qui n'a pas été fait jusqu'à présent. Tous ces éléments génèrent donc une certaine confusion au niveau de la taxonomie du genre *Bruchidius* et des genres apparentés.

Pour de nombreux auteurs, les genres *Acanthoscelides* et *Bruchidius* sont vraisemblablement paraphylétiques en raison de leurs définitions approximatives (Johnson, 1981 ; Borowiec, 1987a). Cette hypothèse a été confirmée récemment par des analyses moléculaires, pour les genres *Bruchidius* (Kergoat & Silvain, 2004) et *Acanthoscelides* (Kergoat *et al.*, en prep.).

⁴¹ cette sous-section reprend et développe une partie de l'introduction générale de l'article présentée dans la seconde partie (Kergoat & Silvain, 2004)

⁴² à la création d'une nouvelle tribu, genre servant de référence pour toutes les espèces de la tribu

⁴³ en particulier les espèces nommées par M. Pic

3.3. Spécialisation

Les espèces du genre *Bruchidius* présentent un fort niveau de spécificité. Comme toutes les espèces de Bruchidae elle se développent dans des graines (spécialisation trophique). Leur spécialisation alimentaire est importante car elles sont monophages ou oligophages, et plus de 95 % des espèces (dont les plante-hôtes sont connues) sont associées à des plantes de la famille des Fabaceae (Kergoat *et al.*, en prep.). Quelques espèces sont aussi inféodées à des plantes appartenant à trois autres familles botaniques, les Apiaceae (*Bruchidius cinerascens*), les Asteraceae (*Bruchidius tuberculatus*) et les Cistaceae (*Bruchidius antennatus*, *B. biguttatus*, *B. tenerifensis*)(Udayagiri & Wadhi, 1989 ; Anton, 1999c ; Delobel & Delobel, 2003 ; Delobel, com. pers.).

Deux études détaillées sur des espèces européennes du genre *Bruchidius* ont été publiées récemment. Dans la première, Delobel & Delobel (2003) font une analyse critique des plantes-hôtes des bruches de la faune de France, en se basant sur une synthèse des données bibliographiques et sur des données d'élevage. La seconde étude (Jermy & Sventesi, 2003), est exclusivement basée sur des données d'élevage de spécimens collectés en Hongrie, sur une période de 20 ans. Le tableau 1.5. présente de façon synthétique des résultats de ces deux études.

Tableau 1.5. Plantes-hôtes d'espèces européennes du genre *Bruchidius* (d'après Delobel & Delobel, 2003 ; Jermy & Sventesi, 2003 ; Delobel, com. pers.)

Espèce	Plantes-hôtes :	
	genre, nombre d'espèces	famille et tribu
<i>Bi. biguttatus</i> (Olivier)	<i>Halimium halimifolium</i> <i>Cistus</i> spp. (5 espèces)	Cistaceae Cistaceae
<i>Bi. bimaculatus</i> (Olivier)	<i>Medicago</i> spp. (12 espèces) <i>Trigonella radiata</i>	Fabaceae , Trifolieae Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. caninus</i> (Kraatz)	<i>Astragalus</i> spp. (3 espèces)	Fabaceae , Galegeae
<i>Bi. cinerascens</i> (Gyllenhal)	<i>Eryngium</i> spp. (3 espèces)	Apiaceae
<i>Bi. dispar</i> (Gyllenhal)	<i>Trifolium</i> spp. (2 espèces)	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. foveolatus</i> (Gyllenhal)	<i>Cytisus scoparius</i>	Fabaceae , Cytiseae
<i>Bi. fulvicornis</i> (Motschulsky)	<i>Trifolium vesiculosum</i>	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. glycyrrhizae</i> (Gyllenhal)	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Fabaceae , Galegeae
<i>Bi. holosericeus</i> (Schönherr)	<i>Lathyrus latifolius</i>	Fabaceae , Vicieae
<i>Bi. imbricornis</i> (Panzer)	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae , Galegeae
<i>Bi. lividimanus</i> (Gyllenhal)	<i>Adenocarpus</i> sp. <i>Argyrocytisus battandieri</i> <i>Calicotome villosa</i> <i>Cytisophyllum sessilifolium</i> <i>Cytisus</i> spp. (7 espèces) <i>Genista</i> spp. (2 espèces) <i>Spartium junceum</i>	Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae

<i>Bi. longulus</i> (Schilsky)	<i>Trigonella</i> spp. (2 espèces)	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. marginalis</i> (Fahraeus)	<i>Astragalus</i> spp. (5 espèces) <i>Oxytropis</i> spp. (2 espèces)	Fabaceae , Galegeae Fabaceae , Galegeae
<i>Bi. martinezi</i> (Allard)	<i>Trifolium fragiferum</i>	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. murinus</i> (Boheman)	<i>Trifolium subterraneum</i>	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. nanus</i> (Germar)	<i>Medicago orbicularis</i>	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. nudus</i> (Allard)	<i>Cytisus hirsutus</i>	Fabaceae , Cytiseae
<i>Bi. pauper</i> (Boheman)	<i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Coronilla coronata</i> <i>Ornithopus compressus</i> <i>Securigera varia</i>	Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae
<i>Bi. picipes</i> (Germar)	<i>Trifolium</i> spp. (2 espèces)	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. pusillus</i> (Germar)	<i>Coronilla</i> spp. (3 espèces) <i>Hippocrepis</i> spp. (2 espèces) <i>Lotus</i> spp. (2 espèces) <i>Securigera</i> spp. (2 espèces)	Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae
<i>Bi. poupillieri</i> (Allard)	<i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Onobrychis arenaria</i>	Fabaceae , Loteae Fabaceae , Hedysareae
<i>Bi. pygmaeus</i> (Boheman)	<i>Medicago sativa</i> <i>Trifolium</i> spp. (9 espèces)	Fabaceae , Trifolieae Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. seminarius</i> (Linnaeus)	<i>Dorycnium hirsutum</i> <i>Lotus</i> spp. (6 espèces) <i>Ornithopus</i> spp. (3 espèces) <i>Scorpiurus</i> spp. (2 espèces) <i>Securigera varia</i>	Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae Fabaceae , Loteae
<i>Bi. sericatus</i> (Germar)	<i>Trifolium</i> spp. (6 espèces)	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. tibialis</i> (Boheman)	<i>Medicago polymorpha</i>	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. unicolor</i> (Olivier)	<i>Onobrychis</i> spp. (3 espèces)	Fabaceae , Hedysareae
<i>Bi. varipes</i> (Boheman)	<i>Astragalus</i> spp. (4 espèces) <i>Oxytropis pilosa</i>	Fabaceae , Galegeae Fabaceae , Galegeae
<i>Bi. varipictus</i> (Motschulsky)	<i>Medicago</i> spp. (2 espèces)	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. varius</i> (Olivier)	<i>Trifolium</i> spp. (9 espèces)	Fabaceae , Trifolieae
<i>Bi. villosus</i> (Fahraeus)	<i>Calicotome spinosa</i> <i>Cytisophyllum sessilifolium</i> <i>Cytisus</i> spp. (10 espèces) <i>Genista</i> spp. (6 espèces) <i>Laburnum</i> spp. (2 espèces) <i>Petteria ramentacea</i> <i>Podocytisus caraminicus</i> <i>Spartium junceum</i>	Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae Fabaceae , Cytiseae

Les résultats de ces travaux soulignent la spécificité d'hôte marquée des espèces étudiées. De nombreuses espèces sont monophages (surtout si l'on considère une définition plus large de la monophagie, où une espèce se nourrissant d'un seul genre botanique est considérée comme monophage) ou oligophages. 27 des 28 espèces associées aux Fabaceae sont associées à des plantes appartenant à une même tribu botanique et seule une espèce, *Bruchidius poupillieri*, est associée à des plantes appartenant à deux tribus botaniques distinctes (Jermy & Sventesi, 2003).

Section IV : Article.

New data on European *Astragalus*-feeding *Bruchidius*, with the description of a new species from Southern Italy (Coleoptera: Bruchidae: Bruchinae)

Delobel, A., Anton, K.-W. & Kergoat, G.J. 2004. *Genus* 15: 173-185.

Cette article s'inscrit dans la dynamique de toute une série de travaux récents qui visent à réviser la taxonomie et la systématique du genre *Bruchidius*.

L'approche choisie est assez originale, car plutôt que de réviser un groupe taxonomique donné, on s'intéresse à un ensemble d'espèces qui se nourrissent sur le même genre botanique, le genre *Astragalus* (Fabaceae, Galegeae). Cet article comporte également la description d'une nouvelle espèce, *Bruchidius bernardi*, dont la position phylogénétique est inférée à l'aide d'une analyse de données moléculaires. La méthodologie utilisée associe donc une approche intégrée, qui concilie études morphologiques et moléculaires.

Genus	Vol. 15(2): 173-185	Wrocław, 30 VI 2004
-------	---------------------	---------------------

New data on European *Astragalus*-feeding *Bruchidius*, with the description of a new species from Southern Italy (Coleoptera: Bruchidae: Bruchinae)

ALEX DELOBEL¹, KLAUS-WERNER ANTON² & GAËL KERGOAT³

¹ 47 avenue Paul Langevin, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

² Grünewaldstr. 13, D-79312 Emmendingen, Germany

³ IRD c/o CNRS, Laboratoire PGE, avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur Yvette, France

ABSTRACT. *Bruchidius bernardi* n. sp., a seed-beetle feeding in *Astragalus depressus* pods, is described from southern Italy. A new synonymy is proposed: *Bruchidius myobromae* (MOTSCHULSKY, 1874) (= *Mylabris virgata* var. *scutulata* BAUDI, 1890). The host plant of *Bruchidius poecilus* (GERMAR) in the same area is identified for the first time as *Astragalus contortuplicatus*. DNA of various related *Bruchidius* species from southern France and Italy was analysed in order to assess the phylogenetic relationships between them. Parsimony analysis of the partial 12S rRNA gene of eight species yielded a phylogenetic tree showing that *B. bernardi* and other *Astragalus* species belong to the *Bruchidius astragali*-group, whereas *B. poecilus* clusters with *Bruchidius* species feeding on various Trifolieae (*Trifolium* and *Medicago*). More comprehensive data are needed in order to establish the phylogeny of the group and related species.

Key words: entomology, taxonomy, phylogeny, new species, host plant, legumes, *Astragalus*, Coleoptera, Bruchidae, *Bruchidius*.

INTRODUCTION

With about 2500 species in Eurasia and the Americas, *Astragalus*, a member of the tribe Galegeae (BRONN), subtribe Astragalinae (ADANS.), is the world's largest genus of vascular plants; diversification rates in the „Astragalean clade” (*Astragalus*, *Oxytropis* and a few close relatives) seem to be significantly higher

than in other Angiosperms (SANDERSON & WOJCIECHOWSKI 1996; WOJCIECHOWSKI, SANDERSON & JER-MING HU 1999). A central hypothesis in the field of insect speciation is that diversification of vascular plants has to do with the diversification of phytophagous insects, the latter closely following the appearance of new plant species. Insects themselves may probably be one of the driving forces of plant diversification, but their precise importance is virtually unknown. The case under study is of particular interest in that respect because Galegeae constitute a highly diversified and relatively well defined group of plants, with a number of identified bruchids feeding on their seeds.

In 1985, BOROWIEC defined within the genus *Bruchidius* the *astragali*-species group for insects morphologically close to *Bruchidius astragali* (BOHEMAN, 1829) and feeding (or supposed to feed) in the seeds of various *Astragalus* species. In addition to *B. astragali*, the following species were originally included in the group: *B. atbasaricus* (LUKJANOVITCH & TER-MINASSIAN), *B. lucifugus* (BOHEMAN), *B. marginalis* (F.), *B. myobromae* (MOTSCHULSKY), *B. scutulatus* (BAUDI), *B. tragacanthae* (OLIVIER), *B. virgatoides* (LUKJANOVITCH & TER-MINASSIAN), *B. virgatus* (FAHRAEUS). In 1988, BOROWIEC added *B. brignolii* ZAMPETTI to the group. All these species share the following set of characters: body oval; antennae strongly sexually dimorphic; elytral base without tubercle, or with a very small one; mucro shorter than lateral teeth of corona; edeagus rather slim, internal sac with small spines; lateral lobes of parameres flat, with a feebly modified apex; base of parameres with a carina. Of the ten species included by BOROWIEC in the *astragali*-group, two, namely *atbasaricus* and *brignolii*, were treated as synonyms by ANTON (1998), while we propose *scutulatus* as synonym (see chapter Results). Of the remaining species, *lucifugus*, *tragacanthae* and *virgatoides* were actually not reared from *Astragalus* seeds, but were supposed to feed in them, or were caught on *Astragalus* plants.

Recently *B. myobromae* was listed for S. Tirol (Italy) by KAHLEN (1987, erroneously as *virgatus*). In June 2001, with the help of M. KAHLEN from Museum Ferdinandeum, Innsbruck (Austria), specimens were found at the cited locality on blooming *A. exscapus*; one month later adults of *B. myobromae* emerged from the seeds of the same host plant.

A number of other *Bruchidius* species are *Astragalus*-feeders: *B. caninus* (KRAATZ), *B. gombo* (PEYERIMHOFF), *B. leprieuri* (JACQUET), *B. longulus* (SCHILSKY), *B. plagiatus* (REICHE & SAULCY), *B. poecilus* (GERMAR), *B. richteri* LUKJANOVITCH & TER-MINASSIAN and *B. varipes* (BOHEMAN) (table 1). Among these, *B. longulus* and *B. poecilus* were included by BOROWIEC (1988) in the *Bruchidius tibialis* and *varius*-groups, respectively. According to DECELLE & LODOS (1989), *B. sivasensis* (ZAMPETTI) and *B. talyshensis* TER-MINASSIAN (under the name *kurdicus* DECELLE, nomen nudum) were caught on *Astragalus* plants. Here we assign the species *caninus*, *leprieuri*, *richteri*, *sivasensis*, *talyshensis* and *varipes* as members of the *astragali* group, and *gombo* as a member of the *halodendri* group. It is worth mentioning that a few other *Bruchidius* species, known to feed in the seeds of different Leguminosae, are sometimes associated with *Astragalus*: *B. bimaculatus*

(OLIVIER), *B. cisti* (F.), *B. villosus* (FABRICIUS), incorrectly under the name *fasciatus* (OLIVIER), *B. nanus* (GERMAR) (CAILLOL 1954; DE LUCA 1962; ZACHER 1951). These doubtful records may either result from misidentification, or misinterpretation of biological data and need confirmation.

It may be added that in the New World, a small number of species (less than 10) in the genus *Acanthoscelides* have been reported as feeding in various species of *Astragalus* (JOHNSON 1970).

In 2002 and 2003, four species of *Bruchidius* were reared from *Astragalus* pods collected in Southern France, Corsica and Italy. Among these, one species reared from *Astragalus depressus* pods proved to be new to science and is

Tab. 1: Insect-host plant relationships between *Bruchidius* and *Astragalus*.

Bruchid species	<i>Astragalus</i> host species	References ^c
<i>B. astragali</i>	<i>A. mollis</i> , <i>ponticus</i> , <i>testiculatus</i>	1, 8, 11, 19
<i>B. bernardi</i>	<i>A. depressus</i>	present
<i>B. caninus</i> ^a	<i>A. boeticus</i> , <i>chlorostegius</i> , <i>hamosus</i> , <i>tragacantha</i> ^b	6, 13, 14, 15
<i>B. gombo</i>	<i>A. gombo</i>	18
<i>B. leprieuri</i>	<i>A. caprinus</i> , <i>pulcher</i> , <i>A. sp.</i>	10, 12, 16
<i>B. longulus</i>	<i>A. monspessulamus</i>	9
<i>B. lucifugus</i>	unknown	-
<i>B. marginalis</i>	<i>A. glycyphyllos</i> , <i>hamosus</i> , <i>monspessulamus</i> , <i>vesicarius</i>	4, 6, 13, 15, 16
<i>B. myobromae</i>	<i>A. exscapus</i> , <i>utriger</i>	22, present
<i>B. plagiatus</i>	<i>A. caraganae</i> , <i>macrocarpus</i>	5, 20
<i>B. poecilus</i>	<i>A. contortuplicatus</i>	present
<i>B. richteri</i>	<i>A. sp.</i>	21
<i>B. sivasensis</i>	probably <i>A. sp.</i>	17
<i>B. talyshensis</i>	probably <i>A. gummiifera</i>	17
<i>B. tragacanthae</i>	probably <i>A. sp.</i>	2
<i>B. varipes</i>	<i>A. ponticus</i>	3 ^d
<i>B. virgatoides</i>	unknown	-
<i>B. virgatus</i>	<i>A. monspessulamus</i> , <i>sieversianus</i> , <i>?pinetorum</i> , " <i>fabago</i> "	7, 11, 20

^a A variable species or a group of species. There are also reports of *B. caninus* feeding in pods of *Oxytropis*, a genus very close to *Astragalus* in the tribe Galegeae.

^b *A. massiliensis*, a synonym of *A. tragacantha*, was reported as host of *B. marginalis* by DELOBEL & DELOBEL (2003); the specimens feeding in *A. massiliensis* seeds in Corsica seem to be more closely related with *B. caninus* than with *B. marginalis*.

^c Numbers in this column refer to the following articles: 1: ABDUL-RASSOUL *et al.* (1986); 2: ANTON (1998a); 3: BRANDL (1981); 4: CAILLOL (1954); 5: CALDERON (1962); 6: DELOBEL & DELOBEL (2003); 7: DE LUCA (1962); 8: FAHRAEUS (1839); 9: HOFFMANN (1945); 10: JACQUET (1886); 11: LUKJANOVITCH & TER-MINASSIAN (1957); 12: NORMAND (1937); 13: PARKER (1957); 14: PEYERIMHOFF (1926); 15: SCHILSKY (1905); 16: ZACHER (1952); 17: DECELLE & LODOS (1989); 18: PEYERIMHOFF (1915); 19: TER-MINASSIAN (1954); 20: KARAPETIAN (1985); 21: IABLOKOV-KHNZORIAN (1959); 22: MOTSCHULSKY (1874).

^d under *B. astragali* (see ANTON 1998b)

described here. Also, pods of a second species, *A. contortuplicatus*, yielded a species hitherto without known host plant, *B. poecilus*. The various specimens collected have given us the opportunity to assess relationships among *Astragalus*-feeding species from the West Mediterranean area. Other species listed in Tab.1 were not available for analysis, most of them having an East Mediterranean or Central Asian distribution.

MATERIAL AND METHODS

A. depressus is a short-stemmed legume that grows in middle to high altitude meadows of Southern Europe and North Africa. A sample of 88 ripe or nearly ripe pods were collected in the vicinity of the Gasperi refuge, on the slopes of Monte Pollino (Basilicata region, Italy), about 1535m above sea level, in late June 2003. Pods were kept in aerated plastic bags until emergence of adults. A total of 10 adult specimens emerged, one of which was used for DNA extraction in order to assess the relationships of the species with other *Astragalus*-feeding species. Other specimens used for DNA extraction and analysis are shown in Tab. 2. Among these, adults of *B. poecilus* were obtained from infested pods of *A. contortuplicatus* collected near San Severino Lucano, 1150m a.s.l. (Basilicata region, Italy) in June 2003. Four *Bruchidius* species not belonging to the *astra-*

Tab. 2: Material examined in this study.

Genus and species	Locality	Host plant ^a (family, tribe) ^b
<i>Bruchidius</i>		
<i>bernardi</i> (DELOBEL & ANTON, 2004)	Basilicata (Italy)	<i>Astragalus depressus</i> (F, Gal)
<i>bimaculatus</i> (OLIVIER, 1795)	Haute Corse (France)	<i>Medicago marina</i> (F, Tri)
<i>caninus</i> (KRAATZ, 1869)	Haute Corse (France)	<i>Astragalus hamosus</i> (F, Gal)
<i>fulvicornis</i> (MOTSCHULSKY, 1874) ^c	Corse du Sud (France)	<i>Trifolium vesiculosum</i> (F, Tri)
<i>marginalis</i> (FABRICIUS, 1776)	Gard (France)	<i>Astr. monspessulanus</i> (F, Gal)
<i>nanus</i> (GERMAR, 1824)	Basilicata (Italy)	<i>Medicago orbicularis</i> (F, Tri)
<i>poecilus</i> (GERMAR, 1824)	Basilicata (Italy)	<i>Astragalus contortuplicatus</i> (F, Gal)
<i>varipictus</i> (MOTSCHULSKY, 1874)	Haute Corse (France)	<i>Medicago murex</i> (F, Tri)
<i>Pachymerus</i>		
<i>cardo</i> (FAHRAEUS, 1839)	French Guyana	<i>Elaeis</i> sp. (Ar)
<i>Spermophagus</i>		
spec.	Gard (France)	

^a We only figured the host-plant species from which the sequenced individual has been reared.
^b Host-plants systematic was abbreviated as follows: Ar (Arecaceae), F (Fabaceae), Gal (Galegeae), Tri (Trifolieae).
^c sensu BOROWIEC (1988).

gali-group were included in the analysis in order to assess more precisely the position of *B. poecilus*. The choice of these species was based on their proximity (less than 5% divergence) with *B. poecilus* in a distance matrix for 12 rRNA; these four species (*B. bimaculatus*, *B. fulvicornis* sensu BOROWIEC, *B. nanus*, and *B. varipictus*) feed exclusively on members of the Trifolieae tribe.

We used whole individuals for DNA extraction and we followed the protocol for insect tissues recommended by the QIAGEN DNeasy tissue kit (QIAGEN GmbH, Germany), with PBS used. For the amplification of partial sequences of the 12s rRNA gene we used primers (Simon et al. 1994) SR-J-14233 (5'-AAGAGCGAC GGGCGATGTGT-3') and SR-N-14588 (5'-AACTAGGATT AGATACCCTA TTAT -3') with standard PCR conditions. PCR products were purified by using QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Germany). Both strands were sequenced for all taxa by the Sanger dideoxy method and sequence data were obtained by analyzing samples on an ABI 373 automated sequencer. Sequences were aligned by means of ClustalX (THOMPSON 1997) with default settings.

Parsimony analysis (unweighted) was performed using PAUP* version 4.0b10 (SWOFFORD 2002) and we used *Pachymerus cardo* and *Spermophagus* sp. as outgroup species.

Parsimony trees were obtained by heuristic search option of 100 random addition replicates (with gaps treated as fifth base). Confidence in each node was assessed by bootstrap procedures by using 100 replicates of 100 random-addition replicates each.

RESULTS

SYNONYMY

***Bruchidius myobromae* (MOTSCHULSKY, 1874)**

Bruchus myobromae MOTSCHULSKY, 1874: 212.

Bruchidius myobromae – LUKJANOVITCH & TER-MINASSIAN, 1957: 165.

Mylabris virgata var. *scutulata* BAUDI, 1890: 342, **syn. nov.**

Bruchus virgatus var. *scutulatus* – PIC, 1913: 57.

Bruchidius virgatus var. *scutulatus* – SCHILSKY, 1905: no. 58.

Bruchidius scutulatus – LUKJANOVITCH & TER-MINASSIAN, 1957: 167.

DISTRIBUTION

Italy (S. Tirol: Vinschgau), Ukraine, S. Russia, Kazakhstan ("Turkestan"), Iran.

REMARK

Each male and female type of *B. myobromae*, designed by K.-W. ANTON as lectotype and paralectotype, are preserved in ZMAS, St. Petersburg (Russia); the male type bears two labels: "Ex Myobro / ma utri- / gera Taur.", "Bruchus /

myobromae / Motsch. / Tauria” (both labels yellowed white, handwritten in ink), the female type “Tauria” only (small red label, handwritten in ink). The male type of *M. virgata* var. *scutulata*, also designed by K.-W. Anton as lectotype, preserved in MRSN, Torino (Italy), has the following labels: “31 / 61”, “Genital / in euparal / Zampetti / 1980” (yellow label, handwritten by Zampetti), “Mylabris virgata / var. scutulata Baudi / Turkestan” (white label, handwritten). All types represent the same species.

DESCRIPTION OF THE NEW SPECIES

***Bruchidius bernardi* DELOBEL & ANTON, n. sp.**

TYPE MATERIAL

Holotype: Male, “Italie – Basilicata 25.06.2003 / Ex gr. *Astragalus depressus* / Refuge de Gasperi (1535 m) / A. & B. Delobel coll. Italie 08”, MNHN. Paratypes: 1 male and 8 females, same data as holotype, MNHN and CKWA.



1. *Bruchidius bernardi*: dorsal aspect, male (left) and female

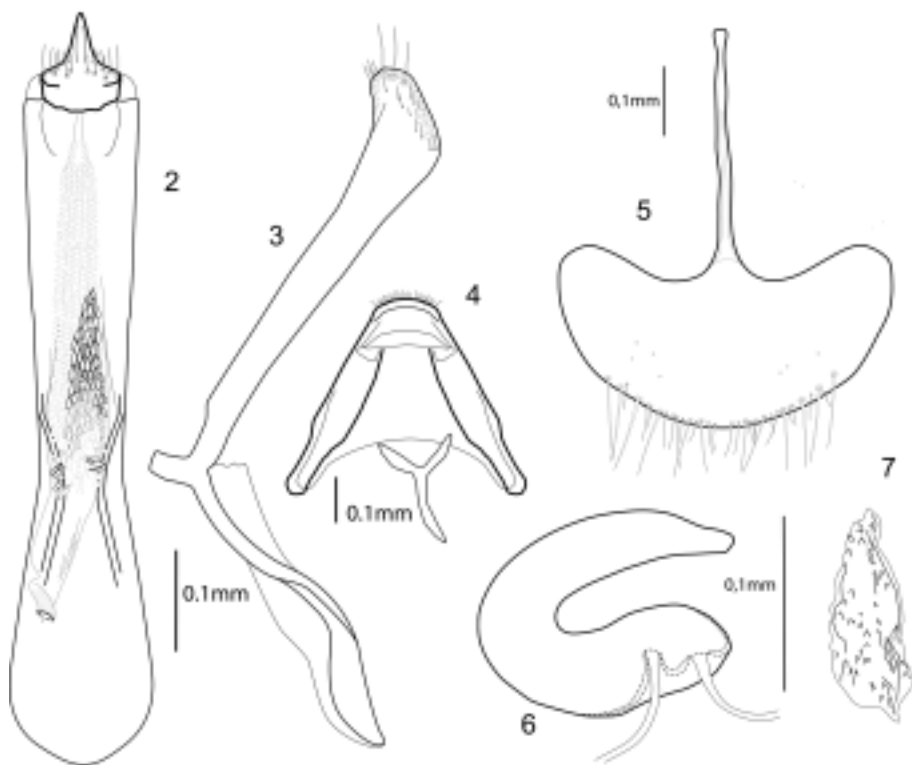
DIAGNOSIS

A small-sized species with completely black integument, uniformly greyish vestiture, sexual dimorphism of antenna, indistinct protuberance with minute denticle at base of elytra, preapical denticle of hind femur reduced to minimum, short mucro at apex of hind tibiae, male genitalia as shown in Figs 2-4.

DESCRIPTION

Length: 2.4-2.5 mm, width: 1.4 mm. Body oblonge-oval (Fig. 1). Integument completely black. Vestiture dense, covering integument nearly completely, recumbent; scutellum and hind edges of pronotum with denser whitish hairs; remaining parts of body with short greyish hairs.

Male: Head short, constricted behind eyes; eyes bulging, maximum head width about 1.5 times width behind eyes; ocular sinus deep; ratio of eye width to minimum distance between eyes about 1.25; postocular lobes reduced to minimum; diffuse carina on frons, vertex with diffuse interocular tubercle. Antenna



2-7, *Bruchidius bernardi*. 2. median lobe, ventral view; 3. lateral lobes and tegminal strut, lateral view; 4. genital segment of male, ventral view; 5. spiculum ventrale of female; 6. spermathecal body; 7. dorsal sclerite of bursa copulatrix

reaching to end of basal quarter third of elytra; antennal segments 1-2 cylindrical, segment 3 subserrate, segments 4-10 serrate, segment 11 oblonge with apex acute; segment 1 about twice as long as segment 2, segment 3 slightly longer and broader than segment 2, segment 4 about 2.5 times as long and twice as wide as segment 3, segments 4-10 becoming steadily wider, segments 8-10 about 1.1 times as long as wide, segment 11 about twice as long as wide.

Pronotum campaniform, about 1.1 times as wide as long, greatest width at base, sides bisinuate, disc feebly convex, barely visible depression near hind edge; punctures on disc somewhat variable, setous; punctures almost touching each other to as wide as puncture diameter; cuticle between punctures partially shiny. Scutellum of moderate size, as long as wide, bifid.

Elytra oblonge, about 1.3 times as long as their combined width; sides nearly parallel at mid third; disc flattened to feebly convex; indistinct basal protuberance at striae 3-4; a minute sharp tooth at base of stria 4; striae on disc deep, punctured; punctures with setae and as wide as striae, distances between punctures on average longer than their diameter; interstriae flat, with micropunctuation and irregular row of flat coarse punctures.

Legs without sexual dimorphism; hind femora moderately incrassate, at their widest 1.7 times wider than mid femora; mesoventral margin without or with minute, barely visible preapical denticle; hind tibiae simple, with carinae reduced to minimum and barely distinguishable, apex of tibiae with mucro short, mucro as long as or shorter than dorsolateral denticles, dorsolateral denticles distinctly shorter than lateral denticle.

Abdomen simple; sternite 1 without area of denser setae; sternite 5 slightly emarginate; pygidium nearly as wide as long, homogeneously convex towards apex.

Genitalia: Median lobe oblonge, ventral valve subtriangular, with acute apical tip and about 8 setae in each basolateral half; apical third of internal sac with numerous square plates, in mid third followed by numerous less sclerotized denticles and transparent microdentate plates (Fig. 2). Lateral lobes apically broadened, separated to about 0.8 of their length, with 3 long setae at medial half of apex; tegminal strut partly membranous, with large median carina (Fig. 3). Spiculum gastrale short, basally irregularly expanded, apically bifurcate, with short projections, Y-shaped (Fig. 4)

Female: Similar to male, but antennal segments shorter and slimmer, segment 3 cylindrical, segment 4 subserrate, segment 4 feebly longer than segment 3, segment 5 about twice as long and wide as segment 4, segments 8-10 as long as wide, sternite 5 not emarginate, pygidium as long as wide and less convex. Genitalia: spiculum ventrale as in Fig. 5; spermathecal body blackish, of almost equal diameter throughout, strongly recurved, with apical diverticulum pointed; opening of spermathecal gland duct basally (Fig. 6); vagina with a single elongated sclerite on dorsal side (Fig. 7); bursa copulatrix without spines or needles.



8. Adult of *Bruchidius bernardi* ready to emerge from an *Astragalus depressus* pod; the ovoid whitish structure above the emergence hole is an hatched egg

AFFINITIES

Bruchidius bernardi is distinguished from the closely related *B. caninus* (KRAATZ, 1869) by having completely black integument, uniformly greyish pubescence, antennal segments more strongly serrate, indistinct elytral protuberance, and numerous transparent plates in apical third of internal sac.

ETYMOLOGY

Named in honour of Bernard DELOBEL, who collected and identified *Astragalus depressus* and *A. contortuplicatus* pods.

BIOLOGY

Type specimens were reared from pods of *Astragalus depressus* L. Translucent eggs (Fig. 8) are laid on the pod when it is still green. The larva feeds first internally, then externally on 3 to 4 seeds, and after completion of its development spins a white cocoon within the pod. Emergence occurs through a circular hole in the pod wall (Fig. 8). Infestation rate in the typical locality is rather high: out of 88 pods collected in 2003, at least 10 were infested by the bruchid (other pods may have been infested but did not yield any adult).

REMARK

CAILLOL (1954) mentions *A. depressus* as a host plant of *B. nanus* in Provence (south-eastern France). Externally similar to *B. bernardi*, *B. nanus* is a different species which apparently feeds exclusively on *Medicago* seeds (tribe Trifolieae).

PHYLOGENETIC ANALYSIS

Parsimony analysis of the partial 12S rRNA gene yielded a single tree of 124 steps (CI = 0.838; RI = 0.764; RCI = 0.641) shown in Fig. 9. Uncorrected pairwise distances among the different taxa (Table 3) ranged from 0.0075 to 0.1203.

Our topology (Fig. 9) clarifies the position of *B. bernardi* in relation to three other European *Bruchidius* species associated with Galegeae. A well supported clade (bootstrap support value of 100%) includes three of the four species feeding on *Astragalus* (*B. bernardi*, *B. caninus* and *B. marginalis*). These species show a low level of sequence divergence (below 2%) and have probably diverged recently. Interestingly, *B. poecilus* is phylogenetically more related to the species feeding on Trifolieae.

The results of the analysis of the 12s rRNA gene are in greater part supported by morphological evidence. In particular, the shape of the aedeagus is quite similar in *bernardi*, *caninus* and *marginalis*; one notable difference between them is the presence of a pointed and hairy expansion on the dorsal valve in *B. caninus*, which is absent in the other three species. Contrary to what might have been

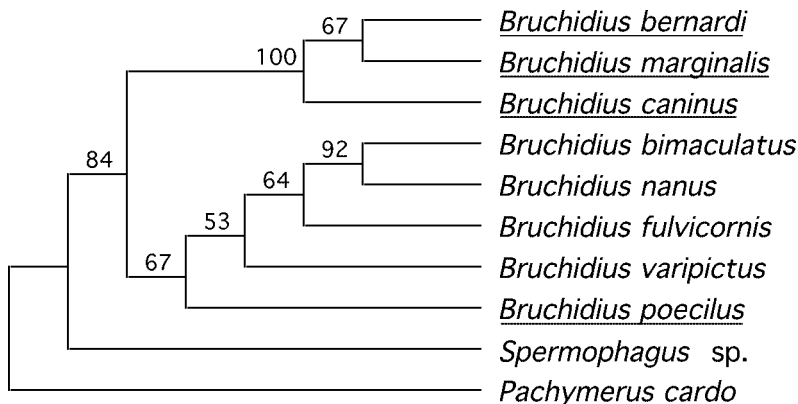
expected, *poecilus* and *bernardi* show a similarly enlarged 4th male antennal segment, and the elytral pattern, with apical and lateral black spots on a whitish background, exists in both *poecilus* and *marginalis*. But it exists also in members of the *varius* group. *B. caninus* is an intermediate case, with specimens feeding in *A. hamosus* seeds showing a partial lateral black spot while those from *A. massiliensis* are devoid of the black spot. The most striking difference between *poecilus* and the other three species from Galegeae lies however in the shape of parameres: they are thin and their apex is highly modified in *poecilus*, much in the same way as in the *Bruchidius varius* and *Bruchidius murinus* groups (BOROWIEC 1988), whereas in *bernardi*, *caninus* and *marginalis* lateral lobes are short, stout, with an enlarged but unmodified apex, as expected in members of the *astragali*-group (see Fig. 3).

Tab. 3: Uncorrected pairwise distance matrix

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>B. bernardi</i>	–									
2. <i>B. bimaculatus</i>	0.0729	–								
3. <i>B. caninus</i>	0.0175	0.0679	–							
4. <i>B. fulvicornis</i>	0.0677	0.0175	0.0652	–						
5. <i>B. marginalis</i>	0.0075	0.0704	0.0100	0.0652	–					
6. <i>B. nanus</i>	0.0752	0.0075	0.0702	0.0200	0.0727	–				
7. <i>B. poecilus</i>	0.0651	0.0404	0.0594	0.0374	0.0571	0.0404	–			
8. <i>B. varipictus</i>	0.0707	0.0309	0.0678	0.0281	0.0679	0.0364	0.0491	–		
9. <i>P. cardo</i>	0.1155	0.1003	0.1128	0.1100	0.1180	0.1051	0.1065	0.1081	–	
10. <i>S. sp.</i>	0.0930	0.0957	0.0955	0.0879	0.0880	0.0955	0.0891	0.0925	0.1203	–

The new species clearly belongs to the same group as *B. marginalis* and *B. caninus*, and may therefore be assigned to the *astragali*-group. It may be noted that the latter two species have at least one host in common, namely *A. hamosus*, a fact which may be linked with their close phylogenetic relationship.

The position of *B. poecilus* must be considered with caution at present. Our results show that *B. poecilus*, an *Astragalus* feeder, seems more closely related to species feeding in Trifolieae seeds than with species feeding in *Astragalus*. Our knowledge of host-plant relationships in the groups of species under study is however far too scanty to allow a complete clarification of its position. Numerous species of *Astragalus*, *Medicago* and *Trifolium* have never been sampled for seed-beetle infestation in Southern Europe, Northern Africa and Western Asia, so that major findings may be expected when more biological data become available. Further research should reveal whether the species groups as currently defined are a morphologically, genetically and biologically satisfactory description of reality.



9. Most parcimonious tree from the unweighted parsimony analysis of the partial 12s rRNA gene (numbers above branches are bootstrap support values). *Astragalus*-feeding species names are underlined

REFERENCES

- ABDUL-RASOUL, M.S., N.Y. OTHMAN & H.A. DAWAH, 1986. Observation on the biology, host plants and distribution of Iraqi Bruchidae (Insecta, Coleoptera). Journ. Biol. Science Scien. Res., **17**: 207-222.
- ANTON, K.-W., 1998 a. Results of the Czechoslovak-Iranian entomological expeditions to Iran in 1970, 1973 and 1977. Coleoptera: Bruchidae. Čas. Nár. muzea, Řada přírod., **167**: 73-90.
- , 1998 b. 89. Familie: Bruchidae. In LUCHT, W. & B. KLAUSNITZER, Die Käfer Mitteleuropas, **15** (Suppl. 4): 324-325. Göcke & Evers, Krefeld.
- BOROWIEC, L., 1985. The status of *Bruchus tragacanthae* OLIVIER (Coleoptera, Bruchidae). Polskie Pol. Pismo Entomol., **55**: 245-249.
- , 1988. Bruchidae. Strakowce (Insecta: Coleoptera). In: Fauna Polski, Warszawa, **11**: 326 pp.
- BRANDL, P., 1981. 89. Familie: Bruchidae (Samenkäfer). In: FREUDE, H., HARDE, K. W. & G. A. LOHSE, Die Käfer Mitteleuropas, **10**: 7-20. Göcke & Evers, Krefeld.
- CAILLOL, H., 1954. Bruchidae (Laridae-Mylabridae). Catalogue des Coléoptères de Provence, Muséum National d'Histoire naturelle, Paris, 4ème partie : 7-30.
- CALDERON, M., 1962. The Bruchidae of Israel. Rivista Parassitol., **23**: 207-215.
- DECELLE, J. & N. LODOS, 1989. Contribution to the study of legume weevils of Turkey (Coleoptera: Bruchidae). Bull. Ann. Soc. roy. belge Entomol., **125**: 163-212.
- DELOBEL, A. & B. DELOBEL, 2003. Les plantes hôtes des bruches (Coleoptera Bruchidae) de la faune de France, une analyse critique. Bull. Soc. linéen. Lyon, **72**: 199-221.
- DE LUCA, Y., 1962. Contributions aux Bruchides (Col.) d'Algérie. Leurs hôtes. Leurs parasites. Leurs stations. Mém. Soc. Hist. nat. Afrique Nord, **7**: 1-115.
- FAHRAEUS, O.J., 1839. In: SCHOENHERR, C.J., Genera et species curculionidum, cum synonymia hujus Familiae, **5** (1). Roret, Paris; F. Fleischer, Stockholm, 456 pp.
- HOFFMANN, A., 1945. Coléoptères Bruchidae et Anthribidae. Faune de France, **44**: 1-184.
- ILDIS, 2004. International legume database and information service. Legume web. <http://www.ildis.org>.

- IABLOKOV-KHNZORIAN, S. M., 1959, Neue Käfer aus Sovjetarmenien (Bruchidae et Curculionidae). *Notulae Entomol.*, **38** (1958): 73-82.
- JACQUET, J., 1886. La description d'une nouvelle espèce de Coléoptère, *Bruchus leprieuri*. *Ann. Soc. entomol. Fr.*, **6** (6): 171.
- JOHNSON, C.D., 1970. Biosystematics of the Arizona, California, and Oregon species of the seed beetle genus *Acanthoscelides* Schilsky (Coleoptera: Bruchidae). *Univ. California Publications in Entomol.*, **59**: 1-116.
- KAHLEN, M., 1987. Nachtrag zur Käferfauna Tirols. Ergänzungen zu den bisher erschienenen faunistischen Arbeiten über die Käfer Nordtirols (1950, 1971 und 1976) und Südtirols (1977). Veröffentl. Mus. Ferdinandeum, Innsbruck, **67** (3).
- KARAPETJAN, A. P., 1985. Zernovki (Bruchidae). Fauna Armyanskoy SSR. Nasekomye zhestkokrylye. Akademia Nauk Arminskoy SSR, Erewan, 171 pp.
- LUKJANOVITCH, F.K. & M.E. TER-MINASSIAN, 1957. Zuki-zernovski (Bruchidae). Fauna SSR, Zestkokrylye, **24** (1): 1-209.
- MOTSCHULSKY, V., 1874. Enumération des nouvelles espèces de Coléoptères rapportés de ses voyages par feu Victor Motschoulsky. *Bull. Soc. imp. nat. Moscou*, **47** : 203-252.
- NORMAND, H., 1937. Contribution au catalogue des Coléoptères de Tunisie. *Bull. Soc. Hist. nat. Afr. Nord*, **28**: 116-143.
- PARKER, H.L., 1957. Notes sur quelques bruches et leurs parasites élevés des graines de Légumineuses. *Bull. Soc. entomol. Fr.*, **62**: 168-179.
- PEYERIMHOFF, P. de, 1915. Notes sur la biologie de quelques Coléoptères phytophages du nord-africain. *Ann. Soc. entomol. Fr.*, **84**: 19-61.
- , 1926. Notes sur la biologie de quelques Coléoptères phytophages du Nord Africain (quatrième série). *Ann. Soc. entomol. Fr.*, **95**: 319-390.
- SANDERSON, M. J. & M. F. WOJCIECHOWSKI, 1996. Diversification rates in a temperate legume clade: Are there so many species of *Astragalus* (Fabaceae)? *American Journ. Bot.*, **83**: 1488-1502.
- SCHILSKY, J., 1905. Bruchidae. In KÜSTER, H. C. & G. KRAATZ, Die Käfer Europa's. Nach der Natur beschrieben, **41**. Bauer und Raste, Nürnberg, nos 1-100.
- SIMON, C., F. FRATI, A. BECKENBACH, B. CRESPI, H. LIU & P. FLOOK, 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **87**: 651-702.
- SWOFFORD, D.L., 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- TER-MINASSIAN, M. E. , 1954. Novye vidy zernovok (Coleoptera, Bruchidae) Fauny SSSR. Trudy Zoologicheskoy Zool. Instituta Inst. Akademia Akad. Nauk SSR, Leningrad, **15**: 67-73.
- THOMPSON, J.D., T.J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN & D.G. HIGGINS, 1997. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **24**: 4876-4882.
- WOJCIECHOWSKI, M.F., M.J. SANDERSON & J.-M. HU, 1999. Evidence on the Monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its Major Subgroups Based on Nuclear Ribosomal DNA ITS and Chloroplast DNA *trnL* Intron Data. *Systematic Bot.*, **24**: 409-437.
- ZACHER, F., 1952. Die Nährpflanzen der Samenkäfer. Liste 1: Verzeichnis der von den einzelnen Bruchiden-Arten befallenen Nährpflanzen. *Zeitschr. angew. Entomol.*, **33**: 460-482.

Seconde partie : Méthodes d'inférence en phylogénie moléculaire

Cette partie a pour objet de présenter de façon synthétique les principales méthodes de reconstruction phylogénétique (pour des données moléculaires), ainsi que quelques uns des estimateurs couramment utilisés dans ce domaine. De nombreuses études exhaustives (voir par exemple : Darlu & Tassy, 2003 ; Swofford *et al.*, 1996 ; Nei & Kumar, 2000 ; Grant & Kluge, 2003 ; Felsenstein, 2004) ont été publiées sur ces sujets, aussi cette présentation restera volontairement synthétique sur de nombreux points.

Dans un premier temps, les principes des trois principales méthodes de reconstruction phylogénétique seront détaillés. Une importance toute particulière sera donnée à l'inférence bayésienne dont l'utilisation en inférence phylogénétique est récente et tend à se généraliser (Holder & Lewis, 2003). Par la suite, différents points spécifiques relatifs aux analyses des données contenues dans ce rapport seront également présentés. Il sera question, par exemple, du traitement de jeux de données multiples, ou encore de l'estimation de la robustesse des topologies obtenues au moyen de différentes méthodes statistiques.

La dernière section de cette partie correspond à une étude publiée récemment (Kergoat & Silvain, 2004). Elle s'intéresse à la question de la monophylie du genre *Bruchidius*. Ce point est important la dernière partie de la thèse porte sur l'étude de l'évolution de ce genre, en relation avec l'évolution de leurs plantes-hôtes. En conséquence, il est important de définir les contours de ce genre, afin de pouvoir raisonner ultérieurement sur des groupes monophylétiques, au moment de tester différents patrons d'interactions évolutives. Cette dernière partie permet aussi d'illustrer l'utilisation des méthodes et de certains estimateurs qui sont détaillés dans les deux premières sections de cette partie.

Chapitre premier : Distance, parcimonie et vraisemblance

Section I : Les méthodes phénétiques

1.1. Généralités

Les méthodes phénétiques⁴⁴ ont été élaborées à la fin des années cinquante par C.D. Michener et R.R. Sokal. Ces méthodes regroupent les espèces (où unités évolutives : UE) en fonction de leur similitude globale (Darlu & Tassy, 1993). Les relations entre UE sont appelées relations phénétiques, et les classifications qui en découlent le sont également. Les relations phylétiques entre UE sont représentées par des schémas spécifiques, les phénogrammes. Comme le soulignent Darlu & Tassy (1993), ces phénogrammes ne sont pas à proprement parler des arbres phylogénétiques mais ils sont souvent interprétés comme tel dans de nombreuses études. Ils peuvent toutefois être assimilés à des arbres phylogénétiques, sous conditions que certaines hypothèses évolutives concernant l'évolution des caractères soient posées (Darlu & Tassy, 1993). Ces phénogrammes vont être construits à partir d'analyses de distance qui utilisent des matrices d'indices de ressemblance, ou de dissemblances, pour regrouper les taxons sur la base de leur similitude globale. A la différence d'autres méthodes, les méthodes phénétiques tendent à utiliser le maximum de caractères pour définir les similitudes entre les taxons, y compris certains caractères⁴⁵ qui ne sont pas utilisés ou minimisés par les méthodes de parcimonie, ou les méthodes probabilistes.

Pour des données moléculaires, cette similitude globale correspond à la fraction de sites nucléotidiques (ou d'acides aminés) qui diffèrent entre deux séquences d'un alignement donné (degré de divergence). Plus cette fraction va être faible, plus la similitude globale entre les deux unités évolutives considérées va être importante. Il semble aussi évident que cette fraction va augmenter proportionnellement au temps qui se sera écoulé à partir du moment où deux unités évolutives auront divergé d'un ancêtre commun.

Cependant, dans la réalité, les choses sont rarement aussi simples pour deux raisons. Tout d'abord, des lignées évolutives données peuvent évoluer à des vitesses différentes. De plus, deux lignées évolutives évoluant à la même vitesse peuvent accumuler des substitutions multiples. Ces substitutions multiples correspondent à des substitutions qui ont lieu à de multiples reprises sur un même site nucléotidique. En conséquence, des distances non corrigées vont toujours sous-estimer le nombre de changements entre deux lignées évolutives données.

⁴⁴ synonyme : méthodes de distance

⁴⁵ caractères homoplasiques, plésiomorphes ou autapomorphes

Actuellement, on distingue en particulier deux méthodes de distances, qui utilisent une série de calculs pour reconstruire des phénogrammes, les méthodes dites d'« Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean » (UPGMA) et de « Neighbor joining » (NJ). Ces calculs (pour des données moléculaires) portent sur des matrices de distances qui sont dérivés d'alignements de séquences multiples. A partir d'un alignement donné, ces méthodes vont calculer pour chaque paire d'UE (qui correspondent chacune à une séquence donnée), leur degré de divergence, qui correspond à la fraction de sites nucléotidiques (ou d'acides aminés) qui diffèrent entre les deux séquences alignées. Au final, ces calculs génèrent une matrice de distance qui va être analysée différemment selon la méthode considérée.

Cette transformation d'un alignement de séquences multiples en matrice de distances entraîne de facto une perte d'information phylogénétique irréversible (Whelan *et al.*, 2001 ; Holder & Lewis, 2003). En effet, on ne peut restituer toute l'information contenue dans une matrice de caractère à partir de la matrice de distances qui en dérive, et l'arbre construit par une méthode de distance ne renseigne pas sur l'état des caractères aux nœuds, ou sur leur évolution (Darlu & Tassy, 1993).

1.2. « Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean » (UPGMA)

Cette méthode repose sur l'hypothèse évolutive forte que les UE considérées évoluent à la même vitesse (« neutralité de l'horloge moléculaire »). Les distances qui vont être calculées sont dites ultramétriques (voir la différence avec les distances métriques additives Fig. 2.1.) : en conséquence, toutes les UE sont à égales distances de la racine. L'UPGMA est une méthode agglomérative qui va chercher en premier, dans une matrice de distance (à n UE), les deux UE qui sont séparées par la plus petite distance. Ces deux UE sont réunies sur un phénogramme, et l'on place un nœud à mi-distance des deux UE. On intègre par la suite le groupe formé par ces deux UE, dans une nouvelle matrice de distance réduite à $n-1$ UE. Cette procédure est répétée de manière cyclique jusqu'au moment où il ne reste plus qu'une paire d'UE dans la matrice. On obtient ainsi au final un phénogramme (non enraciné) incluant toutes les UE.

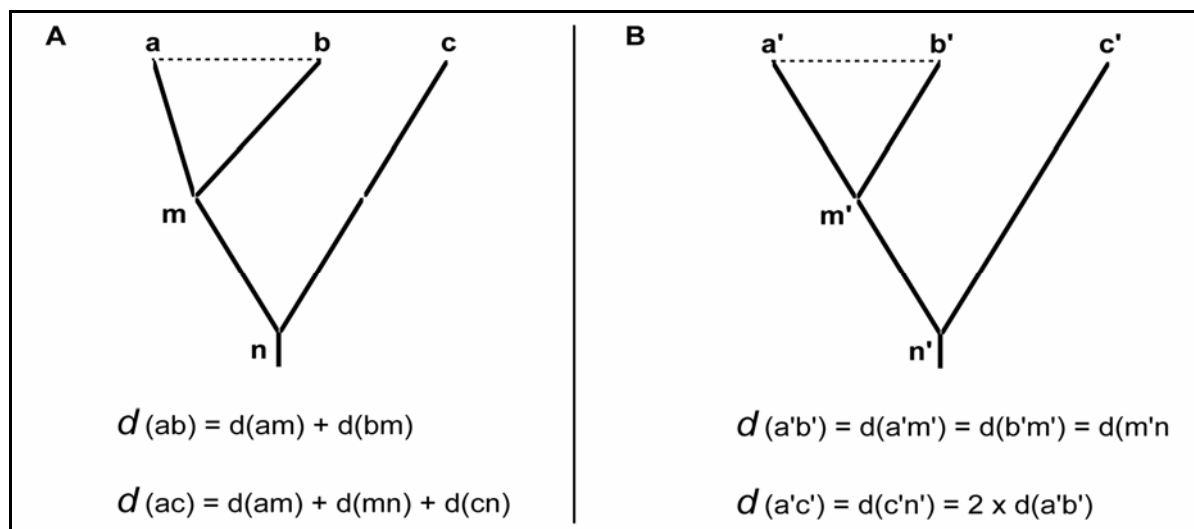


Figure 2.1. Schéma illustrant les notions de distances métriques additives (A), et de distances ultramétriques (B)

1.3. « Neighbor joining » (NJ)

Cette méthode de distance a été formalisée par Saitou & Nei en 1987. Elle est similaire à la méthode UPGMA dans le sens où elle manipule des matrices de distance, dont la taille est réduite à chaque étape de l'analyse, pour construire un arbre (Hall, 2001).

Cependant, à la différence de l'UPGMA, la méthode de NJ ne repose pas sur l'hypothèse de « neutralité de l'horloge moléculaire ». Aussi, les distances entre les différentes UE ne sont pas ultramétriques, mais métriques et additives (cf. Fig. 2.1.). De plus, le NJ diffère de l'UPGMA par son critère de regroupement des UE. Dans un premier temps, on part d'un arbre non résolu où toutes les espèces partent du même nœud (cf. Fig. 2.2.). Puis on regroupe les deux UE qui sont plus proches entre elles qu'elles ne le sont de toutes les autres UE (Darlu & Tassy, 1993). Ces deux UE sont celles qui minimisent la valeur de S_{ab} donnée par la formule de la figure 2.2. Cette procédure est répétée (à chaque cycle une nouvelle matrice est créée) jusqu'à obtention de l'arbre (non enraciné) qui figure tous les branchements entre UE.

Afin de prendre en compte l'existence de substitutions multiples, il est nécessaire d'utiliser des distances corrigées⁴⁶ qui minimiseront les artefacts de reconstructions liés aux substitutions multiples ou aux différences de vitesses d'évolution. On utilise à cet effet des modèles explicites d'évolution de séquences, qui sont les mêmes que ceux utilisés dans les méthodes probabilistes⁴⁷ (voir section III).

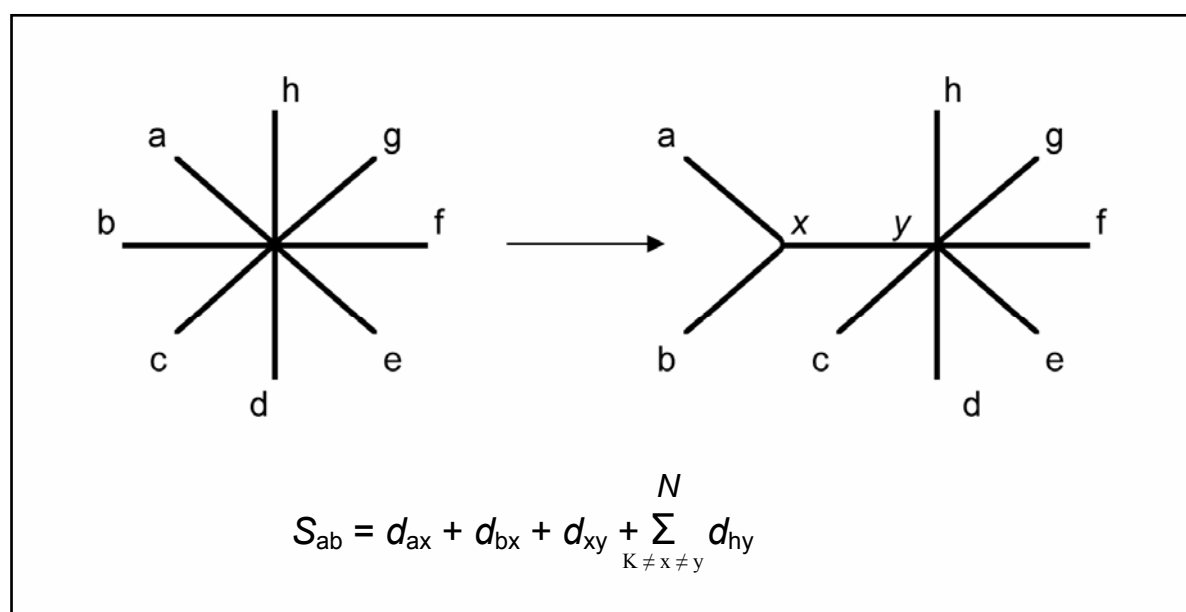


Figure 2.2. Schéma illustrant la méthode de NJ (modifié d'après Darlu & Tassy, 1993). Les distances figurées ne sont pas ultramétriques, et ainsi d_{ax} peut être très différent de d_{bx} . N correspond au nombre total d'UE.

⁴⁶ les distances corrigées ainsi obtenues ne sont plus nécessairement additives (voir Darlu & Tassy, 1993)

⁴⁷ Ces modèles font généralement varier trois grands types de paramètres (Whelan *et al.*, 2001) : (i) la fréquence des bases ; (ii) les taux de transitions, transversions des différentes bases ; (iii) les différences de vitesse d'évolution

Section II : La méthode cladistique

2.1. Généralités

La méthode cladistique a été formalisée par l'entomologiste allemand W. Hennig (1950, 1966), puis popularisée par des auteurs anglo-américains qui vont en définir la terminologie actuelle⁴⁸ (Darlou & Tassy, 1993).

Elle repose sur la prise en compte des états de caractères homologues, qui vont être identifiés⁴⁹ comme étant plésiomorphes (état ancestral) ou apomorphes (état dérivé). Pour Hennig, le partage d'un même caractère apomorphe par deux taxons signifie que ce caractère est hérité d'un ancêtre commun, et il correspond à une synapomorphie (« principe auxiliaire de Hennig »). Suivant le principe d'économie d'hypothèse (de « parcimonie »), la méthode cladistique va chercher à reconstruire l'arbre qui maximise le nombre de caractères dus à l'ascendance commune (cad les synapomorphies), et qui minimise les homoplasies (voir Fig. 2.3.). Cela revient donc à retenir le ou les arbres qui requièrent le moins de transformations d'états de caractères (les arbres les plus « parcimonieux »).

Pour des données moléculaires les caractères correspondent aux sites des séquences nucléotidiques et protéiques. Pour l'ADN et l'ARN, ces caractères peuvent avoir cinq états : A, T/U, G, C, - . Le dernier état, figuré par un tiret, correspond à des insertions ou des délétions (indels), et il dépend donc directement de l'alignement. Ces indels sont introduits dans les alignements de séquences pour maximiser les hypothèses d'homologies des sites nucléotidiques ou protéiques. Pour des séquences protéiques, les caractères sont les 20 acides aminés, le codon stop et les indels.

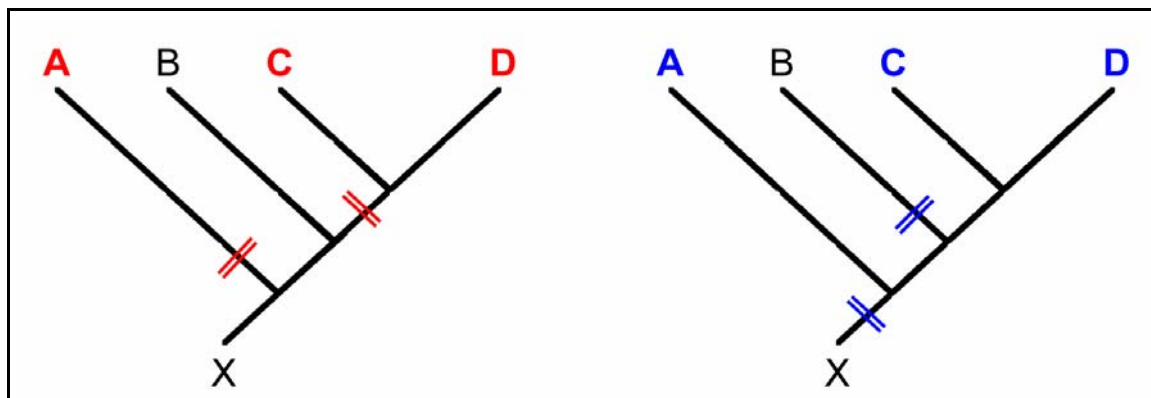


Figure 2.3. Schéma illustrant une homoplasie consécutive à une convergence (à gauche), et une homoplasie consécutive à une réversion (à droite). Dans les deux cas A, C et D partagent le même état de caractère dérivé alors même qu'ils ne sont pas les trois taxons les plus proches phylogénétiquement.

⁴⁸ ainsi Hennig emploie les termes suivants : « systématique phylogénétique » (pour désigner la méthode cladistique), « congruence » (pour désigner le concept de parcimonie) et « schéma d'argumentation phylogénétique » (pour désigner un cladogramme)

⁴⁹ cette identification ne se fait pas a priori et utilise généralement le critère de comparaison d'extra-groupe (Swofford *et al.*, 1996)

Seuls des caractères variants, et qui présentent le même état chez au moins deux taxons sont utilisés (caractères informatifs). Les caractères constants (cad qui présentent le même état de caractère chez tous les taxons de l'analyse) et les caractères variants mais non informatifs (cad qui présentent le même état de caractère chez tous les taxons sauf un) ne sont pas utilisés dans l'analyse cladistique.

La question du traitement des substitutions multiples et des différences de vitesses d'évolution est importante si l'on veut minimiser les artefacts de reconstruction. En parcimonie, on peut être ainsi confronté au phénomène d'« attraction des longues branches ». Dans ce cas de figure des espèces qui ont évolué très rapidement peuvent être regroupées alors qu'elles ne sont pas les plus apparentées (le choix de l'arbre faux est ici le plus parcimonieux).

2.2. Application

En pratique, la méthode cladistique recherche l'arbre ou les arbres qui vont minimiser le nombre de pas évolutifs⁵⁰ nécessaires pour expliquer les données (utilisation du « critère de parcimonie »). Par défaut⁵¹, le nombre total de pas évolutifs d'un arbre donné va correspondre à sa longueur (« score » de l'arbre). En cladistique la longueur des branches visualise donc le nombre de transformation, à la différence des méthodes de distance où la longueur des branches correspond à un taux d'évolution.

Cette recherche de l'arbre le plus parcimonieux fait appel à deux composantes : le critère de choix de l'arbre (qui varie selon certaines contraintes propres à des méthodes données), et l'algorithme de recherche à proprement parler (Swofford *et al.*, 1996).

Le critère de choix de l'arbre peut varier selon la variante utilisée du critère de parcimonie. La plus simple est la parcimonie au sens de Fitch (1971), qui n'a aucune contrainte et qui autorise toute transformation d'un état de caractère à un autre. La parcimonie de Wagner (formalisée par Farris, 1970) est un peu plus stricte et intègre un passage obligé par le ou les états intermédiaires, dans le cas de caractères ordonnés⁵². Ces deux variantes reposent sur l'hypothèse que les probabilités de transformations des états de caractère sont symétriques et identiques (Swofford *et al.*, 1996). En 1965, Camin & Sokal proposent un modèle de parcimonie plus contraint, dans lequel toutes les homoplasies vont correspondre à des convergences. A contrario, dans la parcimonie de Dollo, formalisée par Farris (1977), toutes les homoplasies vont correspondre à des réversions. Ces deux contraintes fortes font que les longueurs des arbres correspondants seront plus importantes par rapport à un modèle de parcimonie non contraint. Une approche plus synthétique est proposée par plusieurs auteurs (Sankoff, 1975 ; Swofford & Olsen, 1990). Cette méthode dite de parcimonie généralisée utilise des matrices de coûts, afin de pondérer spécifiquement les différentes transformations d'états de caractère (Swofford *et al.*, 1996).

⁵⁰ correspondent au passage d'un état de caractère à un autre

⁵¹ en absence de pondération

⁵² cela concerne généralement des données non moléculaires

Les algorithmes de recherche d'arbre se divisent en deux catégories spécifiques : (i) les algorithmes de recherche exhaustif ; (ii) les algorithmes de recherche heuristique.

Les algorithmes de recherche exhaustif garantissent de trouver effectivement l'arbre le plus court (solution exacte). Ils peuvent procéder suivant deux méthodes. La première consiste à chercher et à estimer le score de toutes les topologies existantes, en utilisant un algorithme qui va additionner progressivement toutes les UE du jeu de donnée à partir d'un arbre à trois taxons (« branch-addition algorithm »). Cette recherche prend énormément de temps et ainsi pour 11 taxons il faut estimer 34 459 425 arbres (Swofford *et al.*, 1996). L'alternative à l'estimation de toutes les topologies possibles, est l'algorithme de « branch and bound » qui garanti aussi de trouver l'arbre le plus court, sans pour autant estimer tous les arbres existants. Cet algorithme génère au départ un arbre aléatoire qui contient toutes les UE, et il en estime le score. Puis il part d'un arbre à trois taxons, il ajoute un nouveau taxon (qu'il place aléatoirement) et estime le score de ce nouvel arbre. S'il est inférieur au score de l'arbre contenant tous les taxons, alors il rajoute un nouveau taxon de manière aléatoire et estime à nouveau le score de l'arbre. Si à une étape le score de l'arbre en construction est supérieur au score de l'arbre aléatoire alors le cycle s'arrête et reprend au tout début, à une exception près : tous les arbres qui peuvent dériver du premier branchement aléatoire (ici le branchement du quatrième taxon) ne seront pas évalués. Par contre, si après addition de tous les taxons le score de l'arbre obtenu est inférieur à celui de l'arbre aléatoire, alors cette topologie devient la nouvelle topologie de référence pour l'analyse. L'analyse se poursuit jusqu'au moment où toutes topologies estimables ont un score inférieur à la topologie de référence. Cependant, même si les recherches utilisant l'algorithme de « branch and bound » sont plus rapides, la recherche d'une solution exacte n'est pas envisageable au-delà d'un nombre de taxon compris entre 20 et 30 (Darlu & Tassy, 1993 ; Holder & Lewis, 2003). Par ailleurs, le temps de calcul en « branch and bound » sera plus important si le jeu de donnée contient beaucoup d'homoplasies (Darlu & Tassy, 2003).

Comme en « branch and bound », les algorithmes de recherche heuristique n'examinent pas tous les arbres possibles (mais ils sont donc beaucoup plus rapides). L'un des algorithmes couramment utilisé est l'algorithme qui utilise la méthode de « stepwise addition ». Il part d'un arbre à trois taxons et procède par étape, en ajoutant à chaque étape un nouveau taxon. Cette méthode va estimer le score de tous les arbres qui peuvent résulter de l'ajout d'un taxon, et à chaque étape, elle ne conserve que celui qui a le meilleur score. L'inconvénient de ce genre de méthode est que l'on peut facilement arriver à un optimum local et donc ne pas trouver le meilleur arbre possible. D'autres algorithmes (« branch swapping » par exemple) partent d'une topologie donnée, et effectuent des manipulations dans les branchements des différents clades pour générer des topologies alternatives. Si des topologies présentant de meilleurs scores sont trouvées, alors elles servent de point de départ à de nouvelles recombinaisons. Ce processus se répète jusqu'au moment où l'on arrive plus à améliorer les scores des arbres. Toutes ces méthodes donnent donc des solutions dites « approchées » et elles peuvent être très sensibles à la présence d'optimum locaux. Ces optimum locaux peuvent être symbolisés par des collines dans un espace à trois dimensions qui correspond à une simplification de l'univers de tous les arbres possibles (fonction de n paramètres). Aussi le terme de recherche en « hill-climbing » est souvent utilisé pour qualifier les recherches heuristiques.

Les recherches heuristiques ne sont pas propre à la méthode cladistique, et ainsi elles sont par exemple presque systématiquement utilisées en maximum de vraisemblance.

Section III : Les méthodes probabilistes

3.1. Généralités

Les méthodes probabilistes sont des méthodes statistiques qui reposent sur le calcul de la « vraisemblance » des arbres. Cette vraisemblance correspond à la probabilité d'observer les données, pour un modèle d'évolution de caractère⁵³ défini a priori, et un arbre donné. Le choix du modèle d'évolution de caractère est crucial car les paramètres du modèle vont décrire les probabilités de nombreux événements (par exemple la probabilité d'avoir une transition ou une transversion)(Whelan *et al.*, 2001). Il existe à la fois des modèles d'évolution de séquences nucléotidiques et protéiques (Jones *et al.*, 1992 ; Schadt *et al.*, 2002). Certains modèles sont couramment utilisés dans le traitement de données de séquences nucléotidiques, et ils peuvent être représentés de façon schématique (cf. Fig. 2.4.).

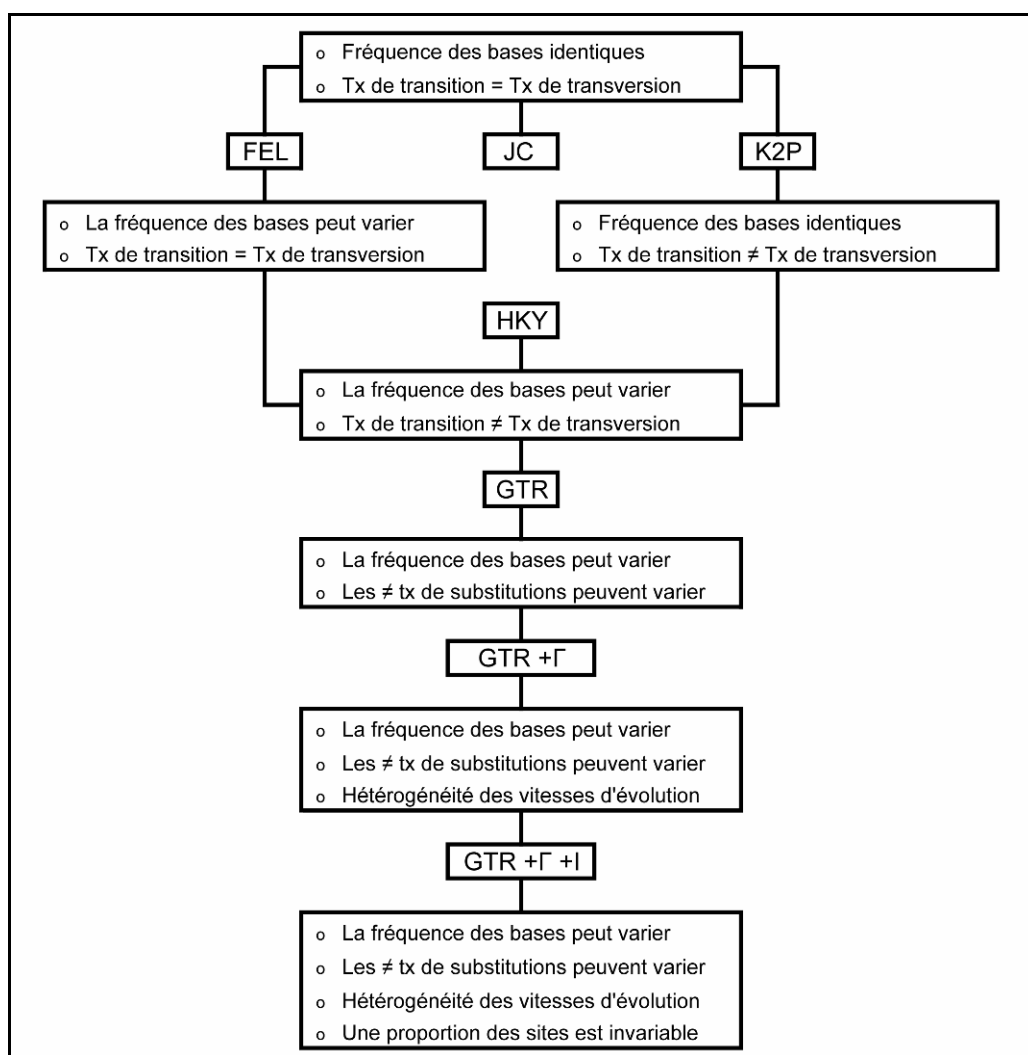


Figure 2.4. Schéma illustrant différents modèles d'évolution de séquences du plus simple (en haut) au plus complexe (en bas). Les références complètes de ces modèles sont les suivantes : modèle JC (Jukes & Cantor, 1969) ; modèle FEL (Felsenstein, 1985) ; modèle K2P (Kimura, 1980) ; HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) ; GTR, GTR + Γ , GTR + Γ + I (Lanave *et al.*, 1984 ; Yang, 1994 ; Gu *et al.*, 1995).

⁵³ ces modèles ne permettent de traiter que des données moléculaires

3.2. Maximum de vraisemblance

L'utilisation de la méthode de maximum de vraisemblance en inférence phylogénétique a été proposée par Cavalli-Sforza & Edwards (1967), puis popularisée par Felsenstein (1981). En maximum de vraisemblance, on recherche la topologie qui va maximiser les probabilités d'observer les données, pour un modèle d'évolution donné. Tout paramètre dont la valeur n'est pas explicitée a priori peut être estimé de façon simultanée pendant la recherche, de façon à sélectionner sa valeur qui va maximiser la vraisemblance (Whelan *et al.*, 2001).

Ce calcul de la vraisemblance, dans le cas très simple d'un arbre à quatre taxons, est représenté sur la figure 2.5. Comme pour la méthode cladistique, des algorithmes de recherche (heuristiques le plus souvent) sont utilisés pour trouver la topologie présentant le meilleur score de vraisemblance.

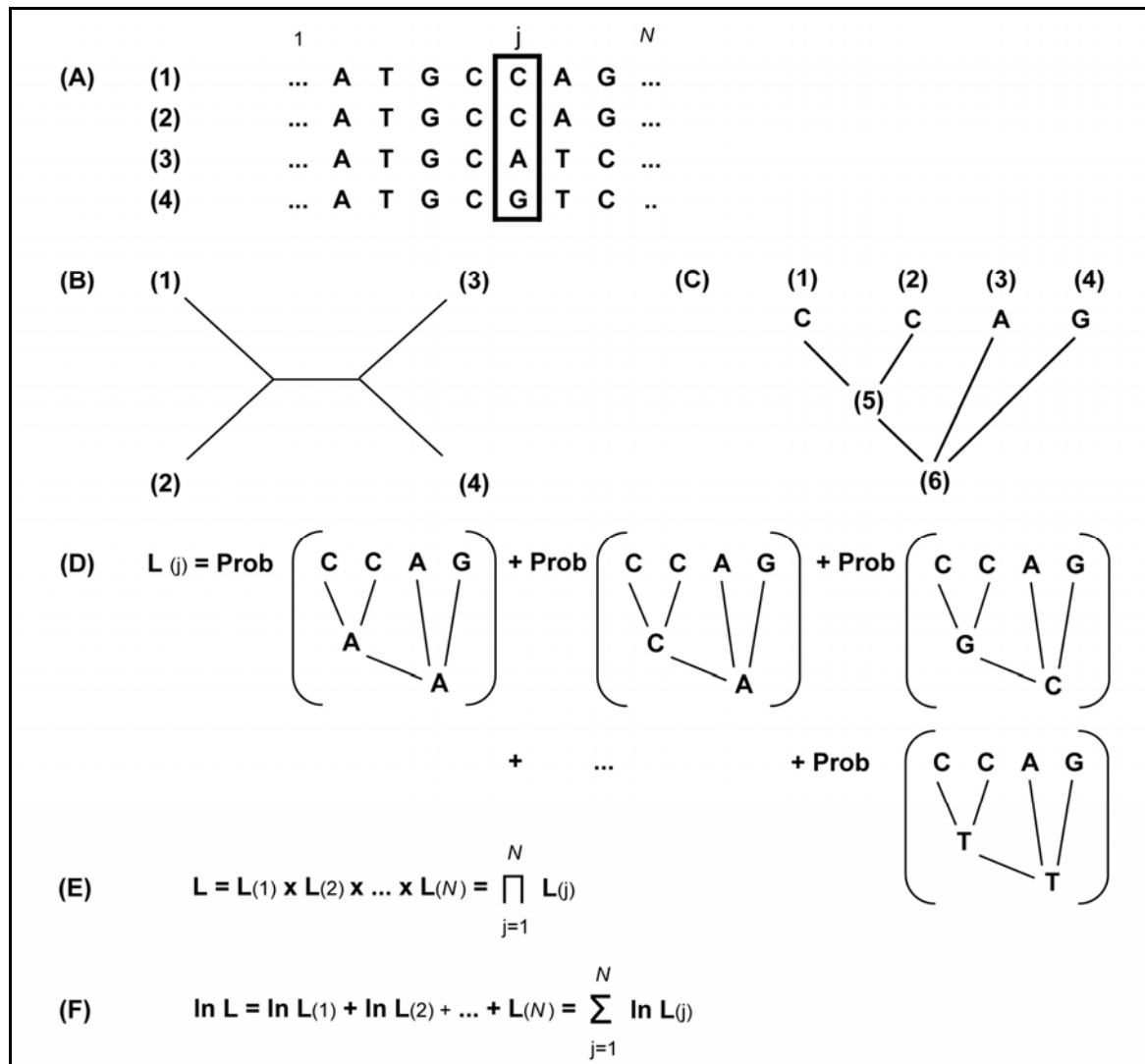


Figure 2.5. Schéma illustrant le calcul de la vraisemblance L d'un arbre donné (d'après Swofford *et al.*, 1996). (A) Jeu de données hypothétique de 4 taxons et N caractères. (B) Arbre non enraciné des quatre taxons du jeu de données. (C) Le même arbre enraciné aléatoirement, avec les états de caractère d'un site donné j . (D) La vraisemblance pour un site donné j est la somme des probabilités de toutes les reconstructions possibles des états ancestraux (pour un modèle d'évolution donné). (E) La vraisemblance globale de l'arbre (L) est le produit des vraisemblances de chaque site. (F) Le score de vraisemblance est généralement estimé en sommant les logarithmes des vraisemblances de chaque site.

3.3. Inférence bayésienne

Le principe de l'inférence bayésienne est ancien en statistique et remonte au 18^{ème} siècle (Huelsenbeck *et al.*, 2002) et il repose sur la notion de probabilité a posteriori.

Cette notion peut être illustrée simplement par un exemple de jeu de hasard. Ainsi, si l'on considère le modèle suivant :

Jeu de hasard : tirage de pièces à  pile ou  face.

90 % des pièces sont non biaisées (NB).

10 % des pièces sont biaisées (B) dans 80 % des cas, elle donnent le résultat face.

Si l'on prend une pièce au hasard et qu'on se demande qu'elle est la probabilité que cette pièce soit biaisée connaissant le modèle ... la réponse évidente est que cette probabilité est de 10 %.

Si l'on suppose maintenant que l'on puisse lancer cette même pièce dix fois et que la même question soit posée. On peut alors revoir sa réponse en tenant compte de la distribution des résultats observés. Cette nouvelle probabilité, qui tient compte des dix lancers, correspond à la probabilité a posteriori.

Avec la série suivante :



X symbolisant les résultats on a :

$$P(X|NB) = 0.5^{10} = 9.76 \times 10^{-4} \text{ et } P(X|B) = 0.8^7 \times 0.2^3 = 1.67 \times 10^{-3}$$

La probabilité a posteriori que la pièce soit biaisée est donnée par la formule de Bayes :

$$P(B|X) = \frac{P(X|B) \times P(B)}{P(X|B) \times P(B) + P(X|NB) \times P(NB)} = \frac{1.67 \times 10^{-3} \times 0.1}{(1.67 \times 10^{-3} \times 0.1) + (9.76 \times 10^{-4} \times 0.9)} = 0.13$$

Notre estimation de la probabilité que la pièce tirée au hasard soit biaisée est donc passée de 10 à 13 % après l'observation des résultats.

Il faut attendre 1968 pour que Felsenstein introduise la notion de probabilité a posteriori pour des arbres phylogénétiques, sans pour autant être en mesure de la calculer à l'époque, et ce n'est que par l'utilisation récente de la méthode des « chaînes de Markov de Monte Carlo » (MCMC : Metropolis *et al.*, 1953 ; Hastings, 1970 ; Green, 1995) que l'estimation de ces probabilités a posteriori est possible (Huelsenbeck *et al.*, 2002).

En 1996, l'utilisation de l'inférence bayésienne en phylogénie moléculaire (par le calcul des probabilités a posteriori des arbres phylogénétiques) est proposée la même année par trois groupes de recherche distincts (Li, 1996 ; Mau, 1996 ; Rannala & Yang, 1996). A la différence du maximum de vraisemblance qui cherche à obtenir un seul arbre avec la plus forte vraisemblance, l'inférence bayésienne va utiliser la méthode MCMC pour estimer les probabilités a posteriori d'un très grand nombre de phylogénies. Les probabilités a posteriori de ces arbres ($i^{\text{ème}}$ arbre) sont données par la formule de Bayes:

$$P(T_i|X) = \frac{P(X|T_i) \times P(T_i)}{\sum_{j=1}^{B(s)} P(X|T_j) \times P(T_j)}$$

avec :

$P(T_i X)$:	probabilité a posteriori du $i^{\text{ème}}$ arbre
$P(X T_i)$:	vraisemblance du $i^{\text{ème}}$ arbre
$P(T_i)$:	probabilité a priori du $i^{\text{ème}}$ arbre

Le dénominateur correspond à une constante normalisatrice qui prend en compte la somme de tous les arbres possibles $B(s)$.

Au final, le calcul de la probabilité a posteriori d'un arbre implique le calcul de l'intégration de toutes les combinaisons possibles de longueurs de branches et des paramètres des modèles d'évolution de séquence (ce qui équivaut à la vraisemblance du $i^{\text{ème}}$ arbre), et ce pour tous les arbres existants. Ce calcul est impossible à l'exception de certains cas simplifiés à l'extrême et il faut donc approximer ces probabilité a posteriori en utilisant la méthode MCMC.

La méthode MCMC peut être symbolisée par une recherche aléatoire dans l'univers de tous les arbres possibles (fonction de n paramètres et du jeu de donnée). Cet univers est multidimensionnel, mais l'on peut le schématiser en trois dimension en ne considérant que 2 paramètres.

Classiquement on part d'un arbre ψ (aléatoire ou non) pour démarrer une chaîne de Markov dans l'univers de tous les arbres possibles. Puis l'on propose un nouvel arbre ψ' qui va avoir une probabilité R d'être accepté comme le nouvel état de la chaîne. A chaque étape (génération) on estime la vraisemblance des différentes topologies et cette valeur est utilisée dans le calcul de la probabilité R .

avec :

$$R = \min \left(1, \underbrace{\frac{f(X|\psi')}{f(X|\psi)}}_{\text{likelihood ratio}} \times \underbrace{\frac{f(\psi')}{f(\psi)}}_{\text{prior ratio}} \times \underbrace{\frac{f(\psi|\psi')}{f(\psi'|\psi)}}_{\text{proposal ratio}} \right)$$

Un nombre aléatoire compris entre 0 et 1 est généré, et si ce nombre est inférieur à R , ψ' devient le nouvel état de la chaîne (et ce même si la vraisemblance de l'arbre ψ' est inférieure à la vraisemblance de l'arbre ψ). Cette démarche est répétée des dizaines de milliers de fois et le nombre de fois où la chaîne va visiter un arbre donné donne une approximation valide de la probabilité a posteriori de cet arbre.

Cette recherche correspond donc à une recherche heuristique, et elle ne garantit donc pas de trouver la région où l'on retrouve les arbres avec les plus fortes valeurs de vraisemblance (notion d'optimum local). Plus le nombre de générations est important, plus on augmente les chances que la chaîne de Markov converge vers une région avec de fortes probabilités a posteriori. En effet, on peut avoir une valeur de vraisemblance qui semble stable pendant un grand nombre de générations, puis qui augmente à nouveau pour atteindre un autre plateau.

En outre, certains auteurs recommandent l'utilisation d'analyses indépendantes afin de voir si elles convergent toutes vers les mêmes valeurs (Huelsenbeck *et al.*, 2002).

Il faut aussi tenir compte en début d'analyse d'une période qui précède la convergence de la chaîne de Markov vers des régions où les vraisemblances des arbres sont fortes. Cette période est appelée « burn-in » et les topologies correspondantes sont supprimées lors du calcul des probabilités a posteriori des arbres. Il est possible de la visualiser en projetant sur un graphique les scores de vraisemblances des arbres obtenus pour chaque génération. La période de « burn-in » correspond à la période qui précède l'obtention d'un plateau sur le graphique (voir Fig. 2.6.).

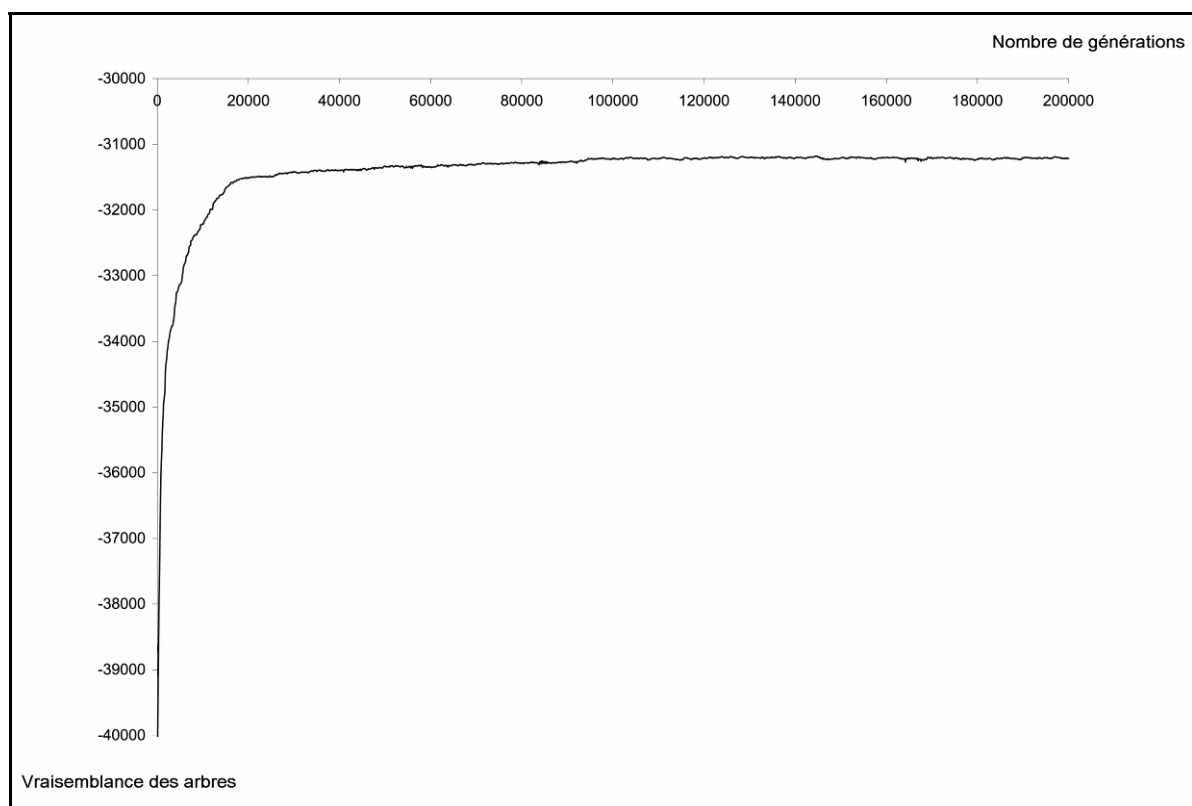


Figure 2.6. Graphique illustrant l'évolution des scores de vraisemblances des arbres en fonction du nombre de générations lors d'une analyse en inférence bayésienne.

Une amélioration de la méthode MCMC a été proposée par Geyer (1991) : la méthode de « Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo » (MCMCMC ou MC³). Cette méthode consiste à lancer en parallèle n chaînes de Markov. L'une d'elle est appelée « chaîne froide » et est identique aux chaînes utilisées classiquement. Les autres chaînes sont dites « chaudes » et utilisent une distribution de la forme $P(T_i|X)\beta_i$ où β_i est compris entre 0 et 1 et fonction d'un paramètre T (température). A intervalles réguliers ces chaînes de Markov peuvent échanger leurs états ce qui permet d'éviter qu'une chaîne stagne dans une région correspondant à un optimum local. En outre, les chaînes chaudes franchissent plus facilement les « vallées » qui séparent les « collines » correspondant à des valeurs élevées, dans l'univers de tous les arbres possibles.

Généralement on présente les résultats d'une analyse en inférence bayésienne sous la forme d'un arbre de consensus majoritaire où les valeurs au niveau des nœuds correspondent à la probabilité a posteriori que le clade est valide (sont exclus de ce consensus toutes les topologies obtenues pendant la période de « burn-in »).

3.4. Choix du modèle d'évolution

Quelque soit la méthode employée (maximum de vraisemblance ou inférence bayésienne), il est important de définir un modèle d'évolution (ou une famille de modèle) pertinent. Il peut être tentant de privilégier des modèles d'évolution complexes, mais il faut savoir que plus un modèle est complexe, plus la variance des paramètres estimés est grande, et plus le temps de calcul est important (Holder & Lewis, 2003). Aussi il est préférable de trouver un compromis en utilisant un modèle qui sera suffisamment complexe (sans l'être trop), en se basant sur les données observées (Posada & Crandall, 2001 ; Bollback, 2002 ; Holder & Lewis, 2003).

Il est possible de comparer les performances de différents modèles à l'aide de tests statistiques qui vont utiliser la fonction de vraisemblance (« likelihood ratio tests » : LRT). Le principe de ces tests est le suivant : on compare deux modèles M_0 (le moins complexe des deux) et M_1 en utilisant une valeur statistique (2δ) basée sur le rapport du score le plus élevé en vraisemblance, pour chaque modèle (L_0 et L_1). Cette valeur (2δ) mesure à quel point les données observées vont être mieux expliquées par le modèle alternatif (ici M_1).

On a ainsi :

$$2\delta = 2\ln (L_1 / L_0) = 2 (\ln L_1 - \ln L_0)$$

Si la valeur de 2δ observée est trop grande par rapport à la distribution⁵⁴ des valeurs de 2δ sous le modèle M_0 (ce qui correspond à une valeur seuil inférieure à 0.05 ; pour un seuil de 5 %), le modèle d'évolution M_0 est alors rejeté en faveur du modèle M_1 .

Il existe par ailleurs d'autres méthodes de sélection des modèles d'évolution, qui utilisent par exemple l'inférence bayésienne (voir par exemple : Minin *et al.*, 2003).

⁵⁴ en général distribution de type χ^2 avec un degré de liberté égal à la différence du nombre de paramètres entre les deux modèles

Chapitre second : Analyses de jeux de données multiples et estimateurs

Section I. Analyses séparées vs analyses combinées

1.1. Généralités

En moins de vingt ans, la quantité de données de séquences a augmenté de façon exponentielle, en raison d'avancées techniques récentes en biologie moléculaire. La généralisation de la méthode de « polymerase chain reaction », le développement des kits d'extraction, de purification, et du séquençage automatique ont ainsi grandement facilité l'obtention de données moléculaires. Dans le domaine de l'inférence phylogénétique, un nombre croissant d'études utilisent désormais plusieurs jeux de données moléculaires pour inférer des hypothèses phylogénétiques. Toutefois, le traitement de jeux de données multiples n'est pas simple, et l'on peut opposer différentes approches méthodologiques (Huelsenbeck *et al.*, 1996).

Une de ces approches consiste à concaténer les séquences de plusieurs gènes distincts en un seul block, qui sera analysé par la suite. Cette approche est recommandée par certains auteurs qui recommande son utilisation systématique⁵⁵ (« total evidence » au sens de Kluge, 1989). Cependant cette utilisation systématique de la combinaison des partitions d'un jeu de données apparaît comme quelque peu naïve car elle ne se justifie que lorsque on suppose que tous les gènes considérés évoluent de façon similaire (Whelan *et al.*, 2001).

Assez souvent, les signaux phylogénétiques provenant de différents gènes peuvent être contradictoires et générer des arbres phylogénétiques très distincts, qui ne correspondent pas à la phylogénie des espèces étudiées (Sota & Vogler, 2001). Cette incongruence est généralement liée à l'hétérogénéité de l'évolution des marqueurs moléculaires considérés. Cette hétérogénéité peut résulter, par exemple, de différences dans les vitesses d'évolution ou encore de biais de composition des bases. A cause de leur mode de transmission, l'efficacité des gènes mitochondriaux par rapport aux gènes nucléaires peut varier selon que l'on s'intéresse à des divergences récentes ou très anciennes.

En conséquence, certains auteurs recommandent, de façon systématique, d'effectuer des analyses séparées des différents gènes d'un jeu de données, lors d'une analyse phylogénétique (Miyamoto & Fitch, 1995). Cette méthode a les avantages suivants : (i) on peut avoir une idée de la répétitivité d'un clade (concept de fiabilité) ; (ii) on peut détecter des contradictions fortes entre les jeux de données (liées à une possible hétérogénéité). Les arbres obtenus par ces analyses peuvent être par la suite être présentés sous la forme d'un arbre consensus.

⁵⁵ sur des bases quasi philosophiques

Une approche plus consensuelle consiste à effectuer une analyse combinée dite « conditionnelle » (Bull *et al.*, 1993 ; De Queiroz *et al.*, 1995 ; Huelsenbeck *et al.*, 1996 ; Wiens, 1998). Cela consiste à tester l'incongruence des différents jeux de données à l'aide de tests statistiques (par exemple des tests de permutation). Si les résultats de ces tests indiquent que les partitions sont congruentes, on effectue alors une analyse des jeux de données combinées, et des analyses séparées dans le cas contraire.

1.2. Tests de permutation

L'utilisation de tests de permutation en inférence phylogénétique a été proposée par Farris *et al.* en 1994 (sous le nom de test d'« incongruence length difference » : ILD). Peu de temps après, Swofford (1995) implémente ce test dans son programme d'inférence phylogénétique PAUP* sous le nom de « partition homogeneity test ».

Le principe de ce test est le suivant (Felsenstein, 2004) : (i) on part de deux jeux de données qui ont respectivement un nombre de caractères a et b ; (ii) on distribue de façon aléatoire des caractères des deux jeux de données dans deux nouveaux jeux de données de même taille (a' et b') ce qui est fait simplement en permutant l'ordre des caractères de la matrice de données combinées ($a + b$) ; (iii) on répète cette procédure n fois, et à chaque fois on mesure les différences entre les phylogénies obtenues pour chacun des jeux de données (a' et b') ; (iv) on test les mesures de différences entre jeux de données observées et les différents réplicats (en utilisant une valeur seuil de 5 %) pour voir si l'hypothèse de congruence est rejetée ou non.

Cette procédure est applicable pour des méthodes de distances, de parcimonie, ou probabilistes (Felsenstein, 2004). En parcimonie, la mesure des différences entre les deux jeux de données est donnée par la mesure de Mickevich & Farris (1981) :

$$D_{a'b'} = L_{(a'+b')} - (L_{a'} + L_{b'})$$

avec :

{	$L_{(a'+b')}$:	longueur de l'arbre le plus parcimonieux (données combinées)
	$L_{a'} + L_{b'}$:	somme des longueurs des arbres les plus parcimonieux en analyses séparées

Pour n réplicats on compte le nombre de fois x où $D_{ab} > D_{a'b'}$

Comme $L_{(a+b)} = L_{(a'+b')}$ cela revient à compter le nombre de fois x où $L_a + L_b < L_{a'} + L_{b'}$

L'hypothèse H_0 de congruence est rejetée lorsque $(1-x) / n$ est inférieur à un seuil fixé (par exemple 0.05 si le seuil est de 5 %).

1.3. Indices de Bremer partitionnés (« partitioned Bremer support »)

Les indices de Bremer partitionnés (PBS)(Baker & DeSalle, 1997 ; Baker *et al.*, 1998 ; Lambkin *et al.*, 2002) constituent un apport méthodologique significatif en parcimonie dans le sens où ils permettent d'estimer la contribution de chaque partition au soutien des nœuds.

Comme leur nom l'indique, ils dérivent de l'indice formalisé par Bremer en 1988. L'indice de Bremer (aussi appelé « decay index ») est une mesure de la « solidité d'un nœud » en parcimonie. Il correspond au nombre de pas évolutifs qui sont nécessaires pour faire disparaître un nœud donné, donc plus il est élevé, plus le nœud considéré est solide.

Dans une analyse de données combinées, les indices de Bremer partitionnés indiquent la contribution de chaque marqueur moléculaire au soutien de chaque nœud considéré. Ces indices partitionnés peuvent prendre des valeurs positives ou négatives, et leur somme correspond à la valeur des indices de Bremer non partitionnés. Il est ainsi possible de visualiser pour chaque nœud les sources d'incongruence (qui vont correspondre à des valeurs négatives).

1.4. Analyses partitionnées

Plusieurs études récentes insistent sur l'intérêt de combiner les différents jeux de données disponibles, du moment que l'on prend en compte l'hétérogénéité des différentes partitions à l'aide de modèles adaptés (Yang & Yoder, 2003 ; Nylander *et al.*, 2004).

Le développement récent des analyses partitionnées pour les méthodes probabilistes constitue à ce titre une réponse élégante au traitement de jeux de données hétérogènes. Chaque gène (ou partition) se voit attribuer son propre modèle d'évolution (qui a ses paramètres propres), et chaque partition ainsi définie contribue au score de vraisemblance qui est calculé de façon standard, ce qui améliore sensiblement les résultats des analyses phylogénétiques (Nylander *et al.*, 2004). L'utilisation d'analyses partitionnées est donc amené à se généraliser en maximum de vraisemblance comme en inférence bayésienne.

Section II. Estimation de la robustesse des topologies

2.1. Généralités

On peut exprimer la robustesse d'une topologie par son support statistique. Ce dernier peut être estimé par différentes méthodes, comme le « bootstrap » ou l'estimation des probabilités a posteriori (en inférence bayésienne uniquement).

En parcimonie, il existe aussi des estimateurs spécifiques qui permettent d'estimer l'homoplasie d'un jeu de donnée. Ce sont les indices de cohérence (« consistency index » de Kluge & Farris, 1969), et les indices de rétention (« retention index » de Farris, 1989a, 1989b). Ces indices (qui varient entre 0 et 1) sont calculés pour chaque caractère, de façon à obtenir un indice global (plus ce nombre est proche de 1, moins il y a d'homoplasies dans le jeu de données).

L'indice de cohérence (CI) se calcule comme le rapport du nombre minimum de transformations (R) qui sont nécessaires pour expliquer tous les états de caractère, et le nombre effectif de transformations (L) dans l'arbre que l'on considère (Darlu & Tassy, 1993). Cependant, cette valeur du CI augmente avec le nombre d'autapomorphies du jeu de données, et il peut être nécessaire de calculer le CI en excluant les caractères autapomorphiques de l'analyse (Darlu & Tassy, 1993).

Le calcul de l'indice de rétention (RI) fait intervenir une troisième variable (G) qui correspond au nombre maximal de pas de l'arbre⁵⁶.

On a ainsi :

$$RI = (G - L) / (G - R)$$

Farris a également introduit un autre estimateur, l'indice de cohérence redimensionné (« rescaled consistency index » : RCI), qui correspond au produit des indices de cohérence et de rétention (Farris, 1989b).

⁵⁶ que l'on obtiendrait si on considérait que tous les changements d'état se font sur les branches terminales de l'arbre (Darlu & Tassy, 1993)

2.2. « Bootstrap » non paramétrique

Le « bootstrap » non paramétrique est une méthode statistique, proposée par Felsenstein en 1985, qui permet d'estimer de façon empirique la variabilité d'une topologie donnée, et donc sa robustesse. La méthodologie est la suivante ; à partir d'une matrice de données observées (taxons x caractères), l'on génère un nombre n de pseudo-réplicats (cad des matrices de même dimension) en suivant une procédure de rééchantillonnage. Dans chaque pseudo-réplicat on peut retrouver en plusieurs exemplaires certains caractères de la matrice originale et, a contrario, certains caractères de la matrice originale peuvent être absents (voir Fig. 2.7.). Chacun de ces pseudo-réplicats est alors analysé de façon séparée par une méthode d'inférence phylogénétique donnée (méthodes de distances, de parcimonie, ou probabilistes), et les topologies obtenues par ces analyses sont par la suite être présentées sous la forme d'un arbre consensus.

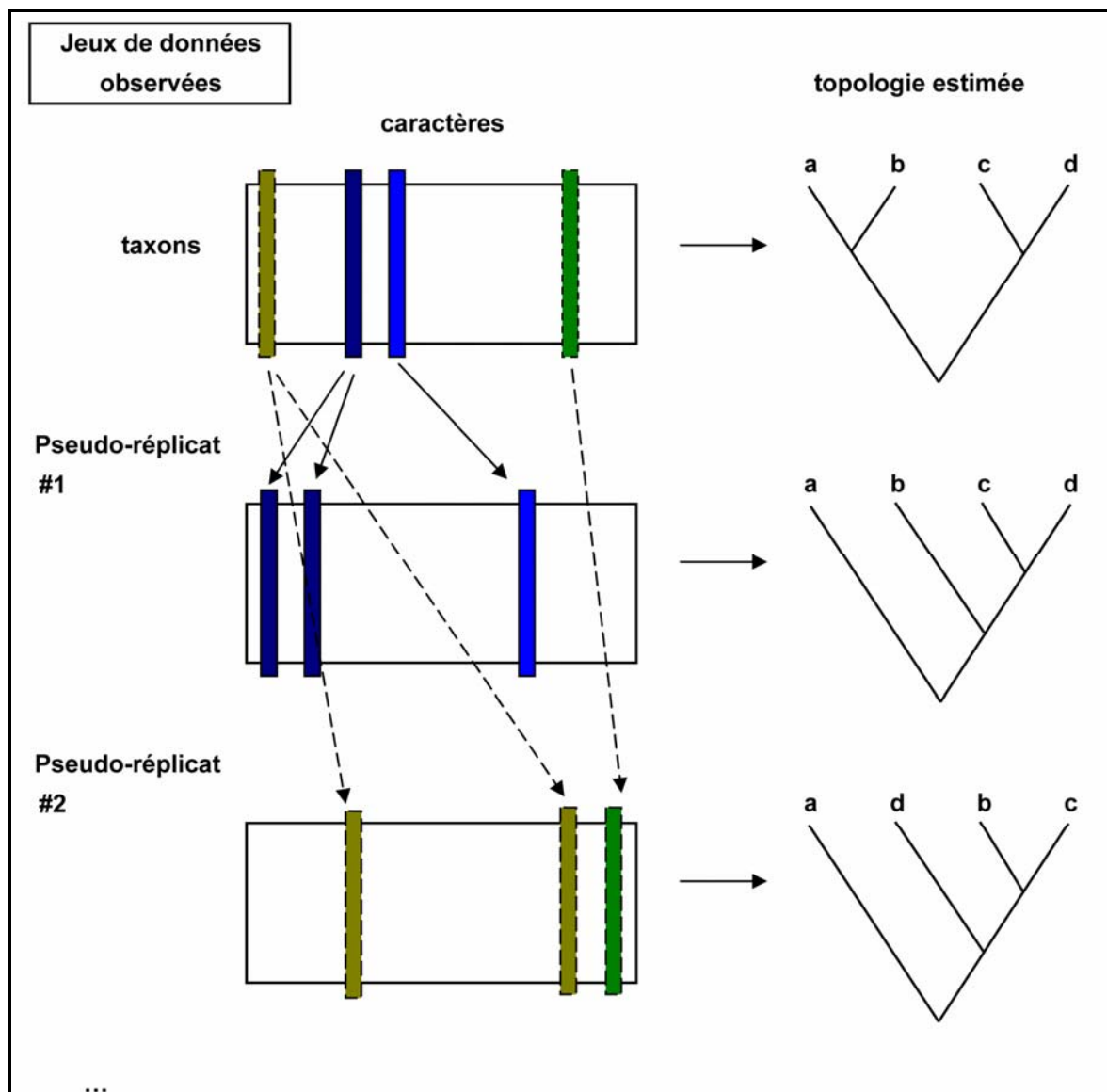


Figure 2.7. Figure illustrant la procédure de rééchantillonnage utilisé pour le « bootstrap » non paramétrique (d'après Felsenstein, 2004).

Les valeurs aux nœuds de cet arbre consensus correspondent aux valeurs de « bootstrap ». Des valeurs de bootstrap élevées (cad supérieures à 95 %), constituent une indication quant au degré de confiance que l'on peut avoir dans un clade donné (Whelan *et al.*, 2001). Certains auteurs considèrent même que des valeurs de « bootstrap » supérieures à 70 % indiquent déjà un support statistique élevé (Zharkikh & Li, 1992 ; Hillis & Bull, 1993).

2.3. « Bootstrap » paramétrique

Le « bootstrap » paramétrique est une variante du « bootstrap » non paramétrique, dont l'utilisation en inférence phylogénétique a été proposée par Felsenstein en 1988. Cette méthode utilise comme point de départ une topologie donnée, qui correspond généralement à une topologie qui résulte de l'analyse du jeu de observées. Cependant, on peut également spécifier a priori une topologie donnée, afin de discuter par exemple du soutien de certains nœuds. Puis, à partir de cette topologie, et en utilisant un modèle d'évolution donné, on simule un nombre n de pseudo-réplicats de même dimension (voir Fig. 2.8.). Comme pour le « bootstrap » non paramétrique, chacun de ces pseudo-réplicats va être analysé de façon séparée, et les topologies obtenues par ces analyses sont par la suite être présentés sous la forme d'un arbre consensus. Le « bootstrap » paramétrique apparaît donc comme une alternative intéressante au « bootstrap » non paramétrique ; cependant, il est extrêmement sensible au choix du modèle d'évolution qui va servir à générer les différents jeux de données simulées (Felsenstein, 2004).

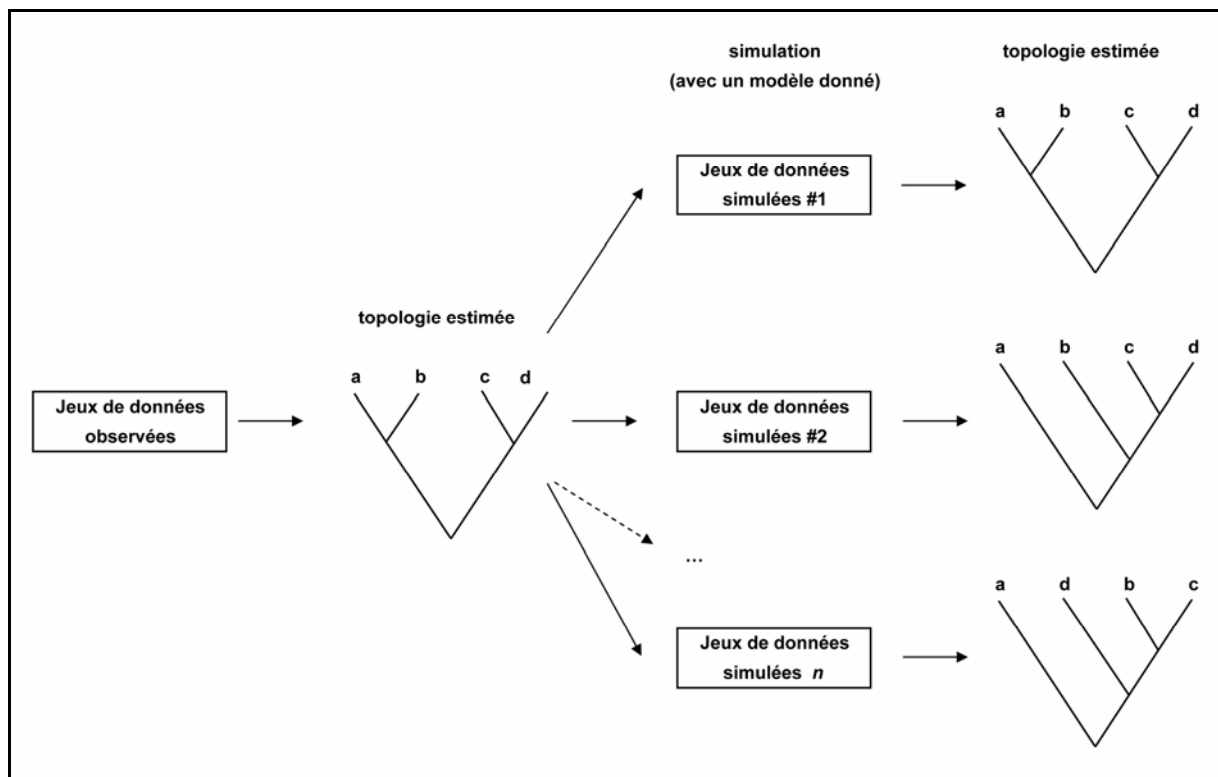


Figure 2.8. Figure illustrant la procédure de rééchantillonnage utilisé pour le « bootstrap » paramétrique (d'après Felsenstein, 2004).

2.4. Probabilités a posteriori

Les résultats d'une analyse en inférence bayésienne sont généralement présentés sous la forme d'un arbre de consensus majoritaire où les valeurs au niveau des nœuds correspondent à la probabilité a posteriori que le clade est valide. Cette singularité de l'inférence bayésienne explique en partie son attrait, car l'on obtient après une analyse une topologie et l'estimation statistique de sa robustesse (Holder & Lewis, 2003). Par ailleurs, l'interprétation de ces valeurs sur un plan statistique est claire, car elles représentent la probabilité qu'un clade donné est valide, en considérant un modèle donné, les a priori éventuels⁵⁷ et les données observées.

Les relations entre les valeurs de « bootstrap » non paramétriques et les probabilités à posteriori obtenues en inférence bayésienne font l'objet d'un important débat actuellement (Suzuki *et al.*, 2002 ; Wilcox *et al.*, 2002 ; Cummings *et al.*, 2003 ; Douady *et al.*, 2003 ; Erixon *et al.*, 2003). Ces deux valeurs ne sont que difficilement comparables car elles sont calculées très différemment. En effet, les valeurs de « bootstrap » non paramétriques donnent une estimation de la robustesse d'une topologie à partir du rééchantillonnage des données observées, alors que l'inférence bayésienne utilise les données observées et un modèle d'évolution donné⁵⁸ (Huelsenbeck *et al.*, 2002).

On remarque que les valeurs des probabilités a posteriori sont généralement plus élevées que les valeurs correspondantes de « bootstrap » (Huelsenbeck *et al.*, 2002 ; Suzuki *et al.*, 2002 ; Erixon *et al.*, 2003). Selon certains auteurs cela s'explique par le fait que les valeurs de bootstrap sont trop « conservatives » et qu'elles ne reflètent pas la réalité (Murphy *et al.*, 2001). A contrario, d'autres auteurs pensent que les valeurs des probabilités a posteriori sont surestimées (Suzuki *et al.*, 2002 ; Cummings *et al.*, 2003).

Une solution consensuelle a été proposée par Douady *et al.* (2003) et utilisée par Delsuc *et al.* (2003) : elle consiste à effectuer des « bootstrap » non paramétriques pour les analyses effectuées en inférence bayésienne. Les résultats de leurs travaux indiquent que les valeurs de ces « bootstrap » non paramétriques obtenues en inférence bayésienne présentent de plus fortes corrélations avec des « bootstrap » non paramétriques obtenues avec d'autres méthodes d'analyses (maximum de vraisemblance par exemple). Toutefois, de telles analyses mettent en jeu des temps de calcul très importants qui peuvent en limiter l'emploi.

⁵⁷ la plupart des travaux publiés qui ont utilisés l'inférence bayésienne n'utilisent pas d'a priori.

⁵⁸ ce qui se rapproche plus d'une procédure de « bootstrap » paramétrique

Section III : Article.

« Le genre *Bruchidius* (Coleoptera: Bruchidae) est-il monophylétique? Apports des méthodes de parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne »

Kergoat, G.J. & Silvain, J.-F. 2004. *Biosystema* 22:113-125.

Cette article pose la question de la monophylie du genre *Bruchidius* et il s'inscrit dans une démarche méthodologique raisonnée qui se veut exhaustive et répétable.

Dans un premier temps, on s'intéresse à la définition du genre *Bruchidius*, à travers une mise en perspective historique de sa création sur des bases qui seront discutées. Cette étape préalable permet de définir plus précisément un échantillon taxonomique représentatif (de près de 70 espèces) qui sera étudié par l'analyse des séquences de quatre marqueurs moléculaires (trois mitochondriaux et un nucléaire). L'examen préliminaire de ces marqueurs met en avant de nombreuses contraintes et spécificités propres aux gènes étudiés qui peuvent être intégrées ou non dans des analyses phylogénétiques.

Les apports et les limites des méthodes de parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne sont enfin discutés au regard des hypothèses phylogénétiques obtenues, afin de répondre au questionnement initial, sans omettre un nécessaire retour à la morphologie.

**LE GENRE *BRUCHIDIUS* (COLEOPTERA : BRUCHIDAE)
EST-IL MONOPHYLÉTIQUE ?
APPORTS DES MÉTHODES DE PARCIMONIE,
MAXIMUM DE VRAISEMBLANCE ET INFÉRENCE BAYÉSIENNE**

Gaël J. KERGOAT ^{(1), (2)} et Jean-François SILVAIN ⁽¹⁾

1. IRD, UR R072 c/o CNRS, UPR 9034, Laboratoire PGE,
avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

2. Antenne IRD, Muséum National d'Histoire Naturelle,
Département Systématique et Evolution, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France

kergoat@pge.cnrs-gif.fr

silvain@pge.cnrs-gif.fr

Abstract. — In recent years, the simultaneous use of multiple markers in phylogenetic studies has aroused considerable interest, and it raises the question of the treatment of such data sets (Kluge, 1989; Huelsenbeck *et al.*, 1996; Cunningham, 1997). The present work addresses the question of the monophyly of the large genus *Bruchidius* SCHILSKY (Coleoptera : Bruchidae) and gives us the opportunity to work on a combined molecular data set. Focus was first set on Bruchidae taxonomy in order to define a representative sampling in agreement with the International Code of Zoological Nomenclature. Then, molecular sequence data from four genes were used to investigate the relationships among 65 species of Bruchidae. Combined data sets were analyzed with different methods (Bayesian inference, maximum likelihood and parsimony) and results were discussed and compared with morphological evidences. Both analyses indicated that the genus *Bruchidius* does not form a monophyletic group.

Keywords. — Bayesian analysis ; Bruchidae ; *Bruchidius* ; combined data ; maximum likelihood ; model selection ; parsimony ; partitioned analysis ; partitioned Bremer support ; phylogenetics ; taxonomy

INTRODUCTION

Les représentants de la famille des Bruchidae sont surtout connus par leur dénomination anglo-saxonne de *seed-beetle*. En effet, les larves de ces insectes sont séminivores et se développent principalement dans des graines de Fabaceae (JOHNSON, 1981). Au regard

des 135 000 espèces de Coléoptères phytophages décrites à ce jour (LAWRENCE, 1982), le nombre d'espèces connues de Bruchidae peut sembler marginal, avec des estimations qui varient entre 1 300 espèces (BOROWIEC, 1987) et près de 3 500 espèces (JOLIVET *et al.*, 1988). Néanmoins, cette famille est importante sur un plan économique, car elle compte plusieurs espèces qui causent d'importants dégâts aux denrées stockées (BOROWIEC, 1987 ; DELOBEL & TRAN, 1993). Certains de ces ravageurs ont une large aire de répartition suite à des introductions involontaires liées au transport des graines qu'elles infestent. Cette étude s'intéresse au genre *Bruchidius* qui est l'un de ceux qui comprennent le plus grand nombre d'espèces (près de 300 espèces décrites à ce jour). Il est restreint à l'Ancien Monde, mais quelques espèces ont été accidentellement introduites dans le Nouveau Monde. La question de savoir si ce genre correspond à un groupe monophylétique se pose et implique un travail préalable sur la taxonomie des Bruchidae et sur le genre *Bruchidius* en particulier. Il est en effet crucial de pouvoir nommer correctement les taxons que l'on étudie, à plus forte raison quand on cherche à discuter de la validité d'un clade. Il faut également prendre en compte la dimension historique de la systématique de la famille afin de définir précisément l'échantillon qui servira aux analyses phylogénétiques. Jusqu'au milieu du XIX^e siècle, les bruches sont classées dans la famille des Curculionidae et

presque toutes les espèces sont décrites dans le genre *Bruchus*. En 1843, les bruches sont séparées dans une famille distincte par M. SPINOLA, et en 1845, J.T. LACORDAIRE les rattache à l'ensemble des Chrysomeloidea. En 1905, les travaux de J. SCHILSKY sur les Bruchidae européens conduisent à la division du genre *Bruchus* en trois genres : *Acanthoscelides*, *Bruchus* et *Bruchidius*. Ces trois genres sont classés dans la sous-famille des Bruchinae LATREILLE, 1802 et, au sein de cette sous-famille, le genre *Bruchidius* est rattaché à la tribu des *Acanthoscelidini* BRIDWELL, 1946. La systématique de ce genre est peu claire pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la définition même du genre *Bruchidius* n'est pas simple car ce genre rassemble un nombre important d'espèces morphologiquement hétérogènes. Ce genre est défini par rapport à des combinaisons d'états de caractères (BOROWIEC, 1987) qui varient sensiblement d'une espèce à une autre (longueur et dimorphisme sexuel des antennes par exemple). En conséquence, il est impossible de présenter une diagnose unique pour toutes les espèces du genre. En supposant que toutes les espèces décrites initialement comme des *Bruchidius* formaient un groupe monophylétique, il se pose aussi le problème suivant : depuis 1905, différentes études ont exclu des représentants du genre *Bruchidius* pour les regrouper dans de nouveaux genres, fondés sur des caractères morphologiques et biologiques (BOROWIEC, 1987). C'est ainsi le cas des espèces qui appartiennent désormais aux genres *Conicobruchus* DECELLE, *Decellebruchus* BOROWIEC, *Kingsolverius* BOROWIEC, *Megabruchidius* BOROWIEC, *Salviabruchus* DECELLE, *Sulcobruchus* CHÛJÔ et *Tuberculobruchus* DECELLE. Si le genre *Bruchidius* était monophylétique à l'origine, l'exclusion d'un certain nombre de ces représentants dans de nouveaux genres a eu pour conséquence d'en faire un groupe paraphylétique. Par ailleurs, la validité de deux de ces nouveaux genres a été remise en question par L. BOROWIEC en 1987. Selon lui, les travaux sur le genre *Tuberculobruchus* sont incomplets, car ce genre n'intègre pas d'autres espèces (nommées pourtant par J. DECELLE) qui présentent les mêmes combinaisons d'états de caractères. Il juge également non satisfaisante la définition du genre

Sulcobruchus, ce qui sera confirmé lors d'une révision ultérieure du genre (ANTON, 1999). En sus de ces problèmes, de nombreuses espèces du genre *Bruchidius* ont été nommées, mais non décrites, et il existe de nombreuses synonymies (DELOBEL, com. pers.). Enfin, des espèces décrites dans le genre *Bruchus* ne présentent aucun des caractères-clés de ce genre et devraient, selon certains auteurs, être placées dans le genre *Bruchidius*, ce qui n'a pas été fait jusqu'à présent. Tous ces éléments génèrent une certaine confusion au niveau de la taxonomie du genre *Bruchidius* et des genres apparentés. Cela impose donc une grande rigueur lors de la définition de l'échantillon (en particulier au moment de nommer les taxons étudiés) qui servira aux analyses phylogénétiques, afin d'éviter des erreurs d'interprétations. Même si la systématique des Bruchidae a connu dans les dernières décennies des avancées importantes, grâce aux contributions de nombreux auteurs (voir les travaux de ANTON, BOROWIEC, DECELLE, DELOBEL, JOHNSON et KINGSOLVER), il n'existe aucune phylogénie basée sur des caractères morphologiques ou moléculaires pour un échantillon représentatif de la diversité de la famille. Aussi, cette étude constitue une avancée significative, car elle porte sur un nombre important de Bruchidae et les hypothèses phylogénétiques obtenues doivent permettre de clarifier la systématique de la famille et du genre *Bruchidius* en particulier. Les analyses vont porter sur les données de séquences de quatre marqueurs moléculaires : le gène spécifiant la petite sous-unité de l'ARN ribosomique mitochondrial (12S), le gène codant pour la protéine du cytochrome *b* (Cyt *b*), le gène codant pour la protéine du cytochrome *c* oxydase 1 (CO1) et le domaine D2 de la sous-unité 28S de l'ARN ribosomique nucléaire (28S-D2). Les séquences de ces quatre marqueurs moléculaires vont être combinées dans un unique jeu de données. Cette étude va également offrir l'opportunité de discuter des apports des méthodes de parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne dans le traitement d'un jeu de données moléculaires combinées. Les résultats seront aussi discutés au vu des données morphologiques (génitalia mâles en particulier).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillon

Les différentes espèces qui constituent l'échantillon taxonomique (tableau 1) ont été identifiées principalement à partir par les génitalia mâles en combinaison avec des caractères clés de morphologie externe. La quarantaine d'espèces du genre *Bruchidius* figurant dans cette étude recouvre une grande partie des groupes d'espèces européennes (BOROWIEC, 1988) et une fraction non négligeable des espèces africaines nommées par J. DECELLE ou M. Pic. La dimension historique de la taxonomie des Bruchidae nous a amené à échantillonner cinq des sept genres dont les représentants étaient autrefois considérés comme des *Bruchidius*, ce qui nous permet de discuter du bien-fondé de la séparation de ces clades. Afin de préciser les relations phylogénétiques des six genres précités, des représentants de huit autres genres appartenant à la même tribu des Acanthoscelidini ont été également inclus, ainsi que des représentants de la tribu voisine des Bruchini appartenant au genre *Bruchus*. L'extragroupe le plus basal de notre échantillon est constitué par *Pachymerus cardo* qui appartient à la sous-famille, supposée primitive au sein des Bruchidae, des Pachymerinae.

Extraction d'ADN et *Polymerase chain reaction*

L'ADN a été extrait à partir d'individus entiers préservés dans l'éthanol. L'ADN a été extrait à l'aide du kit d'extraction Quiagen DNAeasy tissue kit (Quiagen GmbH, Allemagne). Les amplifications des séquences partielles des quatre gènes ont été effectuées par des réactions de PCR classiques en utilisant les amorces figurées dans le tableau 2. Les produits de PCR obtenus ont été purifiés à l'aide du kit de purification QUIAquick PCR purification kit. Les deux brins complémentaires d'ADN ont été séquencés avec le kit de séquençage Bigdye terminator (Applied Biosystems) et un séquenceur automatique ABI 373.

Alignement des séquences

L'alignement des séquences codants pour des protéines (Cyt *b* et CO1) n'a pas nécessité d'indels et ne présente aucune ambiguïté, en raison des contraintes liées au code génétique. Les alignements du 12S et 28S-D2 sont effectués à l'aide du programme ClustalX (THOMPSON, 1997), en utilisant les options par défaut. Certaines régions ambiguës du 12S ont été réalignées manuellement. Après alignement des séquences, on obtient un jeu de données constitué de quatre partitions et totalisant 2956 pb (indels compris). Quelques caractéristiques des quatre partitions sont données dans le tableau 3. Aucune hétérogénéité dans la composition des bases entre les taxons n'a été détectée pour les 4 marqueurs du jeu de données (12S : $\chi^2 = 34.49$, df = 192, P = 1.00; COI : $\chi^2 = 104.01$, df = 183, P = 0.99; Cyt *b* : $\chi^2 = 146.34$, df = 192, P = 0.99; 28S-D2 : $\chi^2 = 14.07$, df = 171, P = 1.00).

Analyses phylogénétiques

Les méthodes de parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne ont été utilisées pour obtenir des hypothèses phylogénétiques pour notre échantillon. Les analyses de parcimonie ont été conduites avec PAUP* v.4.0b10 (SWOFFORD, 2002), les analyses de maximum de vraisemblance avec PHYML v.2.1.b1 (GUINDON & GASCUEL, 2003) et les analyses en inférence bayésienne (voir DELSUC & DOUZERY, 2004) avec MrBayes v.3.0b4 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001). Notre jeu de données de quatre marqueurs a été combiné systématiquement dans toutes les analyses phylogénétiques. Dans toutes les analyses de parcimonie (recherche heuristique avec 10 répétitions par additions de séquences au hasard), les indels ont été systématiquement codés en 5^e base, afin de ne pas négliger une source intéressante d'information phylogénétique (GIRIBET & WHEELER, 1999). Deux types d'analyses ont été effectués en parcimonie : 1) une analyse des données non pondérées ; 2) des analyses des données pondérées *a priori* (afin de minimiser les effets des substitutions multiples). Cette pondération *a priori* correspond soit à une sous-pondération des transitions par rapport aux

Genre Espèce	Localité ^a	Genre Espèce	Localité ^a
<i>Acanthoscelides</i> Schilsky, 1905		<i>Bruchus</i> Linnaeus, 1767	
<i>obtectus</i> (Say, 1831)	Giza (Eg.)	<i>affinis</i> Frölich, 1799	Haute Corse (Fr.)
<i>Algarobius</i> Bridwell, 1946		<i>atomarius</i> (Linnaeus, 1761)	Vaucluse (Fr.)
<i>prosopis</i> (LeConte, 1858)	El Tur (Eg.)	<i>loti</i> Paykull, 1800	Oise (Fr.)
<i>Bruchidius</i> Schilsky, 1905		<i>occidentalis</i> Luk.&Ter. ^c , 1957	Corse (Fr.)
<i>auratopubens</i> Decelle, in litt.	Fleuve (Sé.)	<i>rubicundus</i> (Fahraeus, 1839).	Taveta (Ke.)
<i>aurivillii</i> (Blanc, 1889)	Fleuve (Sé.)	<i>Callosobruchus</i> Pic, 1902	
<i>bernardi</i> Del.&Ant. ^b , 2004	Basilicata (It.)	<i>chinensis</i> (Linnaeus, 1758)	Giza (Eg.)
<i>biguttatus</i> (Olivier, 1795)	Gard (Fr.)	<i>maculatus</i> (Fabricius, 1775)	Hô Chi Minh-Ville (Vi.)
<i>bimaculatus</i> (Olivier, 1795)	Haute Corse (Fr.)	<i>phaseoli</i> (Gyllenhal, 1833)	Bahariya (Eg.)
<i>cadei</i> Decelle, in litt.	Thies (Sé.)	<i>subinnotatus</i> (Pic, 1914)	Cap Vert (Sé.)
<i>campylacanthae</i> Decelle, in litt.	Thies (Sé.)	<i>Conicobruchus</i> Decelle, 1951	
<i>caninus</i> (Kraatz, 1869)	Haute Corse (Fr.)	<i>strangulatus</i> (Fahraeus, 1839)	Cap Vert (Sé.)
<i>chloroticus</i> (Dalm., 1833)	Fatick (Sé.)	<i>Decellebruchus</i> Borowiec, 1987	
<i>centromaculatus</i> (Allard, 1868)	Fleuve (Sé.)	<i>atrolineatus</i> (Pic, 1921)	Cap Vert (Sé.)
<i>dialii</i> Decelle, 1973	Ziguinchor (Sé.)	<i>Gibbobruchus</i> Pic, 1913	
<i>dichrostachydis</i> Del.&Ant. ^c , 2003	Thies (Sé.)	sp.	Guyane Française (Fr.)
<i>dispar</i> (Gyllenhal, 1833)	Rhône (Fr.)	<i>Kingsolverius</i> Borowiec, 1987	
<i>elnaiensis</i> (Pic, 1931)	Kabarnet (Ke.)	<i>gibbicollis</i> Borowiec, 1987	Hô Chi Minh-Ville (Vi.)
<i>fulvicornis</i> (Motschulsky, 1874)	Corse du Sud (Fr.)	<i>Megabruchidius</i> Borowiec, 1984	
<i>holosericeus</i> (Schönherr, 1832)	Kfar Selouane (Li.)	<i>tonkineus</i> (Pic, 1904)	Hô Chi Minh-Ville (Vi.)
<i>incarnatus</i> (Boheman, 1833)	Bahariya (Eg.)	<i>Pachymerus</i> Thunberg, 1805	
<i>lineatopygus</i> (Pic, 1924)	Louga (Sé.)	<i>cardo</i> (Fahraeus, 1839)	Guyane Française (Fr.)
<i>lividimanus</i> (Gyllenhal, 1833)	Rhône (Fr.)	<i>Paleoacanthoscelides</i> Borowiec, 1985	
<i>marginalis</i> (Fabricius, 1776)	Gard (Fr.)	<i>gilvus</i> (Gyllenhal, 1839)	Vaucluse (Fr.)
<i>namus</i> (Germar, 1824)	Basilicata (It.)	<i>Penthobruchus</i> Kingsolver, 1973	
<i>niokolobaensis</i> (Decelle, 1969)	Thies (Sé.)	<i>germaini</i> (Pic, 1894)	Thies (Sé.)
<i>pauper</i> (Boheman, 1829)	Corse du Sud (Fr.)	<i>Pseudopachymerina</i> Zacher, 1952	
<i>picipes</i> (Germar, 1824)	Corse (Fr.)	<i>spinipes</i> (Erichson, 1834)	Bahariya (Eg.)
<i>poecilus</i> (Germar, 1824)	Basilicata (It.)	<i>Tuberculobruchus</i> Decelle, 1951	
<i>pusillus</i> (Germar, 1824)	Gard (Fr.)	<i>albizziarum</i> (Decelle, 1958)	Cap Vert (Sé.)
<i>pygidiopictus</i> Decelle, in litt.	Thies (Sé.)	<i>babaulti</i> (Pic, 1921)	Thitani (Ke.)
<i>pygmaeus</i> (Boheman, 1833)	Gard (Fr.)	<i>natalensis</i> (Pic, 1903)	Thies (Sé.)
<i>quadrisignatus</i> (Fahraeus, 1871)	Mwingi (Ke.)	<i>silaceus</i> (Fahraeus, 1839)	Fatick (Sé.)
<i>raddiana</i> Anton&Delobel, 2003	Fleuve (Sé.)	<i>sinaitus</i> (K. Daniel, 1907)	Fleuve (Sé.)
<i>seminarius</i> (Linnaeus, 1767)	Vaucluse (Fr.)	<i>subuniformis</i> (Pic, 1928)	Oltepesi (Ke.)
<i>sericatus</i> (Germar, 1824)	Corse du Sud (Fr.)		
<i>submaculatus</i> (Fahraeus, 1839)	Diourbel (Sé.)		
<i>trifolii</i> (Motschulsky, 1874)	Bahariya (Eg.)		
<i>uberatus</i> (Fahraeus, 1895)	Fleuve (Sé.)		
<i>unicolor</i> (Olivier, 1795)	Vaucluse (Fr.)		
<i>varipictus</i> (Motschulsky, 1874)	Haute Corse (Fr.)		
<i>varius</i> (Olivier, 1795)	Corse du Sud (Fr.)		
<i>villosus</i> (Fabricius, 1792)	Vaucluse (Fr.)		

a. Égypte (Eg.) France (Fr.), Italie (It.), Kenya (Ke.), Liban (Li.), Sénégal (Sé.), Vietnam (Vi.).

b. Delobel & Anton.

c. Lukjanovitch & Ter-Minassian.

Tableau 1. Spécimens étudiés.

Gène	Amorce	Séquence (5' _ 3')
12S	SR-J-14233 ^a	AAGAGCGACGGGCGATGTGT
	SR-N-14588 ^a	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT
COI	C1-J-1751 ^a	GGATCACCTGATATAGCATTCCC
	C1-N-2191 ^a	CCCGGTAAAATTAATAATAAACTTC
	TONYA ^b	GAAGTTTATATTTTAATTTTACCGGG
	HOBBS ^b	AAATGTTGNGGRAAAAATGTTA
	CP1	GATGATGAAATTTTGGATC
Cyt <i>b</i>	CB-J-10933 ^a	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC
	CB-N-11367 ^a	ATTACACCTCCTAATTATTAGGAAT
28S-D2	28S01	GACTACCCCTGAATTTAAGCAT
	28SR01	GACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG

Tableau 2.
Séquences des amorces utilisées.

a. Simon *et al.*, 1994.

b. Monteiro & Pierce, 2001.

transversions ou à une sous-pondération de la troisième position des codons par rapport aux deux autres. Pour toutes ces analyses de parcimonie, l'estimation de la robustesse des topologies est donnée par une procédure de rééchantillonnage (*bootstrap* non paramétrique) de 100 réplicats avec 10 répétitions par additions de séquences au hasard. Les indices de Bremer partitionnés (*partitioned Bremer support* : BAKER & DESALLE, 1997 ; BAKER *et al.*, 1998) ont été estimés (pour l'analyse en parcimonie des données non pondérées uniquement) à l'aide du programme TreeRot (SORENSEN, 1999), afin d'estimer la contribution de chaque partition au soutien des nœuds. Ce calcul permet aussi de discuter de l'incongruence éventuelle de nos partitions. Pour les méthodes probabilistes (maximum de vraisemblance et inférence bayésienne), le modèle d'évolution de séquence le plus approprié a été sélectionné à l'aide du programme Modeltest 3.06 (POSADA & CRANDALL, 1998) qui utilise des tests hiérarchiques des ratios de scores de vraisemblance (*likelihood ratio tests*). En maximum de vraisemblance, l'option de recherche heuristique a été utilisée pour l'ensemble du jeu de données combiné en laissant l'estimation des paramètres du modèle au programme PHYML. Une telle analyse prend moins d'une heure

(sur un AMD Barton 3Ghz) avec ce programme, mais elle n'est pas envisageable avec d'autres programmes (tel PAUP*) de maximum de vraisemblance du fait de la taille assez importante de l'échantillon. Pour les analyses bayésiennes, deux types d'analyses ont été effectuées (chacune avec deux millions de générations et quatre chaînes chaudes). La première analyse n'utilise qu'un seul modèle d'évolution de séquences pour l'ensemble du jeu de données combinées, à l'instar de l'analyse en maximum de vraisemblance (les paramètres du modèle étant aussi estimés par MrBayes). La seconde analyse est une analyse partitionnée qui associe à chaque gène (partition) un modèle d'évolution de séquence donné qui a ses propres paramètres (pour chaque partition le modèle d'évolution de séquence a été déterminé grâce à Modeltest). Pour ces deux analyses, le temps de calcul est assez raisonnable (inférieur à 48 heures). Une période de *burnin* correspondant aux 40 000 premières générations a été déterminée graphiquement. Les résultats des analyses bayésiennes sont donnés sous la forme d'un arbre de consensus majoritaire à 50 % (qui n'intègre pas les topologies correspondant à la période de *burnin*), où le soutien des nœuds de l'arbre correspond à la probabilité *a posteriori* des clades.

Gene	A%	C%	G%	T%	Long. totale	Sites variables	Sites informatifs	Distance moy. / max. non corrigée (%)	
12S	40.20	13.94	9.02	36.83	410	194	152	10.06 ± 2.89	20.90
COI	29.25	16.78	16.34	37.62	1018	444	388	14.45 ± 2.03	21.19
Cyt <i>b</i>	30.14	17.73	13.67	38.44	782	403	321	15.53 ± 2.35	23.51
28S-D2	20.65	32.60	26.55	20.18	743	143	85	2.50 ± 0.97	5.96

Tableau 3. Caractéristiques des fragments de 12S, COI, Cyt *b* et 28S-D2.

RÉSULTATS

Hétérogénéité des partitions

Les quatre fragments de gènes présentent des caractéristiques différentes, comme le montre le tableau 3. Un fort biais de composition des bases (A et T) est observé pour les marqueurs mitochondriaux. Les distances génétiques non corrigées indiquent aussi des différences marquées en terme de vitesse d'évolution, en particulier pour le marqueur nucléaire qui apparaît comme plus conservé. Les matrices de substitution pour chaque partition du jeu de données (non figurées), estimées lors de l'utilisation de Modeltest, sont également très divergentes et présentent une asymétrie marquée (en particulier pour les 3 marqueurs mitochondriaux).

Parcimonie

Les analyses des données combinées en parcimonie (pondérées et non pondérées) conduisent à des topologies très proches. La figure 1 correspond à l'un des 10 arbres équiparcimonieux obtenus par l'analyse des données non pondérées. Les valeurs de *bootstrap* supérieures à 50 % sont indiquées sur cette topologie ainsi que la somme des indices de Bremer partitionnés (voir le détail des indices de Bremer partitionnés dans le tableau 4). Cette topologie est dans l'ensemble faiblement soutenue par les valeurs de *bootstrap* et par les indices de Bremer, à l'exception de certains groupes terminaux. Ainsi,

la moitié seulement des nœuds considérés sont soutenus par une valeur de *bootstrap* supérieure ou égale à 50 % et 28 des 62 nœuds considérés ne sont pas soutenus par les indices de Bremer (indice de Bremer négatif ou nul). La contribution de chacun des marqueurs au soutien des différents clades est assez variable. Si l'on se réfère à la somme des indices de Bremer partitionnés pour chaque marqueur on constate que le COI et le 28S-D2 sont prépondérants. Le 12S ne contribue que faiblement au soutien des nœuds de la topologie et le Cyt *b* quant à lui apporte une contribution négative dans l'ensemble. Cela montre qu'il existe une assez forte incongruence entre le Cyt *b* et les trois autres partitions dans l'analyse en parcimonie non pondérée. Afin de préciser ce résultat, un test ILD (*incongruence length difference test*; FARRIS *et al.*, 1994) a été effectué et indique également une incongruence au sein du jeu de données combinées ($p < 0.05$).

Au vu des hypothèses phylogénétiques obtenues en parcimonie, il apparaît dans toutes les analyses que le genre *Bruchidius* n'est pas monophylétique, mais qu'il est constitué de plusieurs clades bien distincts. Cette paraphylie est soutenue par des valeurs élevées de *bootstrap* et d'indices de Bremer pour plusieurs nœuds (nœuds 3, 5, 14 et 20 en particulier). Par ailleurs la monophylie des genres *Bruchus* et *Tuberculobruchus* n'est pas soutenue par les hypothèses phylogénétiques en parcimonie.

Noeuds	Cyt <i>b</i>	COI	12S	28S-D2	Total	Noeuds	Cyt <i>b</i>	COI	12S	28S-D2	Total
1	9.44	0.97	-6.42	-2.00	2	32	-11.88	11.30	-3.42	3.00	-1
2	1.44	-2.69	1.57	-0.33	0	33	9.11	17.30	1.57	5.00	33
3	-6.88	0.64	5.24	6.00	5	34	-12.21	12.97	-4.42	3.66	0
4	-5.88	5.30	-0.99	1.57	0	35	-12.88	13.30	-1.42	5.00	4
5	-0.19	0.15	3.03	0	3	36	-2.21	-0.35	1.91	7.66	7
6	-3.21	0.80	2.57	0.83	1	37	-12.88	19.30	-0.42	6.00	12
7	-3.79	4.33	-1.76	4.21	3	38	6.61	15.80	6.07	-2.50	14
8	19.61	23.47	12.41	-0.50	55	39	-14.88	25.30	-2.42	3.00	11
9	7.11	4.30	-2.42	5.00	14	40	2.82	-5.40	2.43	-0.85	-1
10	2.11	1.30	-7.42	6.00	2	41	6.61	-8.19	3.07	-2.50	-1
11	-0.16	0.10	0.05	0	0	42	1.61	4.30	-6.92	3.00	2
12	10.28	14.72	4.99	8.00	38	43	-5.07	6.82	1.54	4.70	8
13	1.44	-2.69	1.57	-0.33	0	44	-5.88	1.30	0.57	3.00	-1
14	-8.88	9.30	4.07	6.50	11	45	-19.38	19.80	10.57	7.00	18
15	10.11	3.30	-9.42	-3.00	1	46	2.44	-5.02	2.24	-0.66	-1
16	-11.88	11.30	-3.42	3.00	-1	47	-6.08	5.47	-4.22	4.83	0
17	-5.46	6.72	-6.31	5.05	0	48	-6.88	0.64	-1.75	6.00	-2
18	-6.88	1.30	-3.42	6.00	-3	49	-11.88	11.30	-3.42	3.00	-1
19	8.11	-6.69	6.57	1.00	9	50	-6.88	0.64	-1.75	6.00	-2
20	-0.88	2.50	1.37	11.00	14	51	6.61	-10.19	12.07	-2.50	6
21	-10.21	4.30	0.57	8.33	3	52	6.61	-8.19	3.07	-2.50	-1
22	-9.88	5.30	-0.42	6.00	1	53	1.44	-2.69	1.57	-0.33	0
23	9.11	4.30	0.57	-2.00	12	54	8.11	-7.69	-4.42	4.00	0
24	15.11	1.30	1.57	0	18	55	8.11	-7.69	-4.42	4.00	0
25	-0.05	-0.02	0.07	0	0	56	-1.38	11.80	-4.42	-2.00	4
26	-5.88	2.30	-0.42	3.00	-1	57	1.11	17.64	1.24	9.00	29
27	6.61	-8.19	3.07	-2.50	-1	58	6.61	-7.19	3.57	-2.00	1
28	-6.88	0.64	-2.75	6.00	-3	59	10.02	-6.60	6.57	0	10
29	8.11	-7.69	-4.42	4.00	0	60	-5.88	1.30	0.57	3.00	-1
30	-7.38	25.80	-4.92	1.50	15	61	-6.55	2.97	0.91	2.66	0
31	-5.88	14.50	-2.82	3.20	9	62	-9.88	6.80	1.57	3.50	2
Total ^{a,b} :							-66.52	257.82	9.65	166.7	367.65

a. somme des indices positifs Cyt *b* : 186.41 (22.06 %) COI: 354.99 (42.01 %) 12S : 110.40 (13.06 %) 28S-D2 : 193.20 (22.86 %)

b. somme des indices négatifs Cyt *b* : -252.93 (52.98 %) COI: -97.17 (20.35 %) 12S : -100.75 (21.10 %) 28S-D2 : -26.50 (5.55 %)

Tableau 4. Indices de Bremer partitionnés pour les 4 partitions du jeu de données.

Maximum de vraisemblance – inférence bayésienne

Le modèle retenu pour l'analyse du jeu de données combinées est le modèle *general time reversible* incluant une proportion de sites invariables et une distribution suivant une loi gamma des variations de vitesses d'évolution entre les sites nucléotidiques (GTR + I + Γ : LANAVE *et al.*, 1984; YANG, 1994; Gu *et al.*, 1995). Ce modèle a également été sélectionné pour les quatre partitions de l'analyse partitionnée. Les résultats des analyses phylogénétiques en maximum de vraisemblance et inférence bayésienne infirment également la monophylie des genres *Bruchidius*, *Bruchus* et *Tuberculobrachus*. Les deux topologies obtenues en inférence bayésienne sont assez proches et elles retrouvent de façon intéressante des groupes d'espèces présents dans toutes les analyses de parcimonie (nœuds 14, 21, 46 et 51 de la fig. 1). Par contre, la topologie résultant de l'ana-

tionnée pour les quatre partitions de l'analyse partitionnée. Les résultats des analyses phylogénétiques en maximum de vraisemblance et inférence bayésienne infirment également la monophylie des genres *Bruchidius*, *Bruchus* et *Tuberculobrachus*. Les deux topologies obtenues en inférence bayésienne sont assez proches et elles retrouvent de façon intéressante des groupes d'espèces présents dans toutes les analyses de parcimonie (nœuds 14, 21, 46 et 51 de la fig. 1). Par contre, la topologie résultant de l'ana-

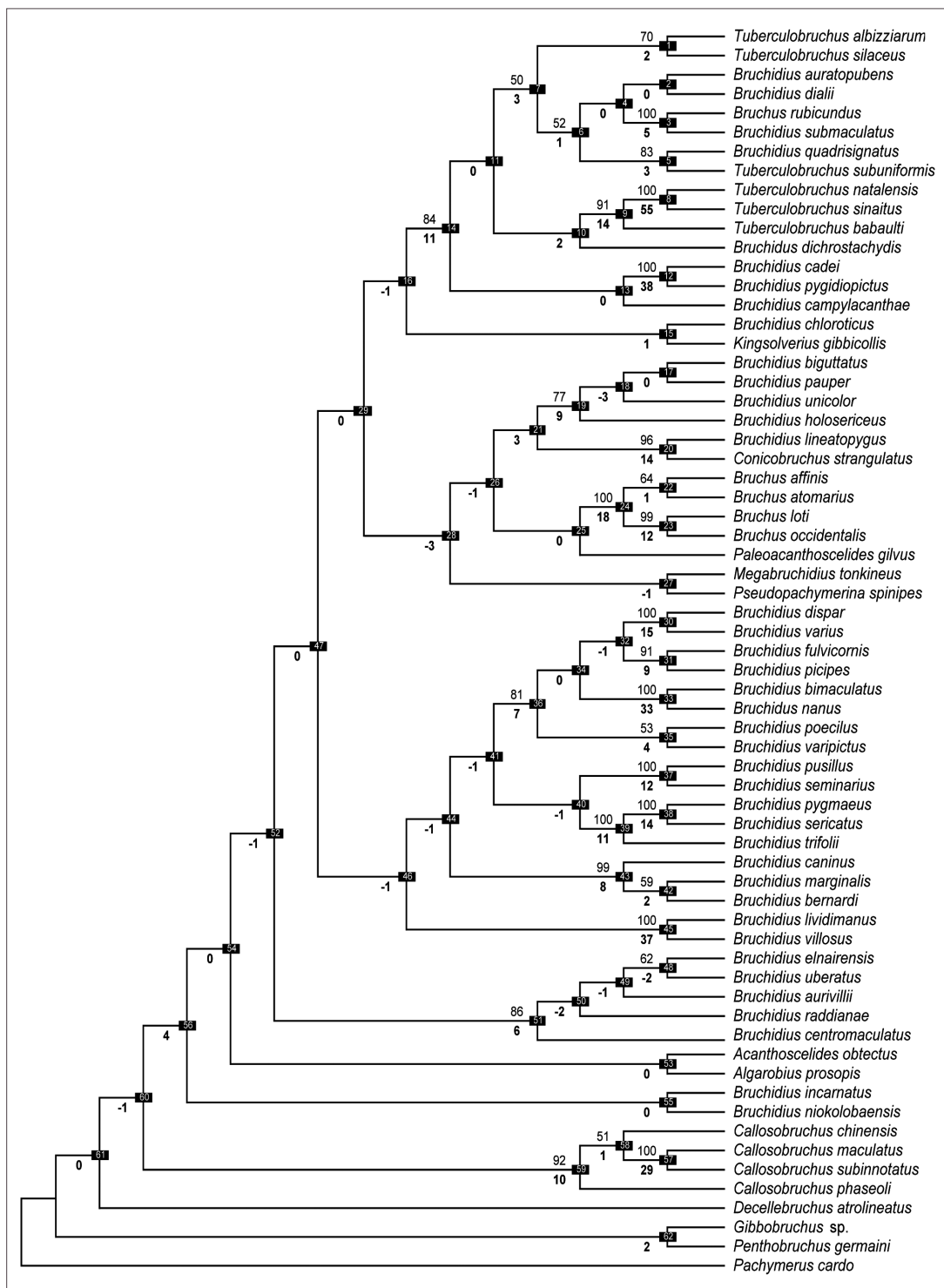


Figure 1.

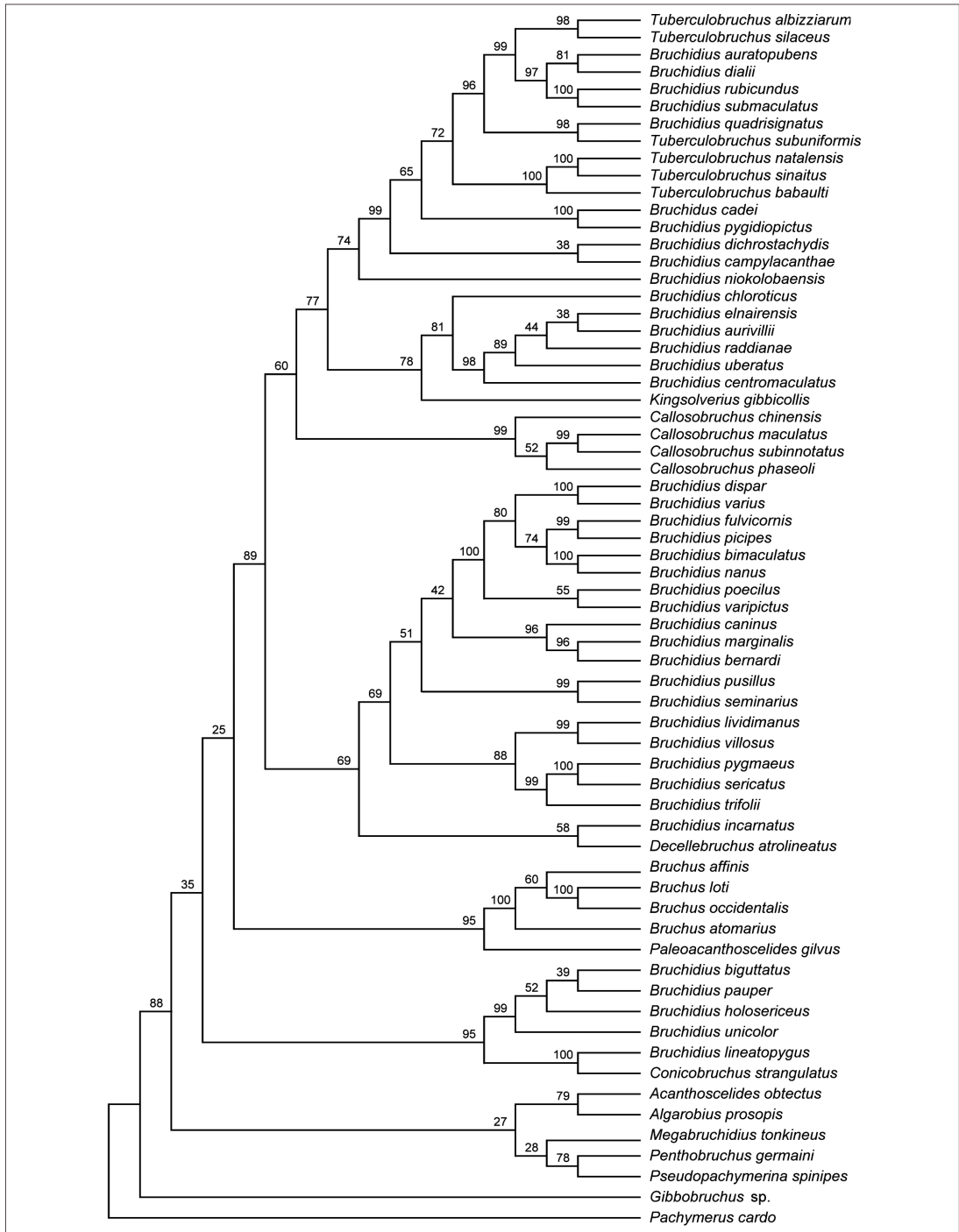


Figure 2.

lyse de maximum de vraisemblance (non figurée) est assez différente des topologies obtenues en parcimonie et en inférence bayésienne et elle ne retrouve pas de nombreux clades bien soutenus en inférence bayésienne et parcimonie. L'arbre de consensus majoritaire à 50 % résultant de l'analyse partitionnée en inférence bayésienne est figuré (fig. 2). Cette topologie est fortement soutenue et 56 des 62 nœuds considérés présentent une probabilité *a posteriori* supérieure à 50 %. Par ailleurs, cette dernière analyse est celle qui a la plus grande vraisemblance, avec un score moyen de – 38 250, à comparer au score moyen de – 38 830 obtenu par l'analyse en inférence bayésienne non partitionnée et au score de – 39 295 obtenu en maximum de vraisemblance.

DISCUSSION

Taxonomie

Les genres *Bruchidius*, *Bruchus* et *Tuberculobruchus* apparaissent comme paraphylétiques dans toutes les reconstructions phylogénétiques réalisées. Ce résultat est *a priori* surprenant pour le genre *Bruchus* car il constitue un ensemble homogène défini et soutenu par de nombreuses synapomorphies (forme de la dent pronotale ou du tibia 2 des mâles par exemple). L'espèce à l'origine de cette paraphylie (dans les topologies obtenues) est *Bruchus rubicundus*. Cette espèce a été de toute évidence placée à tort dans ce genre, car elle ne présente aucun des caractères clés du genre *Bruchus*. Ce cas n'est certainement pas isolé et souligne la nécessité d'une révision des espèces du genre *Bruchus*. La morphologie externe, et les génitalia mâles, de *Bruchus rubicundus* sont semblables à celles des espèces du genre *Tuberculobruchus* et de 8 espèces du genre *Bruchidius* (*B. auratopubens*, *B. cadei*, *B. campylacanthae*, *B. dialii*, *B. dichrostachys*, *B. pygidiopictus*, *B. quadrisignatus* et *B. submaculatus*). Toutes ces espèces africaines forment un groupe homogène sur le plan de la morphologie externe (coloration, tubercules basaux sur les élytres, forme allongée) et des génitalia mâles en particulier (lobe médian court, virga arrondie, pas de sclérites ou spicules marquées). Ce regroupement d'espèces est par ailleurs bien

soutenu dans toutes les analyses phylogénétiques (*bootstrap* de 84 % et indice de Bremer de 11 en parcimonie – nœud 14, figure 1 ; probabilité *a posteriori* de 96 % en inférence bayésienne). Le statut du genre *Tuberculobruchus* peut être discuté à la lumière de ces résultats. Les résultats des analyses phylogénétiques donnent raison à L. BOROWIEC qui juge incomplets les travaux sur le genre *Tuberculobruchus*. Une révision de ce genre, qui est paraphylétique en l'état, permettrait de clarifier la systématique de l'ensemble des espèces (à savoir *Bruchus rubicundus* et les 8 espèces de *Bruchidius*) qui présentent les caractères morphologiques cités plus haut. Il serait alors envisageable d'intégrer toutes ces espèces au sein d'un genre *Tuberculobruchus* redéfini (par rapport à de nouvelles combinaisons d'états de caractères) correspondant à un groupe monophylétique. Cependant, même si le genre *Tuberculobruchus* était ainsi redéfini, le genre *Bruchidius* serait toujours paraphylétique car la position de plusieurs Bruchidae de genres différents le divise en plusieurs groupes distincts. On peut distinguer en particulier trois ensembles l'on retrouve dans la quasi totalité des analyses. Le premier correspond à un groupe d'espèces africaines (*B. aurivillii*, *B. centromaculatus*, *B. elnairensis*, *B. raddianae* et *B. uberatus* – nœud 51, fig. 1) morphologiquement homogène surtout au niveau des génitalia mâles (lobes médians allongés, virga pointue, sclérites et spicules marquées). Toutes ces espèces appartiennent au groupe d'espèces *centromaculatus* (ANTON & DELOBEL, 2003) à l'exception de *B. uberatus*. Les représentants des deux autres groupes (nœuds 21 et 46 de la fig. 1) sont majoritairement européens. Les regroupements des espèces européennes observés dans les arbres phylogénétiques correspondent dans l'ensemble aux groupes d'espèces actuellement définis (BOROWIEC, 1988), même si l'on observe des différences notables qui ont été soulignées dans une étude récente (KERGOAT *et al.*, 2004). Il est difficile de discuter de la validité des genres *Conicobruchus*, *Decellebruchus*, *Kingsolverius* et *Megabruchidius* à partir de la position d'un seul de leurs représentants. Néanmoins, pour les genres *Conicobruchus* et *Kingsolverius*, l'examen des génitalia mâles est

informatif et il apparaît que les espèces de *Bruchidius* qui leur sont apparentées (respectivement *B. lineatopygus* et *B. chloroticus*) ont des génitalia très proches. Ces observations permettent de douter de la validité de leur séparation du genre *Bruchidius*. Les résultats de toutes les analyses soulignent la nécessité d'une révision majeure du genre *Bruchidius* qui impliquerait la définition de nouveaux genres correspondant à des ensembles monophylétiques (sur des bases morphologiques plus solides, génitalia mâles en particulier). À un niveau supérieur, la position des représentants de la tribu des Bruchini fait éclater la monophylie supposée de la tribu des Acanthoscelidini. Ce constat est soutenu par la position assez fortement soutenue (en parcimonie et inférence bayésienne) de l'espèce *Paleoacanthoscelides gilvus* en groupe-frère des 4 espèces du genre *Bruchus*. Néanmoins, au vu du faible soutien des nœuds profonds dans la plupart des analyses, il est difficile d'avoir une représentation plus précise de la phylogénie de la tribu des Acanthoscelidini.

Méthodologie

Il n'existe pas actuellement de consensus sur la manière dont on doit traiter ces jeux de données combinées. Classiquement, on oppose trois approches (HUELSENBECK *et al.*, 1996) : (1) la combinaison systématique des partitions d'un jeu de données (*total evidence* au sens de KLUGE, 1989), (2) l'analyse séparée systématique des partitions d'un jeu de données (MIYAMOTO & FITCH, 1995), (3) l'analyse combinée conditionnelle (voir BULL *et al.*, 1993 ; DE QUEIROZ, 1993). Pour cette étude sur le genre *Bruchidius*, le choix a été de combiner les quatre partitions du jeu de données selon l'approche dite de *total evidence*. Cette approche peut être néanmoins remise en question, car à la fois un test ILD et l'examen des indices de Bremer partitionnés ont révélé l'existence d'une incongruence entre les différentes partitions du jeu de données. Ces indices de Bremer partitionnés constituent un apport méthodologique significatif en parcimonie dans le sens où il est possible de visualiser pour chaque nœud les sources d'incongruence. Même s'il apparaît que le marqueur Cyt *b* apporte une contribution totale néga-

tive, il constitue néanmoins une source d'information phylogénétique non négligeable car il représente 22 % des valeurs des indices de Bremer partitionnés positifs (voir tableau 4). Dans le cadre d'une analyse combinée conditionnelle, l'existence de cette incongruence aurait imposé des analyses séparées des différentes partitions. Mais pour ce jeu de données de 65 taxons, les analyses séparées des marqueurs ne produisent que des hypothèses phylogénétiques très faiblement résolues (non figurées) et s'avèrent donc peu informatives. Le choix de combiner les différents marqueurs apparaît donc comme étant la seule alternative envisageable en parcimonie. Si le calcul des indices de Bremer partitionnés constitue un apport majeur en parcimonie, concernant les méthodes probabilistes, cette étude a permis également d'illustrer des avancées sur les deux points suivants. Tout d'abord, l'utilisation de nouveaux algorithmes (GUINDON & GASCUEL, 2003) intégrés dans le programme PHYML, rend possible le traitement rapide en maximum de vraisemblance de jeux de données comportant un grand nombre de taxons, ce qui n'était pas possible il y a quelques années. Le second point est relatif à l'hétérogénéité des partitions considérées. Les méthodes probabilistes sont très sensibles au choix du modèle d'évolution de séquences (BOLLBACK, 2002 ; HOLDER & LEWIS, 2003). Aussi, le traitement d'un jeu de données combinées de plusieurs marqueurs qui présentent une hétérogénéité marquée en termes d'information phylogénétique implique la sélection d'un ou plusieurs modèles d'évolution de séquence et la définition de paramètres propres à chacune des partitions. Les analyses partitionnées constituent une réponse élégante au traitement de ces jeux de données hétérogènes. Une étude récente (NYLANDER *et al.*, 2004) a souligné l'intérêt de ce type d'analyses en utilisant des tests bayésiens (*Bayes factors*). Elle montre que la prise en compte de l'hétérogénéité des différentes partitions améliore sensiblement les résultats des analyses phylogénétiques. Les analyses partitionnées sont donc amenées à se généraliser et certains programmes récents comme HyPhy (KOSAKOVSKY POND & MUSE, 2003) ou PAML

(YANG, 1997) par exemple, intègrent cette fonctionnalité en maximum de vraisemblance.

Remerciements. — Nous tenons à remercier tout particulièrement A. Delobel (IRD, Paris) pour ses nombreux commentaires sur le manuscrit et pour son important travail d'identification. Cette étude n'aurait pu voir le jour sans les contributions inestimables des collecteurs qui suivent : D. Azar (MNHN, Paris) pour *Bruchidius holosericeus*, G. Couturier (IRD, Paris) pour les spécimens de Guyane, A. Delobel pour les spécimens de France, d'Italie et du Sénégal, H. Delobel pour les spécimens du Vietnam, G. Fédière (IRD, Le Caire) pour les spécimens d'Égypte et B. Le Rü (IRD, Nairobi) pour les spécimens du Kenya. Nous remercions aussi le personnel de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire (Dakar) pour la communication des spécimens identifiés par J. Decelle ainsi que K.-W. Anton (Emmeningen) pour l'aide à l'identification de certaines bruches européennes.

RÉFÉRENCES

- ANTON, K.-W., 1999. Revision of the genus *Sulcobruchus* Chûjô 1937 and the description of *Parasulcobruchus* nov. gen. (Coleoptera, Bruchidae, Bruchinae). *Linzer biologische Beiträge*, 31 : 629-650.
- ANTON, K.-W. & DELOBEL, A., 2003. African species of the *Bruchidius centromaculatus* group with « eyed » female pygidium (Coleoptera : Bruchidae : Bruchinae). *Genus*, 14 : 159-190.
- BAKER, R.H. & DESALLE, R., 1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of the Hawaiian drosophilids. *Syst. Biol.*, 46 : 645-673.
- BAKER, R.H., YU, X. & DESALLE, R., 1998. Assessing the relative contribution of molecular and morphological characters in simultaneous analysis trees. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 9 : 427-436.
- BOLLBACK, J.P., 2002. Bayesian model adequacy and choice in phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.*, 19 : 1171-1180.
- BOROWIEC, L., 1987. The genera of seed-beetles (Coleoptera, Bruchidae). *Polsk. Pismo Entomol.*, 57 : 3-207.
- BOROWIEC, L., 1988. Bruchidae-Strakowce (Insecta : Coleoptera). *Fauna Polski-Fauna Poloniae*, Tom. 11. *Panstwowe Wydawnictwo Naukowe*, Warszawa.
- BULL, J.J., HUELSENBECK, J.P., CUNNINGHAM, C.W., SWOFFORD, D.L. & WADDELL, P.J., 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42 : 384-397.
- CUNNINGHAM, C.W., 1997. Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.*, 14 : 733-740.
- DELOBEL, A. & TRAN, M., 1993. In : *Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Faune tropicale XXXII Orstom/CTA*, p. 299-333.
- DELSUC, F. & DOUZERY, E.J.P., 2004. Les méthodes probabilistes en phylogénie moléculaire. (2) L'approche bayésienne. *Biosystema*, 22 : xxx-xxx.
- FARRIS, J.S., KÄLLERSJÖ, M., KLUGE, A.G. & BULT, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10 : 315-319.
- GIRIBET, G. & WHEELER, W.C., 1999. On gaps. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13 : 132-143.
- GU, X., FU, Y.-X. & LI, W.-H., 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Mol. Biol. Evol.*, 12 : 546-557.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O., 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.*, 52 : 696-704.
- HOLDER, M. & LEWIS, P.O., 2003. Phylogeny estimation : traditional and bayesian approaches. *Nature Genetics*, 4 : 275-284.
- HUELSENBECK, J.P., BULL, J.J. & CUNNINGHAM, C.W., 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology and Evolution*, 11 : 152-157.
- HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F., 2001. MrBayes : Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17 : 754-755.

- JOHNSON, C.D., 1981. Seed beetle host specificity and the systematics of the Leguminosae. In : Polhill, R.M., Raven, P.H. (eds.), *Advances in Legume Systematics 2. The Royal Botanic Gardens, Kew*, p. 995-1027.
- JOLIVET, P.H., PETITPIERRE, E. & HSIAO, T.H., 1988. In : *Biology of Chrysomelidae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands*.
- KERGOAT, G.J., DELOBEL, A. & SILVAIN, J.-F., 2004. Phylogeny and host-specificity of European seed beetles (Coleoptera, Bruchidae), new insights from molecular and ecological data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32 : 855-865.
- KLUGE, A.G., 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationship among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Syst. Biol.*, 38 : 7-25.
- KOSAKOVSKY POND, S.L. & MUSE, S.V., 2003. HyPhy : hypothesis testing using phylogenies. *University of California San Diego and North Carolina State University*.
- LANAVE, C., PREPARATA, G., SACCONI, C. & SERIO, G., 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.*, 20 : 86-93.
- LAWRENCE, J. F., 1982. Coleoptera. In : Parker, S.P. (ed.), *Synopsis and classification of living organism, vol.2. MacGraw-Hill, New-York*, p. 482-553.
- MIYAMOTO, M.M. & FITCH, W.M., 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Syst. Biol.*, 44 : 64-76.
- MONTEIRO, A. & PIERCE, N.E., 2001. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera : Nymphalidae) inferred from COI, COII, and Ef-1 α gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 18 : 264-281.
- NYLANDER, J.A.A., RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. & NIEVES-ALDREY, J.L., 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Syst. Biol.*, 53 : 47-67.
- POSADA, D. & CRANDALL, K.A., 1998. MODELTEST : testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 : 817-818.
- DE QUEIROZ, A., 1993. For consensus (sometimes). *Syst. Biol.*, 42 : 368-372.
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H. & FLOOK, P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87 : 651-702.
- SORENSEN, M.D., 1999. TreeRot. v2. *Boston University, Boston*.
- SWOFFORD, D.L., 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10, *Sinauer Associates, Sunderland, MA*.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G., 1997. The ClustalX windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*

Troisième partie : Le modèle *Bruchidius*

Comme son nom l'indique, cette partie est dédiée à l'étude du modèle *Bruchidius* (Coleoptera, Bruchidae).

La première partie est consacrée aux matériel et méthodes. Elle détaille différents points relatifs à l'échantillonnage des espèces étudiées, l'obtention des données moléculaires ou encore les programmes d'analyses phylogénétiques utilisés.

La second partie présente les résultats majeurs de la thèse, qui sont illustrés à travers la présentation et la discussion des résultats de trois articles⁵⁹.

⁵⁹ le premier de ces trois article est déjà publié, les deux autres sont actuellement en revue.

Chapitre premier : Matériel et méthodes

Section I. Données biologiques

1.1. Echantillonnage

1.1.1. Collecte des échantillons

Les différentes espèces qui constituent l'échantillon taxonomique en collection sont listées dans le tableau 3.1. Ce tableau donne pour chaque espèce des informations sur la plante-hôte des spécimens en collection (si les insectes proviennent d'élevage), l'origine géographique des individus, ainsi que le nom du collecteur. La majorité des spécimens sont conservés à l'antenne de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) du laboratoire d'Entomologie du Muséum national d'Histoire naturelle⁶⁰ et au laboratoire Populations, Génétique et Evolution du Centre National pour la Recherche Scientifique⁶¹. A l'exception de neuf espèces, toutes les spécimens en collection ont été élevés à partir de graines ou de gousses de plantes-hôtes potentielles collectées sur le terrain. Les graines sont isolées (par espèce et localité) dans des boîtes grillagées (ou des sacs de plastique transparents qui sont percés), jusqu'à la fin des émergences. Les imagos sont tués directement dans des flacons d'éthanol concentré à 95 % ou 100 % (qui servent également à leur conservation en vue de leur utilisation pour des analyses moléculaires).

La plupart des espèces en collection sont d'origines africaines ou européennes, ce qui en rapport avec les implantations locales et les efforts de collectes des différents membres de l'unité de recherche IRD R072⁶². Ainsi, les espèces africaines, proviennent en majorité de missions de terrains effectués par l'IRD au Sénégal (de 1994 à 1999), en Egypte (de 2000 à 2003) et au Kenya (de 2001 à 2003). Cela correspond à un travail de terrain considérable, qui est possible presque toute l'année à l'exception des mois les plus chauds. Au Sénégal, des graines de 96 espèces de plantes-hôtes potentielles ont été collectées (dans 95 localités distinctes), en Egypte, ce sont des des graines de 95 espèces de plantes-hôtes potentielles qui ont été collectées (dans 29 localités distinctes), et au Kenya, ce sont les graines de 60 espèces de plantes-hôtes potentielles qui ont été collectées (dans 49 localités distinctes). En Europe de nombreuses espèces ont été collectées en France, en Grèce, et en Italie par A. Delobel. Les gousses sont récoltées généralement pendant les mois d'été, puis isolées dans des sacs de plastique percés, jusqu'à la fin des émergences (Delobel & Delobel, 2003). Des spécimens originaires du Moyen-Orient et d'Europe orientale ont été également fournis par K.-W. Anton

⁶⁰ unité de recherche IRD R072 implantée au laboratoire d'Entomologie du MNHN, 45 rue Buffon, Paris

⁶¹ unité de recherche IRD R072 implantée au laboratoire PGE (CNRS - UPR 9034) à Gif sur Yvette

⁶² A. Delobel en Europe, G. Fédière en Egypte, G. Couturier en Amérique du Sud et B. Le Rü au Kenya

(*Bruchidius foveolatus* de Turquie et *Bruchidius tuberculatus* du Kyrgistan) et D. Azar (MNHN, Paris) (*Bruchidius holosericeus* du Liban). Quelques espèces asiatiques ont été collectées par H. Delobel au Vietnam et une espèce de *Bruchidius* originaire du Japon a été récemment acquis. Pour l'Amérique du Sud, plusieurs espèces ont été collectées grâce à la collaboration de G. Couturier (IRD, Paris). Une partie des données utilisées dans ce travail de thèse correspond également à un travail d'échantillonnage effectué en Amérique du sud par N. Alvarez (CEFE, Montpellier). Tout ces efforts conjugués ont fait que l'échantillon qui comptait en 2001 une trentaine d'espèce, est passé à plus de 110 espèces en 2004 (dont plus de la moitié qui appartiennent au genre *Bruchidius*).

Tableau 3.1. Echantillon taxonomique

Genre, Espèce ⁶³	Plantes-hôtes	Origine	Collecteur
<i>Acanthoscelides</i>			
<i>macrophthalmus</i> (Schaeffer, 1907)	<i>Leucanea leucocephala</i> (Lam)	Egypte : Bahariya	G. Fédière
	<i>Leucanea leucocephala</i> (Lam)	Vietnam : Chaudoc	H. Delobel
<i>obtectus</i> (Say, 1831)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Egypte : Giza	G. Fédière
<i>Algarobius</i>			
<i>prosopis</i> (LeConte, 1858)	<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.)	Egypte : El Tur	G. Fédière
	<i>Prosopis glandulosa</i> Torrey	Egypte : El Tur	G. Fédière
	<i>Prosopis glandulosa</i> Torrey	Egypte : Bahariya	G. Fédière
<i>Bruchidius</i>			
<i>auratopubens</i> Decelle, in litt.	<i>Faidherbia albida</i> (Del)	Sénégal : Louga	M. Sembène
	<i>Faidherbia albida</i> (Del)	Sénégal : Louga	H. Delobel
<i>aurivillii</i> (Blanc, 1889)	<i>Acacia tortilis</i> (Forsskal)	Kenya : Nguruman	B. Le Rü
	<i>Acacia tortilis</i> (Forsskal)	Kenya : Fleuve	B. Le Rü
<i>bernardi</i> Delobel&Anton, 2004	<i>Astragalus depressus</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>biguttatus</i> (Olivier, 1795)	<i>Cistus albidus</i> L.	France : Gard	A. Delobel
	<i>Halimium halimifolium</i> L.	France : Corse	A. Delobel
<i>bimaculatus</i> (Olivier, 1795)	<i>Medicago marina</i> L.	France : Corse	A. Delobel
<i>cadei</i> Decelle, in litt.	<i>Faidherbia albida</i> (Del)	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>campylacanthae</i> Decelle, in litt.	<i>Acacia polyacantha</i> Willd.	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>caninus</i> (Kraatz, 1869)	<i>Astragalus hamosus</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Astragalus hamosus</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Astragalus monspessulanus</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Astragalus tragacantha</i> L.	France : Corse	A. Delobel
<i>centromaculatus</i> (Allard, 1868)	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Egypte : Bahariya	G. Fédière
	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Sénégal : Fleuve	M.T. Gueye
	<i>Acacia sieberiana</i> D.C.	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>chloroticus</i> (Dalm., 1833)	<i>Sesbania keniensis</i> J.B. Gillet	Kenya : Molo	B. Le Rü
	<i>Sesbania pachycarpa</i> D.C.	Sénégal : Fatick	H. Delobel
<i>cinerascens</i> (Gyllenhal, 1833)	<i>Eryngium campestre</i> L.	France : Essone	A. Delobel
<i>dichrostachydis</i> Del.&Anton, 2003	<i>Dichrostachydis cinerea</i> (L.)	Sénégal : Fatick	H. Delobel
	<i>Dichrostachydis cinerea</i> (L.)	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>dilaticornis</i> Decelle, in litt.	- pas de données d'élevage -	Sénégal : Fatick	H. Delobel
	- pas de données d'élevage -	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>dispar</i> (Gyllenhal, 1833)	<i>Trifolium pratense</i> L.	France : Alpes	A. Delobel
<i>dialii</i> Decelle, 1973	<i>Dialium guineense</i> Willd.	Sénégal : Ziguinchor	A. Delobel
<i>elnaiensis</i> (Pic, 1921)	<i>Acacia dolichocephala</i> Harms	Kenya : Kabarnet	B. Le Rü

⁶³ les abréviations suivantes sont utilisées : in litteris (in litt.), prope (pr.) ; les espèces indéterminées sont désignées par sp.

<i>foveolatus</i> (Gyllenhall, 1833)	- pas de données d'élevage -	Turquie : Anamurium	K.-W. Anton
<i>fulvicornis</i> (Motschulsky, 1874)	<i>Trifolium vesiculosum</i> Savi	France : Corse	A. Delobel
<i>fulvus</i> (Allard, 1883)	<i>Alhagi graecorum</i> Boiss.	Egypte : Bahariya	G. Fédrière
<i>grandemaculatus</i> (Pic, 1933)	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Kenya : Tsavo	B. Le Rü
<i>holosericeus</i> (Schönherr, 1832)	- pas de données d'élevage -	Liban : Kfar Selouane	D. Azar
<i>incarnatus</i> (Boheman, 1833)	<i>Vicia faba</i> L.	Egypte : Bahariya	G. Fédrière
<i>jocosus</i> (Gyllenhall, 1833)	- pas de données d'élevage -	France : Corse	A. Delobel
<i>lineatopygus</i> (Pic, 1924)	<i>Indigofera tinctoria</i> L.	Sénégal : Louga	H. Delobel
	<i>Indigofera tinctoria</i> L.	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>lividimanus</i> (Gyllenhall, 1833)	<i>Calicotome villosa</i> (Poirét)	France : Corse	A. Delobel
	<i>Cytisophyllum sessilifolium</i> (L.)	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Cytisus scorpiarius</i> (L.)	France : Corse	A. Delobel
	<i>Cytisus scorpiarius</i> (L.)	France : Monsols	A. Delobel
	<i>Cytisus villosus</i> Pourret	France : Corse	A. Delobel
<i>lutescens</i> (Blanchard, 1844)	<i>Onobrychis caput-galli</i> (L.)	Grèce : Fokida	A. Delobel
<i>marginalis</i> (Fabricius, 1776)	<i>Astragalus monspessulanus</i> L.	France : Alpes	A. Delobel
	<i>Astragalus monspessulanus</i> L.	France : Gard	A. Delobel
	<i>Astragalus monspessulanus</i> L.	France : Séderon	A. Delobel
	<i>Astragalus monspessulanus</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>murinus</i> (Boheman, 1829)	<i>Trifolium subterraneum</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
<i>nanus</i> (Germar, 1824)	<i>Medicago orbicularis</i> (L.)	Grèce : Korinthos	A. Delobel
	<i>Medicago orbicularis</i> (L.)	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>niokolobaensis</i> (Decelle, 1969)	<i>Tephrosia bracteolata</i> Gui.&Per.	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>pauper</i> (Boheman, 1829)	<i>Ornithopus compressus</i> L.	France : Corse	A. Delobel
<i>picipes</i> (Germar, 1824)	<i>Trifolium angustifolium</i> L.	France : Corse	A. Delobel
<i>poecilus</i> (Germar, 1824)	<i>Astragalus contortuplicatus</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>poupillieri</i> (Allard, 1868)	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>pusillus</i> (Germar, 1824)	<i>Hippocrepis emerus</i> (L.)	France : Gard	A. Delobel
	<i>Hippocrepis emerus</i> (L.)	France : Vaulx-en-Velin	A. Delobel
	<i>Hippocrepis emerus</i> (L.)	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Securigera varia</i> (L.)	France : Vaulx-en-Velin	A. Delobel
<i>pygidiopictus</i> Decelle, in litt.	<i>Faidherbia albida</i> (Del)	Sénégal : Fatick	M. Sembène
	<i>Faidherbia albida</i> (Del)	Sénégal : Louga	M. Sembène
	<i>Faidherbia albida</i> (Del)	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>pygmaeus</i> (Boheman, 1833)	<i>Trifolium angustifolium</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Trifolium striatum</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Trifolium stellatum</i> L.	Grèce : Korinthos	A. Delobel
<i>pr. pygmaeus</i>	<i>Trifolium stellatum</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>quadrisignatus</i> (Fahraeus, 1871)	<i>Acacia ataxacantha</i> D.C.	Kenya : Mtito Andei	B. Le Rü
	<i>Acacia ataxacantha</i> D.C.	Kenya : Mwingi	B. Le Rü
	<i>Acacia ataxacantha</i> D.C.	Kenya : Oltepesi	B. Le Rü
	<i>Acacia brevispica</i> D.C.	Kenya : Emening	B. Le Rü
<i>quinqueguttatus</i> (Olivier, 1795)	- pas de données d'élevage -	Grèce : Lesbos	A. Delobel
<i>raddianae</i> Anton & Delobel, 2003	<i>Acacia tortilis</i> (Forsskal)	Egypte : Ras Mohamed	G. Fédrière
	<i>Acacia tortilis</i> (Forsskal)	Sénégal : Fleuve	M. Sembène
<i>rubicundus</i> (Fahraeus, 1839)	<i>Acacia mellifera</i> (M. Vahl.)	Kenya	B. Le Rü
	<i>Acacia thomasii</i> Harms	Kenya : Olepolos	B. Le Rü
	<i>Acacia thomasii</i> Harms	Kenya : Oltepesi	B. Le Rü
<i>pr. saudicus</i>	<i>Acacia reficiens</i> Wawra	Kenya : Garissa	B. Le Rü
	<i>Acacia zanzibarica</i> (S. Moore)	Kenya : Garissa	B. Le Rü
<i>securiger</i> Delobel & Anton, 2003	<i>Dichrostachys cinerea</i> (L.)	Sénégal : Fatick	H. Delobel
	<i>Dichrostachys cinerea</i> (L.)	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>seminarius</i> (L., 1767)	<i>Dorycnium hirsutum</i> (L.)	France : Corse	A. Delobel
	<i>Hippocrepis unisiliquosus</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
	<i>Lotus corniculatus</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Lotus cytisoides</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Lotus cytisoides</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
	<i>Lotus edulis</i> L.	France : Corse	A. Delobel

	<i>Lotus maritimus</i> L.	France : Séderon	A. Delobel
	<i>Lotus ornithopodioides</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Scorpiurus muricatus</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
<i>sericatus</i> (Germar, 1824)	<i>Trifolium angustifolium</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Trifolium vesiculosum</i> Savi	France : Corse	A. Delobel
<i>submaculatus</i> (Fahraeus, 1839)	<i>Acacia dudgeoni</i> Holland	Sénégal : Tambacounda	M.T. Gueye
	<i>Acacia macrostachya</i> D.C.	Sénégal : Kolda	M. Sembène
	<i>Acacia macrostachya</i> D.C.	Sénégal : Louga	M. Sembène
	<i>Acacia polyacantha</i> Willd.	Sénégal : Fatick	H. Delobel
	<i>Acacia polyacantha</i> Willd.	Sénégal : Thies	H. Delobel
	<i>Acacia senegal</i> (L.)	Sénégal : Diourbel	M. Sembène
	<i>Acacia senegal</i> (L.)	Sénégal : Fleuve	M. Sembène
<i>tibialis</i> (Boheman, 1829)	<i>Medicago polymorpha</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
<i>trifolii</i> (Motschulsky, 1874)	<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	Egypte : Bahariya	G. Fédière
<i>tuberculatus</i> (Hochhuth, 1847)	- pas de données d'élevage -	Kyrgistan	K.-W. Anton
<i>uberatus</i> (Fahraeus, 1895)	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Egypte : Bahariya	G. Fédière
	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Sénégal : Fleuve	M.T. Gueye
	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Sénégal : Louga	M. Sembène
	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>unicolor</i> (Olivier, 1795)	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.	France : Monieux	A. Delobel
<i>urbanus</i> (Sharp, 1885)	<i>Acacia catechu</i> (L.)	Japon : Fukuoka	H. Yoshitake
<i>varipictus</i> (Motschulsky, 1874)	<i>Medicago murex</i> Willd.	France : Corse	A. Delobel
<i>varius</i> (Olivier, 1795)	<i>Trifolium angustifolium</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Trifolium fragiferum</i> L.	France : Villeurbanne	A. Delobel
	<i>Trifolium fragiferum</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
	<i>Trifolium medium</i> L.	France : Monsols	A. Delobel
	<i>Trifolium physodes</i> M. Bieb.	Grèce : Achaia	A. Delobel
<i>villosus</i> (Fabricius, 1792)	<i>Calicotome villosa</i> (Poiret)	Chypres : Prodomes	A. Delobel
	<i>Calicotome villosa</i> (Poiret)	Grèce : Lakonia	A. Delobel
	<i>Cytisophyllum sessilifolium</i> (L.)	France : Ville St Auzon	A. Delobel
	<i>Cytisophyllum sessilifolium</i> (L.)	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Genista monspessulana</i> (L.)	France : Corse	A. Delobel
<i>sp. KE01</i>	<i>Faidherbia albida</i> (Del)	Kenya : Nguruman	B. Le Rü
<i>sp. KE02</i>	<i>Acacia brevispica</i> Harms	Kenya : Awasi	B. Le Rü
	<i>Acacia brevispica</i> Harms	Kenya : Emening	B. Le Rü
<i>sp. KE03</i>	<i>Acacia etbaica</i> Schweinf.	Kenya : Kangonoi	B. Le Rü
<i>sp. KE04</i>	<i>Acacia etbaica</i> Schweinf.	Kenya : Kangonoi	B. Le Rü
	<i>Acacia reficiens</i> Wawra	Kenya : Garissa	B. Le Rü
<i>sp. KE05</i>	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Kenya : Isiniya	B. Le Rü
<i>sp. KE06</i>	<i>Acacia nilotica</i> (L.)	Kenya : Isiniya	B. Le Rü
<i>sp. KE07</i>	<i>Acacia oerfota</i> (Forsskal)	Kenya : Ndeyini	B. Le Rü
<i>sp. KE08</i>	<i>Acacia zanzibarica</i> (S. Moore)	Kenya : Garissa	B. Le Rü
<i>sp. KE09</i>	<i>Albizia grandibracteata</i> Taubert	Kenya : Mirogi	B. Le Rü
	<i>Albizia versicolor</i> Oliver	Kenya : Awasi	B. Le Rü
<i>sp. KE10</i>	<i>Delonix elata</i> (L.)	Kenya : Kyuso	B. Le Rü
<i>sp. KE11</i>	<i>Indigofera arrecta</i> A. Rich	Kenya : Mtito Andei	B. Le Rü
	<i>Indigofera emarginella</i> A. Rich	Kenya : Kimilili	B. Le Rü
<i>sp. KE12</i>	<i>Indigofera arrecta</i> A. Rich	Kenya : Mtito Andei	B. Le Rü
<i>sp. KE13</i>	<i>Indigofera emarginella</i> A. Rich	Kenya : Kimilili	B. Le Rü
<i>sp. KE14</i>	<i>Desmodium velutinum</i> (Willd.)	Kenya : Shimba hills	B. Le Rü
<i>sp. KE15</i>	<i>Acacia lahai</i> Benth.	Kenya : Kampi Ya Moto	B. Le Rü
	<i>Acacia lahai</i> Benth.	Kenya : Narok	B. Le Rü
<i>sp. KE16</i>	<i>Acacia brevispica</i> Harms	Kenya : Emening	B. Le Rü
<i>sp. SE01</i>	<i>Aeschynomene indica</i> L.	Sénégal : Fatick	H. Delobel
	<i>Aeschynomene sensitiva</i> Sw.	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>sp. SE02</i>	<i>Indigofera astragalina</i> D.C.	Sénégal : Louga	H. Delobel
	<i>Indigofera astragalina</i> D.C.	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>sp. SE03</i>	<i>Indigofera aspera</i> D.C.	Sénégal : Dakar	H. Delobel

<i>Bruchus</i>			
<i>affinis</i> Frölich, 1799	<i>Lathyrus latifolius</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Lathyrus sylvestris</i> L.	France : Joigny	A. Delobel
<i>atomarius</i> (L., 1761)	<i>Lathyrus linifolius</i> (Reichard)	France : Vaucluse	A. Delobel
<i>brachialis</i> Fahraeus, 1839	<i>Vicia pannonica</i> Crantz	Grèce : Voiotia	A. Delobel
	<i>Vicia villosa</i> Roth	France : Corse	A. Delobel
	<i>Vicia villosa</i> Roth	Grèce : Achaïa	A. Delobel
	<i>Vicia villosa</i> Roth	Grèce : Lakonia	A. Delobel
	<i>Vicia villosa</i> Roth	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>emarginatus</i> Allard, 1868	<i>Vicia peregrina</i> L.	France : Vaucluse	A. Delobel
	<i>Vicia peregrina</i> L.	Grèce : Korinthos	A. Delobel
	<i>Vicia peregrina</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
<i>griseomaculatus</i> Gyllenhal, 1833	<i>Vicia</i> sp.	France : Essonne	A. Delobel
<i>laticollis</i> Boheman, 1833	<i>Lathyrus aphaca</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
<i>loti</i> Paykull, 1800	<i>Lathyrus pratensis</i> L.	France : Essonne	A. Delobel
<i>luteicornis</i> Illiger, 1794	<i>Vicia sativa</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Vicia sativa</i> L.	France : Indre	A. Delobel
<i>occidentalis</i> Luk. & Ter., 1957	<i>Vicia tenuifolia</i> Roth	France : Corse	A. Delobel
<i>pisorum</i> (L., 1758)	<i>Pisum sativum</i> L.	Grèce : Voiotia	A. Delobel
	<i>Pisum sativum</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>rufimanus</i> , Boheman, 1833	<i>Lathyrus venetus</i> (Miller)	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Vicia lutea</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Vicia lutea</i> L.	Grèce : Lakonia	A. Delobel
	<i>Vicia pannonica</i> Crantz	France : Vaucluse	A. Delobel
<i>rufipes</i> Herbst, 1783	<i>Vicia sativa</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Vicia sativa</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>tristiculus</i> (Fahraeus, 1839)	<i>Lathyrus aphaca</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Lathyrus cicera</i> L.	France : Vaucluse	A. Delobel
	<i>Lathyrus cicera</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Lathyrus hirsutus</i> L.	France : Corse	A. Delobel
	<i>Lathyrus odoratus</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>tristis</i> Boheman, 1833	<i>Lathyrus cicera</i> L.	France : Ville St Auzon	A. Delobel
<i>viciae</i> Olivier, 1795	<i>Lathyrus digitatus</i> (M. Bieb.)	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Lathyrus pratensis</i> L.	France : Oise	A. Delobel
	<i>Lathyrus sphaericus</i> Retz	Grèce : Achaïa	A. Delobel
	<i>Lathyrus sphaericus</i> Retz	Italie : Basilicata	A. Delobel
<i>Callosobruchus</i>			
<i>chinensis</i> (L., 1758)	<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Egypte : Giza	G. Fédière
<i>maculatus</i> (Fabricius, 1775)	<i>Vigna radiata</i> (L.)	Kenya : Embu	B. Le Rü
	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Vietnam : Saïgon	H. Delobel
<i>phaseoli</i> (Gyllenhal, 1833)	<i>Lablab purpureus</i> (L.)	Egypte : Bahariya	G. Fédière
<i>subinnotatus</i> (Pic, 1914)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	Sénégal : Dakar	H. Delobel
<i>Caryoborus</i>			
<i>serripes</i> (Sturm, 1826)	<i>Astrocaryum chambira</i> Burret	Pérou : St Martin	G. Couturier
<i>Conicobruchus</i>			
<i>strangulatus</i> (Fahraeus, 1839)	<i>Crotalaria podocarpa</i> D.C.	Sénégal : Dakar	H. Delobel
<i>Decellebruchus</i>			
<i>atrolineatus</i> (Pic, 1921)	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Sénégal : Dakar	H. Delobel
<i>Gibbobruchus</i>			
sp.	- pas de données d'élevage -	Guyane française	G. Couturier
<i>Kingsolverius</i>			
<i>gibbicollis</i> Borowiec, 1987	- pas de données d'élevage -	Vietnam : Saïgon	H. Delobel

<i>Megabruchidius tonkineus</i> (Pic, 1904)	<i>Gleditsia australis</i> Forb.&Hems.	Vietnam : Saïgon	H. Delobel
<i>Pachymerus cardo</i> (Fahraeus, 1839)	<i>Elais guineensis</i> Jacq.	Guyane française	G. Couturier
<i>Paleoacanthoscelides gilvus</i> (Gyllenhal, 1839)	<i>Hedysarum coronarium</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Hedysarum spinosissimum</i> L.	Italie : Basilicata	A. Delobel
	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.	France : Monieux	A. Delobel
<i>Penthobruchus germaini</i> (Pic, 1894)	<i>Parkinsonia aculeata</i> L.	Sénégal : Thies	H. Delobel
<i>Pseudopachymerina spinipes</i> (Erichson, 1834)	<i>Acacia farnesiana</i> (L.)	Egypte : Bahariya	G. Fédière
<i>Spermophagus multifloccosus</i> Borowiec sp.	<i>Merremia tridentata</i> (L.)	Sénégal : Dakar	H. Delobel
	- pas de données d'élevage -	France : Gard	A. Delobel
<i>Tuberculobruchus albizziarum</i> (Decelle, 1958) <i>babaulti</i> (Pic, 1921) <i>natalensis</i> (Pic, 1903) <i>silaceus</i> (Fahraeus, 1839) <i>sinaitus</i> (K. Daniel, 1907) <i>subuniformis</i> (Fahraeus, 1839)	<i>Albizia lebbeck</i> (L.)	Sénégal : Dakar	H. Delobel
	<i>Acacia amythethophylla</i> A. Rich.	Kenya : Thitani	B. Le Rü
	<i>Acacia sieberiana</i> D.C.	Sénégal : Thies	H. Delobel
	<i>Acacia macrostachya</i> D.C.	Sénégal : Fatick	H. Delobel
	<i>Acacia macrostachya</i> D.C.	Sénégal : Kolda	M.T. Gueye
	<i>Acacia tortilis</i> (Forsskal)	Egypte : Aïn Sukna	G. Fédière
	<i>Acacia tortilis</i> (Forsskal)	Sénégal : Fleuve	M. Sembène
	<i>Acacia ataxacantha</i> D.C.	Kenya : Mtito Andei	B. Le Rü
	<i>Acacia ataxacantha</i> D.C.	Kenya : Oltepesi	B. Le Rü

1.1.2. Identification des spécimens

La majorité des spécimens ont été identifiés par A. Delobel, en utilisant des préparations entre lame et lamelle des génitalia mâles, et en observant des caractères clés de morphologie externe. Toutefois, une vingtaine d'espèces (dont 19 espèces africaines) n'ont pas été identifiées, malgré l'accès aux nombreux types qui sont conservés dans la collection générale du MNHN à Paris, et l'accès à la collection de J. Decelle⁶⁴. Il est donc vraisemblable que plusieurs de ces espèces soient nouvelles pour la science. Tous les noms utilisés tiennent compte des révisions taxonomiques les plus récentes.

L'identification des plantes est généralement réalisée par les collecteurs sur du matériel frais, en utilisant des flores locales. Pour les espèces européennes, ce travail a grandement bénéficié de l'expertise de B. Delobel (INRA/INSA, Villeurbanne). Tous les noms des plantes-hôtes ont été vérifiés et mis en conformité avec les plus récentes révisions taxonomiques à l'aide de la base de donnée du Missouri Botanical Garden (« International Legume Database and Information Services : www.ildis.org ») qui est consultable sur internet.

⁶⁴ prêtée par l'Institut Fondamental d'Afrique Noire (Dakar, Senegal)

1.2. Génitalias

1.2.1. Préparations des génitalias

La préparations des différentes pièces génitales constituant l'édéage mâle ou femelle se fait préférentiellement sur du matériel qui a été potassé et conservé dans de l'éthanol concentré à 50 %. Cependant il est possible de travailler sur du matériel sec, ou conservé dans de l'alcool plus concentré, à condition de réhydrater au préalable (pendant plusieurs heures) les spécimens à disséquer. Les individus sont disséqués sous la loupe binoculaire et à l'aide de pinces fines⁶⁵.

La méthode la plus simple consiste à ouvrir l'individu au niveau du pourtour du pygidium, pour extraire par la suite les génitalias de l'abdomen. Une fois que les génitalias sont isolées on les diposent dans une coupelle avec de l'eau et de la potasse. Après quelques minutes de traitement à la potasse, il faut nettoyer délicatement les génitalias à l'aide des pinces. Si l'individu est un mâle, il faut séparer avec délicatesse les différentes pièces emboîtées constituant l'édéage. Pour l'édéage des femelles, il faut faire attention à ne pas perdre la spermathèque et à ne pas déchirer la bourse copulatrice. Une fois isolées, les pièces sont placées dans de la glycérine, entre lame et lamelle. On peut ainsi les observer au microscope. Afin de les conserver pour des études ultérieures, les différentes pièces sont progressivement déshydratées dans quatre bains de concentration croissante d'éthanol (50 %, 70 %, 95 % et 100 %), puis dans du toluène (cinq minutes à chaque fois). Elles sont ensuite fixées dans du baume du Canada et placées entre lame et lamelle pour être conservées.

1.2.2. Intérêt des génitalias

L'identification formelle de nombreuses espèces de Bruchidae nécessite un montage des génitalias mâles. En effet, les caractères morphologiques externes sont en général peu discriminants, et peuvent présenter une certaine variabilité intraspécifique⁶⁶ (A. Delobel., com. pers.). De nombreux auteurs (Iablokoff-Khnzorian, 1966 ; Kingsolver, 1970 ; Borowiec, 1987a) ont souligné la valeur des génitalias (principalement des génitalias mâles) comme caractères informatifs. En 1998, dans leur analyse cladistique de la morphologie des *Caryedon*, Silvain & Delobel ont inclus douze caractères des génitalias mâles et femelles.

Le tableau 3.2. qui suit propose un codage de 22 caractères des génitalias mâles et femelles, qui a été établi à partir de l'observation des génitalias des espèces étudiées. Une analyse cladistique a été conduite pour une partie de cet échantillon, sur la base de ce codage. La topologie obtenue (non figurée) n'est pas résolue et difficilement exploitable et de nombreux caractères apparaissent comme homoplasiques dans l'analyse. Etant donné la taille de l'échantillon et le nombre peu élevé de caractères potentiellement informatifs en morphologie, une approche moléculaire a donc été privilégié pour reconstruire la phylogénie des espèces de notre échantillon.

⁶⁵ par exemple des pinces Dumont n°5

⁶⁶ en particulier pour ce qui est de la coloration ou de la taille

Tableau 3.2. Codage de caractères des génitalias mâles et femelles chez les Bruchidae

#	Caractère	Etat plésiomorphe	Etat apomorphe
	<i>mâle</i>		
1	Extrémité de la virga	pointue	arrondie
2	Bords de la virga	droit ou concave	convexe
3	Virga fortement allongée sur plus des 2/3 de sa longueur	non	oui
4	Virga	plane	incurvée à son extrémité
5	Lobe médian	court	allongé
6	Lobe médian	de diamètre presque constant	fortement élargis dans sa partie Distale
7	Sclérites charnières	absents	présents
8	Petites dents faiblement sclérifiées	absentes ou à peine visibles	présentes
9	Grandes dents fortement sclérifiées	absentes	présentes
10	Sclérites marqués	absents	présents
11	Spiculum gastrale	simple	complexe
12	Tige du spiculum gastrale	de même taille ou plus longue que la longueur des branches	plus courte que la longueur des branches
13	Paramères	sans anneau basal	avec un anneau basal
14	Branches des paramères	fusionnées sur plus de la moitié de leur longueur	fusionnées sur moins de la moitié de leur longueur
15	Apex des paramères	simple	complexe
16	Branches distales des paramères	droites ou divergentes	convergentes
17	Carène bien différenciée	absente	présente
	<i>femelle</i>		
18	Ovipositeur de la femelle	long	court
19	Partie distale de la spermathèque	conique	autre
20	Position de l'apex de la spermathèque par rapport aux bases de la glande et du canal de la spermathèque	au-dessus	en-dessous
21	Sclérites différenciés sur la bourse copulatrice	absents	présents
22	Bases de la glande et du canal de la spermathèque	éloignées	contigues

Cependant il peut être intéressant de faire un retour sur la morphologie en se basant sur les résultats des analyses moléculaires. Cette démarche peut ainsi mettre en évidence certains caractères informatifs qui peuvent avoir été négligés dans des études antérieures.

Un exemple pertinent peut être donné à travers l'étude des génitalias mâles chez les espèces du genre *Bruchus* (Bruchinae, Bruchini). Les espèces appartenants à ce genre ont une pièce de l'appareil génital mâle qui est fortement sclérifié, l'urosternite. En se basant sur un arbre phylogénétique obtenue à partir de données moléculaires, on peut mettre en évidence la similitude structurelle des urosternites d'espèces proches (cf. Fig. 3.1. page suivante).

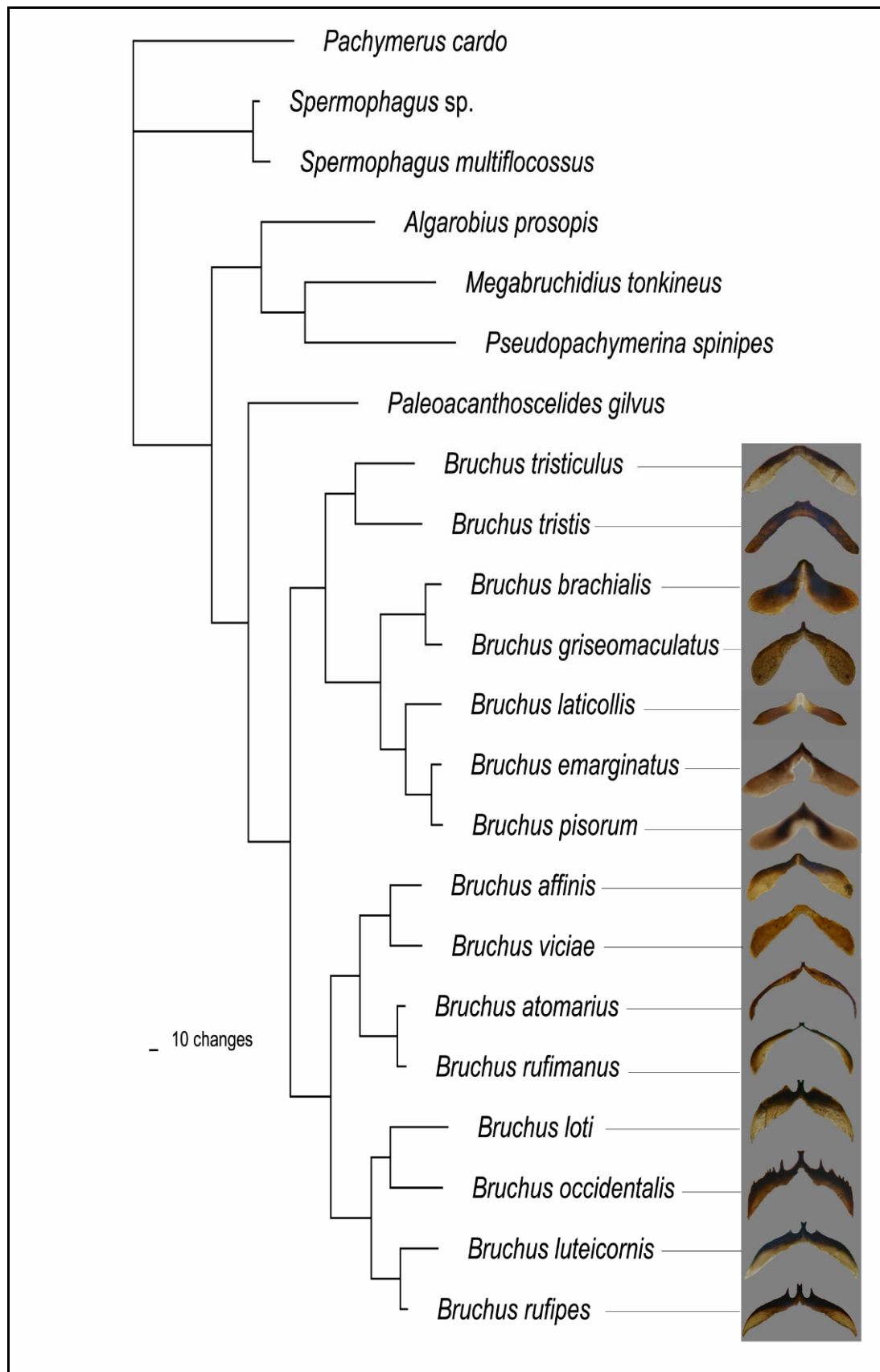


Figure 3.2. arbre le plus parcimonieux issu de l'analyse cladistique non pondérée d'un jeu de données moléculaires combinées (12S, Cyt b, COI, 28S-D2). Des clichés issus de montages (entre lame et lamelle) des urosternites mâles de chaque espèce du genre *Bruchus* sont figurés en médaillon sur la droite.

1.3. Obtention des données de séquences

1.3.1. Extraction de l'ADN total

Le plus souvent l'ADN a été extrait à partir d'individus entiers préservés dans l'éthanol concentré à 95 % ou 100 % mais pour certaines espèces (*Bruchidius dialii* par exemple), l'extraction d'ADN a été effectuée sur des individus secs, parfois en collection depuis plus de 10 ans. En général l'individu entier est utilisé pour l'extraction, mais pour certaines espèces de grande taille, de meilleurs résultats ont été obtenus en n'utilisant que les pattes postérieures, et le thorax. Des kits d'extraction⁶⁷ de la firme Quiagen (« Quiagen DNeasy Tissue Kit ») ont été utilisés pour obtenir l'ADN des spécimens étudiés. Ces kits isolent rapidement l'ADN sur une membrane de gel de silice sans avoir recours à une précipitation au phénol-chloroforme et à l'éthanol. La première étape (voir Fig. 3.2.) consiste à broyer mécaniquement les échantillons dans des tubes eppendorf de 1,5 ml contenant une solution de tampon phosphate salin (PBS). Les tissus sont ensuite lysés (ajout de protéinase K) plusieurs heures dans un bain marie à 55 °C, puis 10 min à 70 °C.

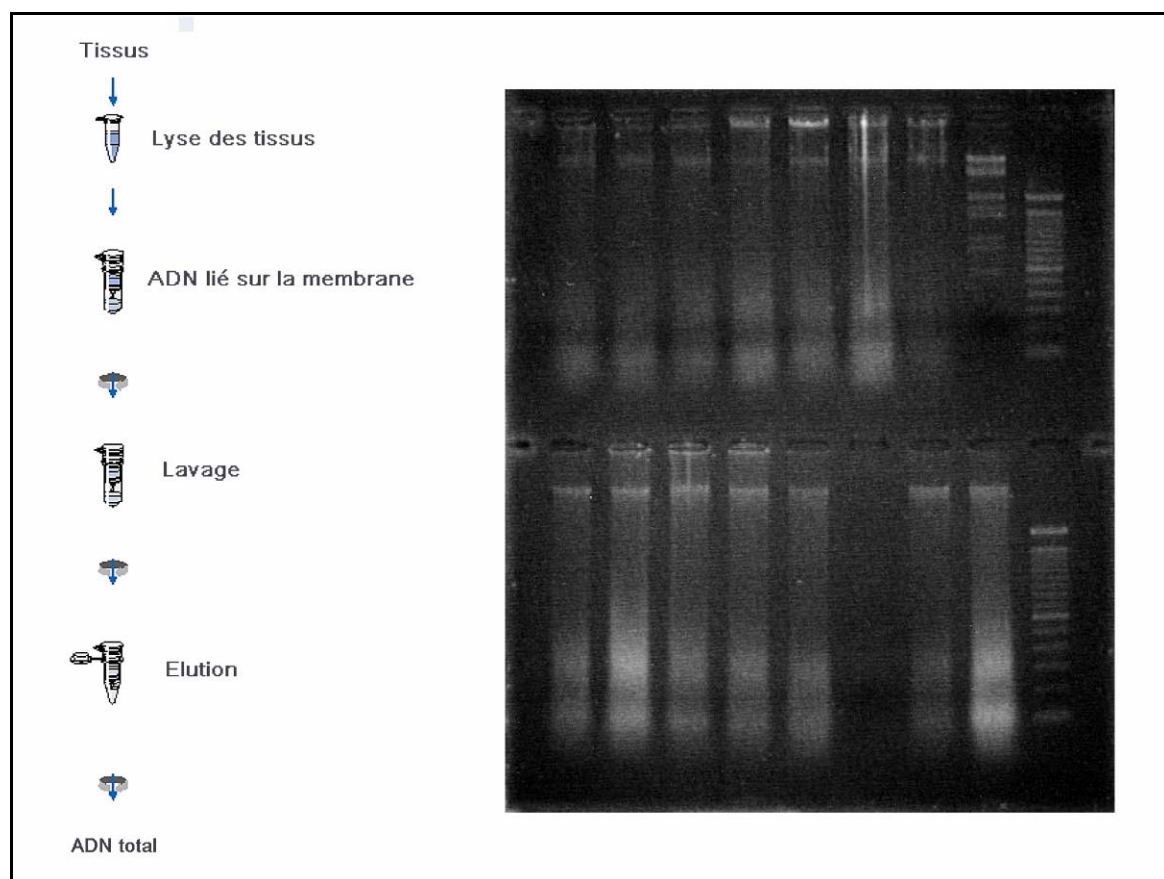


Figure 3.2. Figure illustrant le protocole suivi pour l'extraction de l'ADN total (à gauche). A droite est figuré un cliché de gel de contrôle d'extraction (gel d'agarose).

⁶⁷ la seconde variante du protocole standard d'extraction d'ADN d'insecte a été suivie

Après cette étape de lyse des tissus, l'ADN est lié (et débarrassé de nombreuses impuretés) sur la membrane de gel de silice par une succession de cycles de centrifugation qui utilisent des tampons spécifiques. La dernière étape du protocole correspond à une élution de l'ADN, qui est alors recueilli et stocké à -20 °C. Un gel de contrôle sur agarose (à 2.1 %) est enfin effectué afin de vérifier que l'ADN a été correctement extrait (voir Fig. 3.2.).

1.3.2. Définition des amorces et amplification

Le choix des marqueurs moléculaires en inférence phylogénétique est crucial et il est important de définir une stratégie de séquençage qui sera fonction des organismes étudiés. En effet, l'utilisation de marqueurs trop conservés quand on s'intéresse à des événements de spéciation récents, où l'utilisation de marqueurs évoluant très rapidement quand on s'intéresse à des événements de spéciation anciens n'est pas optimale. La question d'utiliser des marqueurs mitochondriaux ou nucléaire se pose également, en raison de l'existence de copies multiples pour de nombreux marqueurs nucléaires (ce qui augmente les difficultés d'obtention de séquences nucléotidiques).

Dans le cadre de cette étude, on a utilisé le travail qui a été effectué au préalable sur les Bruchidae du genre *Caryedon* (Silvain & Delobel, 1998 ; Silvain com. pers.), ainsi que des données bibliographiques basées sur des études phylogénétiques récentes (par exemple : Simon *et al.*, 1994 ; Caterino *et al.*, 2000), pour définir un ensemble de gènes potentiellement informatifs pour notre échantillon taxonomique.

On s'est intéressé en particulier à cinq gènes mitochondriaux⁶⁸ et à deux gènes nucléaires⁶⁹. Les amplifications des séquences partielles des quatre gènes ont été effectuées par des réactions de « polymerase chain reaction » (PCR) classiques en utilisant les amorces figurées dans le Tableau 3.3. Après chaque PCR, la qualité des amplifiats est contrôlée à l'aide d'un gel d'agarose qui permet de sélectionner les produits de PCR qui seront purifiés par la suite.

Quatre marqueurs ont été utilisés préférentiellement⁷⁰ pour la majorité des analyses phylogénétiques : le 12S, le COI, le Cyt b et le 28S-D2.

Le 12S a été privilégié par rapport au 16S en raison de l'accès aux séquences de 12S pour le genre *Caryedon* (Silvain & Delobel, 1998).

Le COI a été quant à lui privilégié par rapport au COII en raison de son statut de « gène universel » qui est proposé par les tenants du « DNA barcoding » (Herbert *et al.*, 2003a, 2003b ; Stoeckle, 2003).

Enfin, le gène de l'ITS2 n'a pas été utilisé pour notre échantillon pour deux raisons : (i) évolution extrêmement rapide qui limite son utilisation pour résoudre des événements de spéciation anciens ; (ii) alignement problématique du fait de la présence de très nombreux indels.

⁶⁸ ARNr 12s (12S), ARNr 16s (16S) ; Cytochrome b (Cyt b), sous-unité I du cytochrome c oxydase (COI) et sous-unité II du cytochrome c oxydase (COII)

⁶⁹ domaine D2 de l'ADNr 28s (28S-D2) et région ITS2 de l'ADNr (ITS2)

⁷⁰ un compromis a dû être trouvé en raison de la taille de l'échantillon et du coût des analyses moléculaires

Tableau 3.3. Séquences des principales amorces utilisées

Gène	Amorce	Séquences	Sources
12S	SR-J-14233	5' - AAG AGC GAC GGG CGA TGT GT- 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
	SR-N-14588	5' - AAA CTA GGA TTA GAT ACC CTA TTA T - 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
16S	LR-J-12887	5' - CCG GTC TGA ACT CAG ATC AT - 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
	LR-N-13398	5' - CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT - 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
COI	C1-J-1751	5' - GGA TCA CCT GAT ATA GCA TTC CC - 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
	C1-N-2191	5' - CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC - 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
	TONYA	5' - GAA GTT TAT ATT TTA ATT TTA CCG GG - 3'	Monteiro & Pierce, 2001
	HOBBS	5' - AAA TGT TGN GGR AAA AAT GTT A - 3'	Monteiro & Pierce, 2001
COII	TL2-J-3037	5' - TAA TAT GGC AGA TTA GTG CAT TGG A - 3'	Gomez-Zurita <i>et al.</i> , 2000
	TK-N-3785	5' - GAG ACC ATT ACT TGC TTT CAG TCA TCT - 3'	Gomez-Zurita <i>et al.</i> , 2000
Cyt b	CP1	5' - GAT GAT GAA ATT TTG GAT C - 3'	Silvain, com. pers.
	CB-J-10933	5' - TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC - 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
	CB-N-11367	5' - ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT - 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
28S-D2	28S01	5' - GAC TAC CCC CTG AAT TTA AGC AT - 3'	Choong-Gon <i>et al.</i> , 2000
	28SR01	5' - GAC TCC TTG GTC CGT GTT TCA AG - 3'	Choong-Gon <i>et al.</i> , 2000
ITS2	ITS2-R	5' - ATA TGC TTA AAT TCA GCG GG - 3'	Navajas <i>et al.</i> , 1998
	ITS2-F	5' - GGG TCG ATG AAG AAC GCA GC - 3'	Navajas <i>et al.</i> , 1998

1.3.3. Purification et réaction de séquence

Les produits de PCR obtenus ont été purifiés à l'aide des kits de purification de la firme Quiagen (« Quiagen QUIAquick PCR purification kit »), en suivant le protocole standard (utilisation de microcentrifugeuses). A l'instar des kits d'extraction précédemment utilisés, ces kits utilisent une membrane de gel de silice, et ils fonctionnent suivant un principe similaire (cf. Fig. 3.3. page suivante).

Cette étape de purification permet de retirer les amorces, les nucléotides, les enzymes, les huiles minérales, les sels et autres impuretés des échantillons d'ADN. Un gel de contrôle (agarose, 2.1 %) est généralement effectué après la purification afin de vérifier la concentration de l'ADN qui sera utilisée ultérieurement lors de la réaction de séquence.

Après cette étape de purification, les deux brins complémentaires d'ADN sont séquencés à l'aide du kit de séquençage « Bigdye terminator » (Applied Biosystems) et d'un séquenceur automatique (ABI 373). Cette dernière étape implique au préalable un nouveau cycle de PCR spécifique⁷¹ (réaction de séquence) qui n'utilise qu'une seule des deux amorces qui ont servi à obtenir les produit de PCR.

Au final on obtient pour chaque individu séquencé les deux brins complémentaires qui correspondent aux deux amorces utilisées dans la réaction de séquence. Le programme MacClade 4.05 (Maddison & Maddison, 2002) est alors utilisé pour aligner les deux brins l'un par rapport à l'autre afin de générer une seule et même séquence qui servira pour les analyses phylogénétiques.

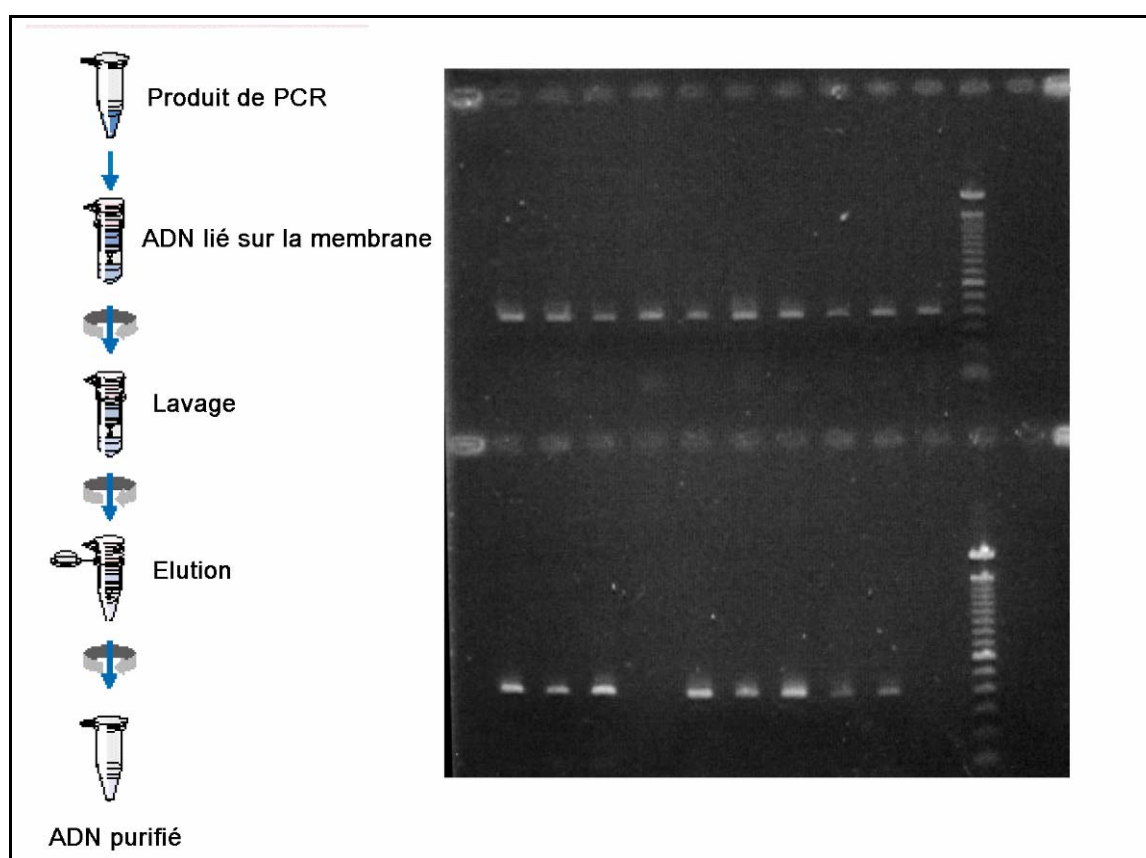


Figure 3.3. Figure illustrant le protocole suivi pour la purification des produits des PCR (à gauche). A droite est figuré un cliché de gel de contrôle de purification (gel d'agarose).

⁷¹ programme « Bigdye » qui comprend une phase de dénaturation initiale de 10 minutes à 96 °C puis 25 cycles de 5 secondes à 50 °C et 4 minutes à 60 °C

Section II. Traitement des données

2.1. Alignement des séquences

L'alignement des séquences codants pour des protéines (Cyt b et CO1) n'a pas nécessité d'indels (les séquences ont la même longueur), et ne présente aucune ambiguïté, en raison des contraintes liées au code génétique. Toutefois, pour les alignements des séquences partielles du 12S et du 28S-D2, l'insertion d'indels est nécessaire si l'on veut maximiser l'homologie des séquences étudiées. Cet alignement peut se faire à la main⁷², mais il est dans ce cas préférable de prendre en compte des modèles de structure secondaire existants (Buckley *et al.*, 2000 ; Page, 2000). Pour les séquence de 12S, il existe une interface sur internet⁷³ qui utilise le programme RNAlign (Corpet, 1994) et qui permet d'inférer un modèle de structure secondaire pour l'ARNr 12s. Il est alors possible d'identifier pour chaque séquence obtenue les tiges et les boucles qui caractérisent sa structure secondaire, ce qui en facilite l'alignement.

Une alternative possible à ces alignements manuels consiste à utiliser des programmes d'alignements automatiques. Dans cette étude le programme ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) a été utilisé majoritairement⁷⁴. Ce programme est en fait une interface fenêtrée du programme d'alignement de séquence multiple ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Ce programme permet d'assigner des schémas de pondération (« gap costs ») liés à l'introduction d'indels dans des alignements de séquences multiples. Il peut pondérer différemment l'insertion des indels en fonction de leur impact sur le nombre de transitions et de transversions, et il fixe un coût à l'insertion (« opening cost ») et à l'extension (« extension cost ») d'un indel. La stratégie d'alignement la moins complexe sous ClustalX consiste à utiliser les options par défaut du programme (transitions et transversions pondérées de façon identique, pénalité d'insertion d'un indel égale à 16, pénalité d'extension d'un indel égale à 6.66).

Une autre stratégie est celle suivie par Jordal *et al.* (2002) et Kergoat *et al.* (2004). Elle consiste à construire dans un premier temps une matrice d'élision (Wheeler *et al.*, 1995). Cette matrice correspond en fait à plusieurs jeux de données concaténés. Chaque jeu de données correspond à un alignement donné qui est produit par un schéma de pondération distinct (sous ClustalX). Cette matrice de données concaténées est alors analysée et l'on compare la (ou les) topologie obtenue avec la (ou les) topologie obtenue par les analyses séparées des différents jeux de données alignés sous ClustalX. Le jeu de données qui présente la (ou les) topologie la plus proche de celle obtenue par l'analyse de la matrice concaténée est alors retenu et sert de référence aux analyses phylogénétiques ultérieures.

Il est aussi possible de faire un alignement semi-automatique qui va s'appuyer dans un premier temps sur un alignement automatique (par exemple ClustalX avec les options par défaut), l'alignement des séquences étant secondairement corrigé à la main (en utilisant par exemple des données issues de modèles de structure secondaire).

⁷² à l'aide du programme MacClade 4.05 (qui fonctionne uniquement sous Mac OSX)

⁷³ <http://darwin.zoology.gla.ac.uk/cgi-bin/rna.pl>

⁷⁴ dans sa version PC (Windows)

2.2. Stratégie d'analyse

La figure 3.4. présente de façon synthétique la stratégie d'analyse qui a été suivie de façon générale pour les analyses phylogénétiques. Dans un premier temps se pose la question du traitement des jeux de données multiples. A ce niveau de l'analyse, il est intéressant d'estimer la congruence des données au moyen de tests ILD ou du calcul des indices de Bremer partitionnés. Après cette étape préliminaire, des analyses séparées ou combinées sont lancées, en utilisant une ou plusieurs méthodes d'inférence phylogénétique (cladistique, maximum de vraisemblance et/ou inférence bayésienne). Pour la méthode cladistique, une stratégie de pondération des données a priori est à envisager (voir Darlu & Tassy, 1993 ; Hillis *et al.*, 1994 ; Broughton *et al.*, 2000). Pour les méthodes probabilistes, il faut déterminer le (ou les) modèles d'évolution de séquences (ce qui implique le plus souvent l'utilisation de LRT). Après l'obtention de (ou des) l'arbre le plus parcimonieux (en parcimonie) et de l'arbre le plus vraisemblable (en maximum de vraisemblance).

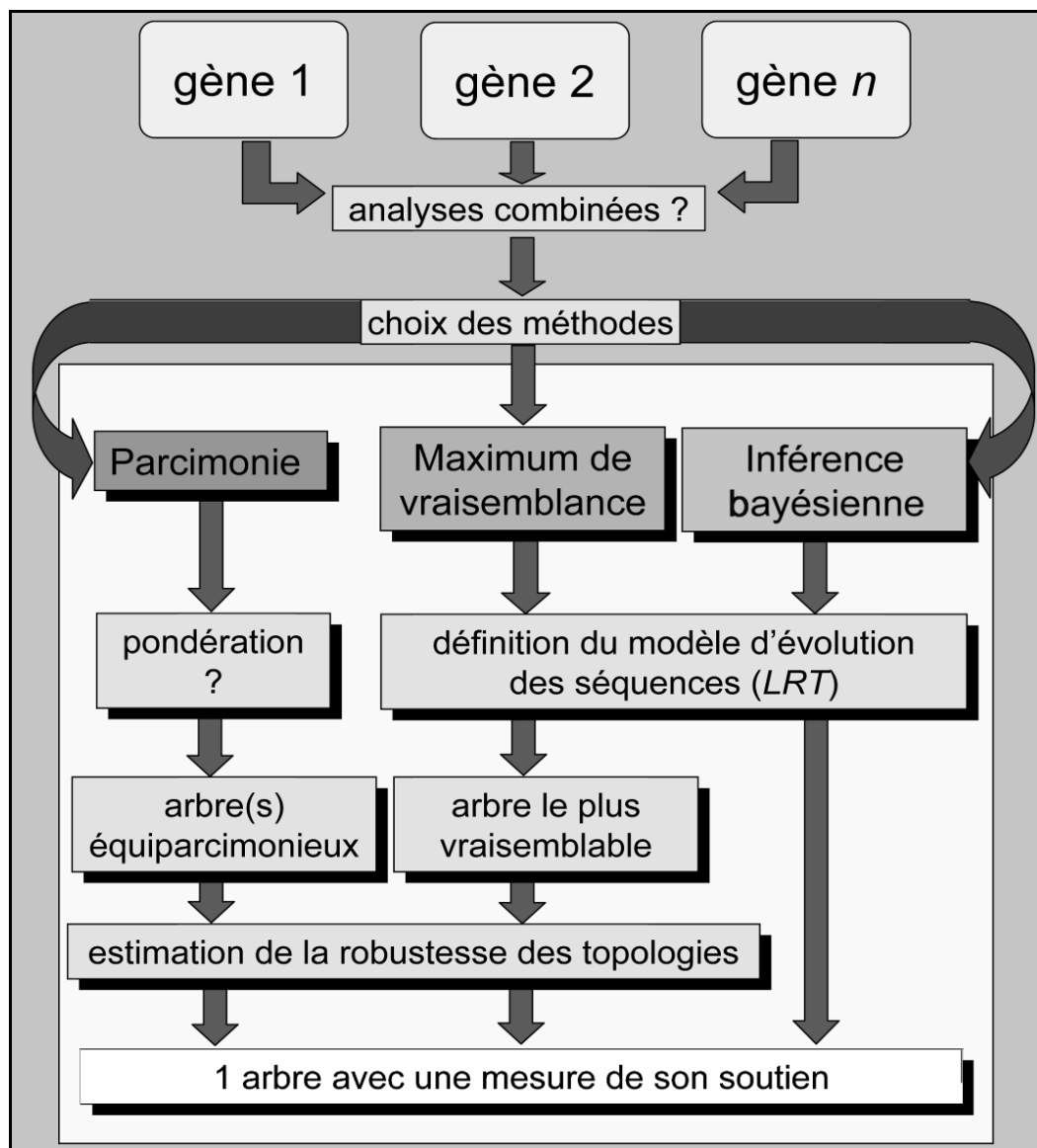


Figure 3.4. Figure illustrant la stratégie d'analyse qui a été généralement suivie en inférence phylogénétique.

2.3. Programmes utilisés

2.3.1. MacClade

MacClade version 4.05 (Maddison & Maddison, 2002) a été utilisé pour l'alignement des séquences et pour l'optimisation de l'évolution (parcimonieuse) des caractères sur les phylogénies obtenues (option « character tracing »).

2.3.1. PAUP*

La version macintosh (Mac OS9) du programme PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 1995, 2002) a été utilisée préférentiellement car elle intègre une interface fenêtrée qui facilite le paramétrage et le lancement d'analyses complexes (cf. Fig. 3.5.).

En parcimonie, ce programme offre de nombreuses fonctions avancées. Il permet l'utilisation de schémas de pondération complexes qui permettent de rendre compte de certaines spécificités des jeux de données. Cette pondération peut correspondre, par exemple, à une surpondération (a priori) des transversions par rapport aux transitions ou encore à une surpondération des premières et secondes positions des codons. PAUP* permet également de pondérer a posteriori certains caractères en fonction de leur degré d'homoplasie (qui est estimé par le calcul des indices de cohérences et de rétention).

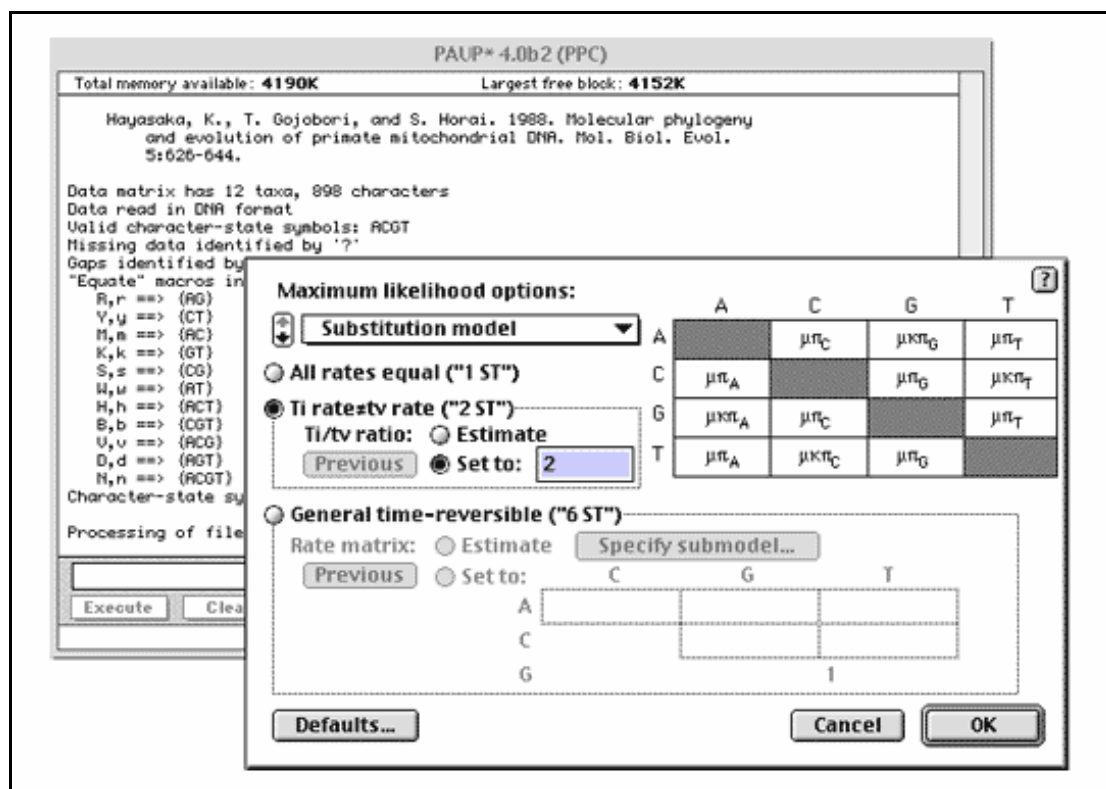


Figure 3.5. Capture d'écran illustrant le mode fenêtré de PAUP* version macintosh..

En maximum de vraisemblance, PAUP* intègre la plupart des modèles d'évolution de séquences, et il est à même d'estimer les paramètres de ces modèles d'évolution, ou de contraindre certaines valeurs de ces paramètres a priori. Il présente les désavantages suivants : (i) un temps de calcul important dès que l'on analyse une trentaine de taxons avec un modèle d'évolution complexe. Ce temps de calcul devient prohibitif quand il faut faire des bootstrap ou des recherches heuristiques avec de multiples réplicats. (ii) PAUP* ne permet pas de faire des analyses partitionnées en maximum de vraisemblance. PAUP* permet de lancer la quasi totalité des différentes recherches exhaustives et heuristiques existantes et il peut aussi calculer la plupart des estimateurs connus, et effectuer de nombreux tests statistiques qui sont utilisés couramment en inférence phylogénétique (par exemple : tests ILD, CI, RI, RCI, tests de χ^2 pour estimer l'homogénéité en composition des bases).

Par ailleurs, PAUP* a été utilisé conjointement avec les programmes suivants : (i) MODELTEST version 3.06 (Posada & Crandall 1998) pour le calcul des « likelihood ratio tests » ; (ii) TreeRot version 2.0 (Sorenson, 1999) pour le calcul des indices de Bremer partitionnés.

2.3.2. PHYML - PHYLIP

PHYML version 2.1 (Guindon & Gascuel, 2003) a été utilisé de façon complémentaire avec PAUP*, pour les analyses en maximum de vraisemblance. En effet, par l'utilisation d'un algorithme spécifique (Guindon & Gascuel, 2003) il permet de réaliser rapidement des analyses en maximum de vraisemblance pour un nombre important de taxons (avec des modèles d'évolution complexes). Cependant, il est moins complet que PAUP* pour ce qui est du paramétrage des analyses (moins de modèles évolutifs, pas de choix entre différentes méthodes de recherches heuristiques) et il n'intègre de procédure de « bootstrap » (non paramétrique). Pour faire un « bootstrap » sous PHYML, il est nécessaire de passer par le sous-programme SEQBOOT de la suite de logiciels PHYLIP (Felsenstein, 1989). Ce programme va générer des pseudo-réplicats (dans le format .phy qui est aussi celui de PHYML) que l'on va pouvoir importer sous PHYML pour obtenir l'estimation de la robustesse de l'arbre obtenu en maximum de vraisemblance.

2.3.3. MrBAYES

MrBayes version 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) a été utilisé pour toutes les analyses en inférence bayésienne. Ce programme fonctionne avec des fichiers en format nexus⁷⁵ modifiés et utilise des lignes de commandes. Il est néanmoins possible de simplifier le lancement d'analyses complexes en inférence bayésienne en modifiant directement le fichier de données (cad en intégrant les instructions des analyses après la matrice de données). MrBayes est un programme extrêmement complet, qui prend en compte les modèles d'évolution de séquences les plus récents. Comme PAUP*, MrBayes peut estimer les différents paramètres des modèles d'évolution utilisés ou contraindre certaines valeurs de ces paramètres a priori. La version 3.0b4 qui a été utilisée permet aussi de lancer des analyses partitionnées.

⁷⁵ ce format est aussi celui utilisé par PAUP*

Chapitre second : Résultats et discussion

Section I : Article.

« Phylogeny and host-specificity of European seed beetles (Coleoptera, Bruchidae) new insights from molecular and ecological data »

Kergoat, G.J., Delobel, A. & Silvain, J.-F. 2004.

Molecular Phylogenetics and Evolution 32: 855-865.

Cette étude s'est intéressée à un échantillon d'une trentaine d'espèces européennes⁷⁶ appartenant aux genres *Bruchidius* et *Bruchus*. Des séquences partielles de trois gènes mitochondriaux ont été obtenues afin de reconstruire la phylogénie de ces espèces étudiées, au moyen de différentes méthodes de reconstruction phylogénétiques (parcimonie, maximum de vraisemblance et d'inférence bayésienne).

En se basant sur ces reconstructions phylogénétiques, on s'est intéressé à la relation entre la phylogénie des bruches et leurs préférences d'hôtes, afin de dégager des patrons évolutifs potentiels⁷⁷. Ceci a été rendu possible par l'optimisation du caractère plante-hôte sur la phylogénie des insectes. En outre cette étude devait permettre de discuter de la systématique des Bruchidae (éventuelle paraphylie du genre *Bruchidius* et de la tribu des Acanthoscelidini) et de tester la validité de groupes taxonomiques existants (Borowiec, 1987a).

⁷⁶ cet échantillon a été défini au début de l'année 2003

⁷⁷ par exemple un conservatisme taxonomique dans les associations plantes-insectes, voir une congruence entre la phylogénie des plantes et celles des insectes

Phylogeny and host-specificity of European seed beetles (Coleoptera, Bruchidae), new insights from molecular and ecological data

Gaël J. Kergoat,^{a,*} Alex Delobel,^b and Jean-François Silvain^a

^a IRD, UR R072 c/o CNRS, UPR 9034, Laboratoire PGE, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

^b Antenne IRD, Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Systématique et Evolution, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France

Received 22 September 2003; revised 20 February 2004

Available online 2 April 2004

Abstract

We used partial sequences of three mitochondrial genes (12S rRNA, cytochrome *b*, and cytochrome *c* oxidase subunit I) to reconstruct the phylogeny of European seed beetles (Bruchidae) belonging to the genera *Bruchus* Linnaeus and *Bruchidius* Schilsky. Adult beetles examined in this study were obtained from larvae bred from seeds directly collected in the field. Parsimony, maximum likelihood, and Bayesian inference were used to infer phylogenetic relationships among species. Both genera, *Bruchidius* and *Bruchus*, formed monophyletic groups in all analyses. Our results were partially in discrepancy with existing taxonomic groups (Borowiec, 1987). Critical analysis of relationships among taxa, and exhaustive review of host-plants data highlight the very high level of specialization of these seed beetles. Phylogenetically related insects were associated with host-plants belonging to the same botanical tribes.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: 12S rRNA; Bayesian inference; Bruchidae; Cytochrome *c* oxidase subunit I; Cytochrome *b*; Host-specificity; Maximum likelihood; Parsimony; Phylogenetic inference; Taxonomy

1. Introduction

Complex interactions between phytophagous insects and their host-plants have given rise to numerous studies. Two clear patterns have emerged from these studies: (1) phytophagous clades are far more diversified than their non-phytophagous sister clades (Mitter et al., 1988), (2) phytophagous insects show a strong trend towards specialization and are associated with specific plant taxa and tissues (Marvaldi et al., 2002). Most studies deal with Lepidoptera and phytophagous Coleoptera (Chrysomeloidea and Curculionoidea), which represent the majority of phytophagous insect species (i.e., 135,000 species; Lawrence, 1982), and 141,000 species of Lepidoptera (Powell et al., 1999). The understanding of the mechanisms underlying these evolutionary patterns requires phylogenetic assumptions for many groups of phytophagous insects and the integra-

tion of all available ecological data. Ehrlich and Raven (1964) were the first to formulate an explanatory assumption based on the study of associations between Lepidoptera and their host-plants. For them, a coevolution process exists between phytophagous insects and their host-plants in the form of an arms race which stimulates, in a reciprocal way, the diversification of the two groups: the plants escape from the phytophagous insects by developing toxic secondary compounds, and the insects able to detoxify these compounds (evolutionary key-innovations) diversify on plants having similar secondary compounds. In some cases, the diversification of the insects can follow the radiation of their host-plants, and thus yields congruent phylogenies (Farrell and Mitter, 1990; Silvain and Delobel, 1998). Within the superfamily Chrysomeloidea, the family Bruchidae exhibits ecological characteristics that strengthen their usefulness in evolutionary studies. The larval stages of bruchids develop inside seeds. Often, mating occurs near the host plant seeds from which adults have emerged. Bruchids are generally oligophagous

* Corresponding author. Fax: +33-169-070-421.

E-mail address: kergoat@pge.cnrs-gif.fr (G.J. Kergoat).

Table 1
Material examined in this study

Genus	Locality ^a	Host-plant ^b (Family, Tribe) ^c	GenBank Accession No.		
Species			12S rRNA	COI	Cyt <i>b</i>
<i>Bruchidius</i>					
<i>biguttatus</i> (Olivier, 1795)	Gard (Fr.)	<i>Cistus albidus</i> (C)	AY390639	AY390671	AY390703
<i>bimaculatus</i> (Olivier, 1795)	Haute Corse (Fr.)	<i>Medicago marina</i> (F: Tri)	AY390640	AY390672	AY390704
<i>caninus</i> (Kraatz, 1869)	Haute Corse (Fr.)	<i>Astragalus hamosus</i> (F: Gal)	AY390641	AY390673	AY390705
<i>cinerascens</i> (Gyllenhal, 1833)	Essone (Fr.)	<i>Eryngium campestre</i> (Ap)	AY390642	AY390674	AY390706
<i>dispar</i> (Gyllenhal, 1833)	Rhône (Fr.)	<i>Trifolium medium</i> (F: Tri)	AY390643	AY390675	AY390707
<i>fulvicornis</i> (Motschulsky, 1874)	Corse du Sud (Fr.)	<i>Trifolium vesiculosum</i> (F: Tri)	AY390644	AY380676	AY390708
<i>lividimanus</i> (Gyllenhal, 1833)	Rhône (Fr.)	<i>Cytisus scorparius</i> (F: Gen)	AY390645	AY390677	AY390709
<i>marginalis</i> (Fabricius, 1776)	Gard (Fr.)	<i>Astragalus monspessulanus</i> (F: Gal)	AY390646	AY390678	AY390710
<i>nanus</i> (Germar, 1824)	Basilicata (It.)	<i>Medicago orbicularis</i> (F: Tri)	AY390647	AY390679	AY390711
<i>pauper</i> (Boheman, 1829)	Corse du Sud (Fr.)	<i>Ornithopus compressus</i> (F: Lot)	AY390648	AY390680	AY390712
<i>picipes</i> (Germar, 1824)	Corse du Sud (Fr.)	<i>Trifolium angustifolium</i> (F: Tri)	AY390649	AY390681	AY390713
<i>pusillus</i> (Germar, 1824)	Gard (Fr.)	<i>Hippocrepis emerus</i> (F: Lot)	AY390650	AY390682	AY390714
<i>pygmaeus</i> (Boheman, 1833)	Gard (Fr.)	<i>Trifolium angustifolium</i> (F: Trif)	AY390651	AY390683	AY390715
<i>seminarius</i> (Linnaeus, 1767)	Vaucluse (Fr.)	<i>Lotus maritimus</i> (F: Lot)	AY390652	AY390684	AY390716
<i>sericatus</i> (Germar, 1824)	Corse du Sud (Fr.)	<i>Trifolium angustifolium</i> (F: Trif)	AY390653	AY390685	AY390717
<i>trifolii</i> (Motschulsky, 1874)	Bahariya (Eg.)	<i>Trifolium alexandrinum</i> (F: Trif)	AY509806	AY509809	AY509812
<i>unicolor</i> (Olivier, 1795)	Vaucluse (Fr.)	<i>Onobrychis sativa</i> (F: Hed)	AY390654	AY390686	AY390718
<i>varipictus</i> (Motschulsky, 1874)	Haute Corse (Fr.)	<i>Medicago murex</i> (F: Tri)	AY390657	AY390689	AY390720
<i>villosus</i> (Fabricius, 1792)	Vaucluse (Fr.)	<i>Cytisophyllum sessilifolium</i> (F: Gen)	AY390655	AY390687	AY390719
<i>pr. varius</i> (Olivier, 1795)	Corse du Sud (Fr.)	<i>Trifolium angustifolium</i> (F: Tri)	AY390656	AY390688	
<i>Bruchus</i>					
<i>affinis</i> Frölich, 1799	Haute Corse (Fr.)	<i>Lathyrus latifolius</i> (F: Vic)	AY390658	AY390690	AY390721
<i>atomarius</i> (Linnaeus, 1761)	Vaucluse (Fr.)	<i>Lathyrus macrorhizus</i> (F: Vic)	AY390659	AY390691	AY390722
<i>brachialis</i> Fahraeus, 1839	Haute Corse (Fr.)	<i>Vicia villosa</i> (F: Vic)	AY390660	AY390692	AY390723
<i>laticollis</i> Boheman, 1833	Vaucluse (Fr.)	<i>Lathyrus aphaca</i> (F: Vic)	AY509807	AY509810	AY509813
<i>loti</i> Paykull, 1800	Oise (Fr.)	<i>Lathyrus pratensis</i> (F: Vic)	AY390661	AY390693	AY390724
<i>luteicornis</i> Illiger, 1794	Vaucluse (Fr.)	<i>Vicia sativa</i> (F: Vic)	AY390662	AY390694	AY390725
<i>rufimanus</i> Boheman, 1833	Vaucluse (Fr.)	<i>Vicia pannonica</i> (F: Vic)	AY390663	AY390695	AY390726
<i>rufipes</i> Herbst, 1783	Haute Corse (Fr.)	<i>Vicia sativa</i> (F: Vic)	AY390664	AY390696	AY390727
<i>tristiculus</i> Fahraeus, 1839	Vaucluse (Fr.)	<i>Lathyrus cicera</i> (F: Vic)	AY390666	AY390698	AY390729
<i>tristis</i> Boheman, 1833	Vaucluse (Fr.)	<i>Lathyrus cicera</i> (F: Vic)	AY390667	AY390699	AY390730
<i>viciae</i> Olivier, 1795	Basilicata (It.)	<i>Lathyrus sphaericus</i> (F: Vic)	AY509808	AY509811	AY509814
<i>Pachymerus</i>					
<i>cardo</i> (Fahraeus, 1839)	French Guyana	<i>Elais</i> sp. (Ar)	AY390636	AY390668	AY390700
<i>Paleoacanthoscelides</i>					
<i>gilvus</i> (Gyllenhal, 1839)	Vaucluse (Fr.)	<i>Onobrychis sativa</i> (F: Hed)	AY390638	AY390670	AY390702
<i>Spermophagus</i>					
sp.	Gard (Fr.)		AY390637	AY390669	AY390701

^a Egypt (Eg.) France (Fr.), Italy (It.).

^b We only figured the host-plant species from which the sequenced individual has been reared.

^c Host-plants systematic was abbreviated as follows: Ap (Apiaceae), Ar (Arecaceae), C (Cistaceae), F (Fabaceae), Gal (Galegeae), Gen (Genisteae), Hed (Hedysereae), Lot (Loteae), Tri (Trifolieae), and Vic (Vicieae).

(they feed on several species belonging to a single host family) or monophagous (they feed on a single species) (Borowiec, 1987). Most bruchid species use Fabaceae (Leguminosae) as host-plants (Johnson, 1981). This strong host-specificity has been correlated with the diversity of plant-defense mechanisms and particularly with the presence of toxic secondary compounds in seeds (Janzen, 1981). Bruchidae constitute a very good model for plant–insect interaction studies (Jermy and Szentesi, 2003; Johnson, 1981): seed sampling in the field and

monitoring of adult emergences give the opportunity to accurately identify insect–plant associations, and thus to highlight possible coevolutionary processes between insects and their hosts. Moreover, this group of beetles is of great interest as it contains several pest species of economic importance in both temperate and tropical areas, such as *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Bruchus pisorum* Linnaeus, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) or *Caryedon serratus* (Olivier). Thirty-one European species of *Bruchus* and *Bruchidius*, which belong to the

Bruchinae, one of the 6 subfamilies of Bruchidae, were studied. The genus *Bruchus* is morphologically well defined. Several characters distinguish it from other Bruchidae (Borowiec, 1987): (1) pronotum with lateral denticle, (2) unique structure of the mid tibia in male, and (3) male genitalia. In contrast, the genus *Bruchidius* has not been defined on the basis of synapomorphies. It artificially brings together a great number of Old World species. According to Johnson (1981), this genus is probably paraphyletic and should be divided into smaller monophyletic genera. *Bruchus* species are found in the Palearctic Region (with the exception of introduced species) and are essentially European (Borowiec, 1987). Regarding European species of *Bruchidius*, we have no evidence of their monophyly though they form an apparently homogeneous group compared to African species. Three outgroups have been chosen: another representative of the subfamily Bruchinae, *Paleoacanthoscelides gilvus* (Gyllenhal); a representative of the subfamily Amblycerinae, belonging to the genus *Spermophagus*; and *Pachymerus cardo* (Fahraeus), a representative of the primitive subfamily Pachymerinae. At the generic level, these beetles show little external morphological differentiation and characters on the male genitalia have not been studied in a phylogenetic perspective until now. Therefore molecular phylogenetics may be a way to obtain useful phylogenetic information. We used partial sequences of three mitochondrial genes to elucidate phylogenetic relationships among species. Our objective is to test the monophyly of the two genera, clarify the systematics of these species, and test the validity of several taxonomic groups established by Borowiec (1988). We also mapped host-plant preferences on phylogenetic trees in order to highlight evolutionary patterns between insects and host-plants. A critical review of French bruchid host-plants (Delobel and Delobel, 2003) will help us testing the assumption according to which insect species consuming phylogenetically close plants are related. We are also particularly interested in the phylogenetic position of species feeding

on plants outside the Fabaceae, in order to achieve a better understanding of host-shift mechanisms.

2. Materials and methods

2.1. Taxon sampling

Seeds were collected in the field on potential host-plants for three years (from 2000 to 2002). Table 1 indicates the species, localities, and host-plants of the species analysed. Although the *Bruchidius trifolii* specimen was collected in Egypt, we included it in this study because this species presents a circummediterranean distribution. Adults were obtained by rearing larvae infesting these seeds, with the exception of *Spermophagus* and *Pachymerus cardo* specimens. The latter was collected in 1997 in French Guyana. Adults were fixed and stored in 100% ethanol until used. For species identification, we mainly used male genitalia in association with several external morphological key-characters (Anton, 1998, 2001; Borowiec, 1988). Specimens corresponding to this study are kept in the IRD collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle (45 rue Buffon, Paris).

2.2. DNA extraction and polymerase chain reaction

DNA was extracted from whole individuals except for the Pachymerinae representative for which we only used antennae and hind legs. After grinding the samples in a PBS solution, we followed the protocol recommended by the Qiagen DNeasy tissue kit (Qiagen GmbH, Germany). Amplification of partial sequences of the three mitochondrial genes was accomplished by standard PCR amplification using primers listed in Table 2. For the amplification of the 3' half of 12S rRNA gene we used primers SR-J-14233 and SR-N-14588. Amplification of 1 kb gene region of the COI gene was accomplished by amplifying two overlapping

Table 2
Primers used in the amplification of 12S rRNA, COI, and Cyt *b*

Gene	Name of primer ^{a,b}	Sequence of primer	Max Length (bp) of sequenced product
12S rRNA	SR-J-14233 (f)	5'-AAGAGCGACGGGCGATGTGT-3'	401
	SR-N-14588 (r)	5'-AAACTAGGATTAGATACCCATTAT-3'	
COI	C1-J-1751 (f)	5'-GGATCACCTGATATAGCATTCCC-3'	1018
	C1-N-2191 (r)	5'-CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3'	
	Tonya (f)	5'-GAAGTTTATATTTTAATTTTACCGGG-3'	
	Hobbes (r)	5'-AAATGTTGNGGAAAAATGTTA-3'	
Cyt <i>b</i>	CP1 (f)	5'-GATGATGAAATTTTGGATC-3'	782
	CB-J-10933 (f)	5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3'	
	CB-N-11367 (r)	5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3'	

^a All the primers except Tonya, Hobbes (Monteiro and Pierce, 2001), and CP1 followed Simon et al. nomenclature (1994).

^b Forward reading (f), reverse reading (r).

fragments of about 500 bp using primer C1-J-1751 in combination with C1-N-2191 and primer Tonya in combination with Hobbes. For the amplification of fragment of the Cyt *b* gene we used primers CP1or CB-J-10933 in combination with CB-N-11367. Typical PCRs were prepared in 50 µl volumes using 2 U *Taq*-polymerase and 2 µl of genomic DNA at 2.5 mM MgCl₂ and 1 mM dNTP concentration. PCR cycling conditions started with an initial 5 min denaturing step at 92 °C

followed by 35 amplification cycles of 1 min denaturing at 92 °C, 30 s annealing at 52 °C, 1 min extension at 72 °C, and final extension step at 72 °C for 10 min. The cycling conditions for COI were the same but 40 amplification cycles were necessary with 1 min annealing at 47 °C. For Cyt *b* 37 cycles were used with 1 min 30 s annealing at 48 °C and 2 min extension at 72 °C. Reactions were then cooled to 4 °C until removal. PCR products were purified by using QIAquick PCR purification kit

Table 3
Base composition and sequence variation for 12S rRNA, COI, and Cyt *b*

Gene	A%	C%	G%	T%	Total sites	Variable sites	Informative sites	Mean/maximum pairwise sequence divergence (%)	
12S rRNA	39.87	14.10	9.13	36.89	406	128	85	7.58 ± 2.51	15.18
COI	29.15	16.47	16.57	37.78	1018	395	321	13.21 ± 2.48	19.60
1st Pos.	29.18	15.60	29.43	25.77	339	72	47		
2nd Pos.	16.07	23.95	16.48	43.49	339	23	6		
3rd Pos.	42.20	9.89	3.82	44.07	340	300	268		
Cyt <i>b</i>	30.28	17.32	13.69	38.69	782	349	263	14.38 ± 2.68	23.20
1st Pos.	28.83	17.60	23.44	30.12	260	79	47		
2nd Pos.	21.63	22.19	14.99	41.11	261	35	11		
3rd Pos.	40.67	12.19	2.17	44.96	261	235	205		

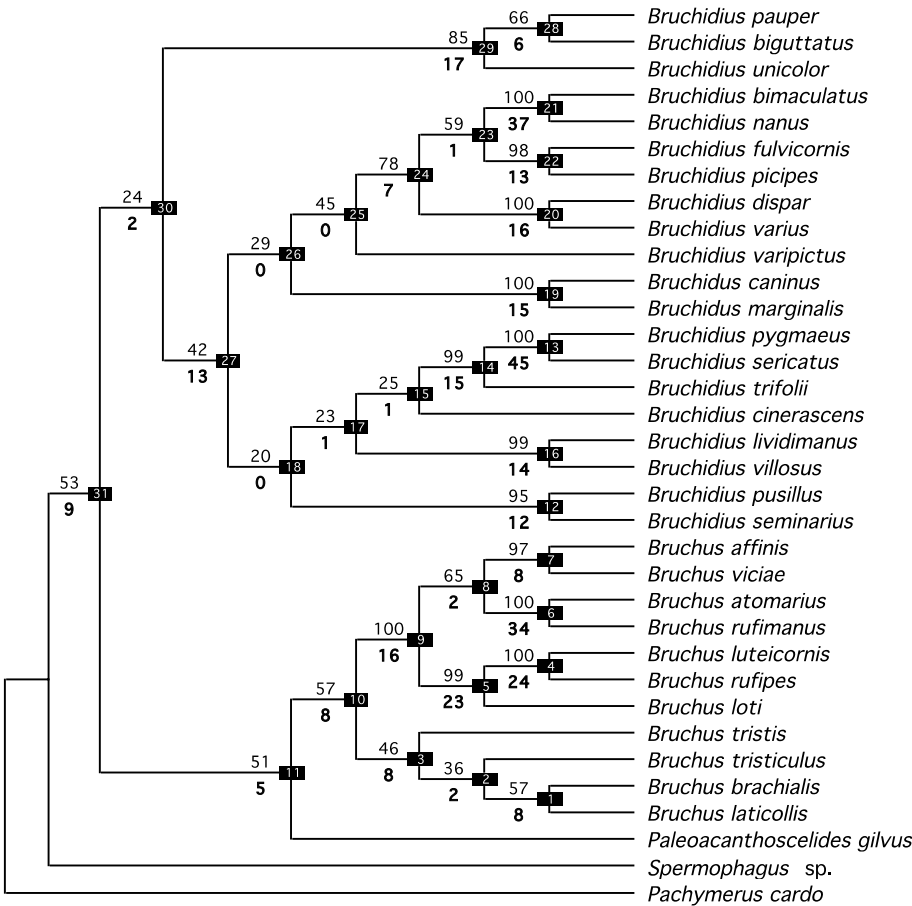


Fig. 1. Most parsimonious tree from the unweighted parsimony analysis of the combined data set. Numbers above branches are bootstrap support values and below are Bremer support values. Node numbers employed in Table 4 are labelled in black.

(Qiagen GmbH, Germany) and recovered in 40 µl elution buffer. Both strands of the PCR products were sequenced by the Sanger dideoxy method. Sequence data were obtained by analyzing samples on an ABI 373 Automated sequencer. We checked sense and antisense strands against each other. ClustalX (Thompson et al., 1997) was used for the 12S rRNA alignment under five different gap costs. Transitions and transversions were equally weighted, and with the exception of the default gap cost (opening cost 16, extension cost 6.66), we used the same cost for opening and extension gaps (2, 4, 8 or 16). In order to determine the 12S rRNA alignment for our analyses, we built an elision matrix (Wheeler et al., 1995) following Jordal et al. (2002). Afterwards, we retained the alignment yielding the most congruent consensus tree with the strict consensus tree from the elision matrix, i.e., the alignment corresponding to the default gap cost. Alignment of coding sequences (COI and Cyt *b*) was unambiguous and no gap event was detected. The sequences were all A + T biased, in agreement with previously published data on insect mitochondrial sequences (Clary and Wolstenholme, 1985; DeSalle et al., 1987). No significant base composition heterogeneity was detected between taxa for the 3 data sets (12S: $\chi^2 = 16.923739$, $df = 99$, $P = 1.000$; COI: $\chi^2 = 59.261822$, $df = 99$, $P = 0.99947552$; and Cyt *b*: $\chi^2 = 63.113383$, $df = 99$, $P = 0.99811916$). Table 3 summarizes the sequence variation observed in the three partial sequences obtained in this study. Of the 2206 nucleotide sites analysed, 39.52% were variable and about 30% were informative in parsimony analyses (this includes positions with gaps). For coding fragments, the majority of informative sites (80.99%) were located in third codon positions.

2.3. Phylogenetic analysis

Parsimony, maximum-likelihood (ML), and Bayesian inference (BI) were used to reconstruct phylogenetic relationships among taxa. Parsimony and ML analyses were performed using PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2002). Bayesian analyses were carried out by using MrBayes version 3.0b4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). We used both Power Mac G4 867 MHz and Pentium IV 1.7 GHz for our analyses. Preliminary analysis of sequence data were performed by unweighted parsimony analysis for all gene data sets separately. All analyses used *Pachymerus cardo* as outgroup species. Congruence between the three gene data sets were assessed by the incongruence length difference test (ILD) (Farris et al., 1994) implemented in PAUP* 4.0b10 as the partition homogeneity test. Invariant characters were excluded from the data sets for the ILD test following Cunningham (1997). In addition, partitioned Bremer support indices (Baker and DeSalle, 1997; Baker et al., 1998) were calculated with TreeRot (Sorenson, 1999) to estimate the contribution of each data partition

to nodal support. Modeltest 3.06 (Posada and Crandall, 1998) was used in order to determine the best-fit substitution model for the data under ML and BI through hierarchical likelihood ratio tests and the Akaike information criterion. Gaps constitute a valuable source of phylogenetic information (Giribet and Wheeler, 1999) and thus were treated as fifth character in the parsimony analyses, which were performed by using the heuristic search option with at least 100 random-addition replicates. Given the fact that transitions are more frequent than transversions, some authors have recommended to downweight transitions in parsimony analyses in order to minimize homoplasy (Hillis et al., 1994). Thus, we performed a weighted analysis of the combined data set in which transversions were weighted twice over transitions. Subsequently, we also performed two differential weightings of third codon positions (2:2:1 and 4:4:1) to minimize the effect of transitions that may accumulate at high frequency due to the degeneracy of the genetic code. Robustness of topologies was assessed by bootstrap procedures by using 100 replicates (full heuristic search) of 100 random-addition replicates each, for all analyses. Both likelihood ratio tests and Akaike

Table 4
Partitioned Bremer support indices for the three data partitions

Node	Cyt <i>b</i>	COI	12S rRNA	All
1	6.5	–3	4.5	8
2	2.5	–1	0.5	2
3	3.5	1	3.5	8
4	0	21	3	24
5	7	15.5	0.5	23
6	8.5	24.5	1	34
7	4	2	2	8
8	–6	4	4	2
9	4.8	7	4.2	16
10	11	–8	5	8
11	–1	3	3	5
12	2	5	5	12
13	13	26	6	45
14	0	12	3	15
15	0	3	–2	1
16	–11	13	12	14
17	–2	2	1	1
18	–3	1	2	0
19	4	6	5	15
20	–3	17	2	16
21	20	13	4	37
22	3	11	–1	13
23	0	–1	2	1
24	–2	6	3	7
25	–3	1	2	0
26	–3	1	2	0
27	4	3	6	13
28	10	0	–4	6
29	–6	12	11	17
30	1	0.5	0.5	2
31	3	1	5	9
Total	67.8 (18.72%)	198.5 (54.83%)	95.7 (26.43%)	362

information criterion selected the general time reversible model including the proportion of invariable sites and gamma distribution for rates variation among sites (GTR + I + Γ ; Gu et al., 1995; Lanave et al., 1984; Yang, 1994) as the best-fit model for ML and BI phylogenetic analyses of the combined data. This model does not account gaps, which are treated as missing data in ML and BI phylogenetic analyses. ML parameters were estimated by using the topology resulting from the unweighted parsimony analysis and several iterations were performed to optimize them, until we obtained a stable topology. Then ML analysis was performed using the heuristic search option under PAUP* with 10 random-addition replicates. Robustness of ML topology was assessed by a ML bootstrap analysis (100 replicates, full heuristic search, same parameters), which took about a week to perform. For the Bayesian analysis, we performed a 2,000,000 generations run by using the MCMC algorithm implemented in MrBayes with four incrementally heated chains and parameters estimated with a GTR + I + Γ model. A burn-in period of 20,000 gener-

ations was identified graphically by plotting likelihood values for each generation. The results were presented in the form of a 50% majority-rule consensus tree and the support for the nodes of the tree were given by posterior probabilities of clades (clade credibility values). Using the character tracing option (default settings) in MacClade 4.05, we mapped the host-plant preference on the phylogenetic tree from the ML analysis.

3. Results

According to the ILD test, partitions of the data into 12S rRNA, COI, and Cyt *b* were homogeneous ($P > 0.05$). Thus, we combined both data sets for the phylogenetic analyses shown in this study. Unweighted parsimony analysis of the combined data set yielded two optimal trees of 4039 steps (CI = 0.336; RI = 0.417; and RCI = 0.140). Weighted parsimony analyses of the combined data set produced single tree of 5754 steps for the analysis in which we weighted transversions

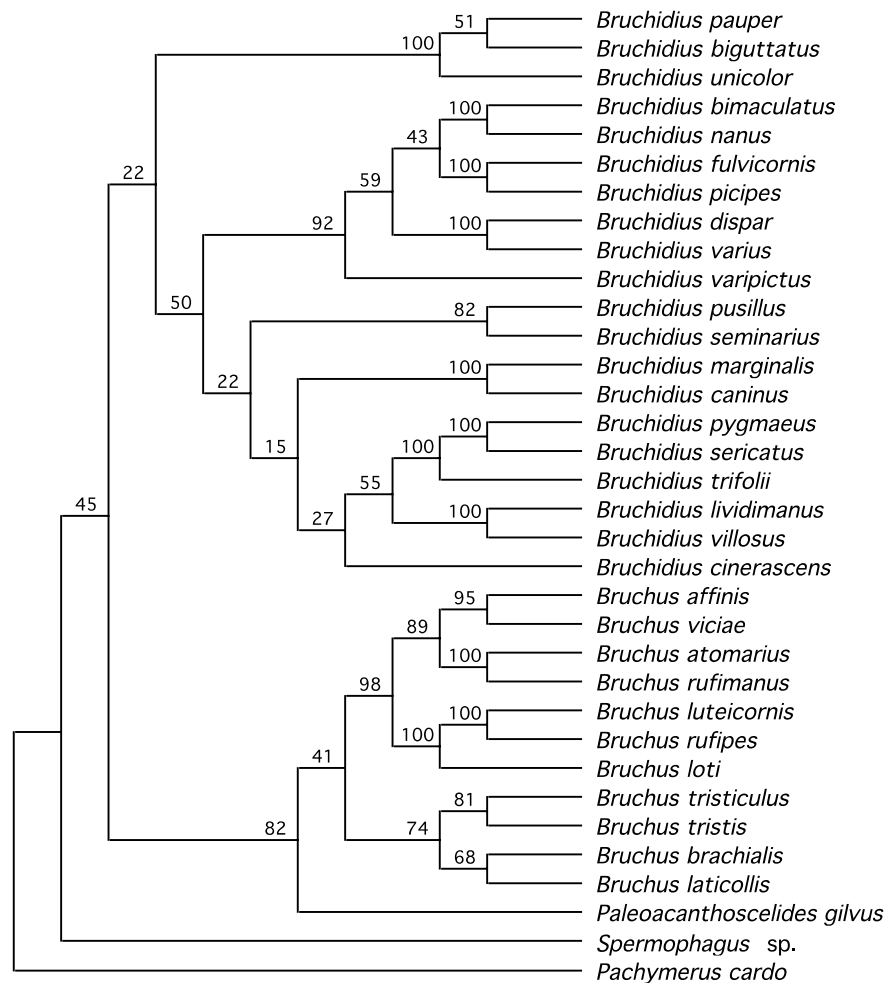


Fig. 2. Phylogenetic tree from the maximum likelihood analysis of the combined data set under the GTR + I + Γ model. Numbers above branches show the bootstrap support values.

twice over transitions (CI=0.283, RI=0.443, and RCI=0.142). As regards the analyses with third codon position downweighted, the first (with 2:2:1 weighting scheme) yielded a 5089 steps tree (CI=0.354, RI=0.441, and RCI=0.156) and the second (with 4:4:1 weighting scheme) produced a 7183 steps tree (CI=0.374, RI=0.468, and RCI=0.175). The proportion of replicates which yielded optimal trees was of 80% on average for weighted parsimony analyses and 54.3 and 29.5% for the two trees resulting from the unweighted parsimony analyses. Unweighted and weighted parsimony analyses gave essentially the same topologies and for the sake of simplicity, we only present the optimal phylogenetic tree corresponding to the unweighted parsimony analysis (Fig. 1). Partitioned Bremer support indices (Table 4) were calculated using this topology and for the three data partitions, these indices are largely positive and thus support the combined analysis strategy. 54.83% of overall the Bremer support was from COI data, 26.43 from 12S rRNA data, and 18.72% from Cyt *b* data. Monophyly of the genus *Bruchus* was

supported in all parsimony analyses (bootstrap values >50%, Bremer support 8) whereas monophyly of the genus *Bruchidius* was poorly supported not only by bootstrap values in both unweighted and weighted parsimony analyses (25% on average) but also by a low Bremer support (2), although all partitions had a positive contribution to this node (Table 4). On the contrary, the genus *Bruchus* shows conflict in support between the Cyt *b* and 12S partitions (11 and 5, respectively), and the COI partition (–8) (Table 4). Weighted parsimony analyses yielded slightly higher support for basal nodes. These relatively low values contrasted with the well-supported relationships observed within the *Bruchus* clade we analysed. For the *Bruchidius* species it appeared that several basal nodes were poorly supported by bootstrap and Bremer support values but overall relationships between *Bruchidius* were well resolved. ML (Fig. 2) and BI (Fig. 3) phylogenetic analyses resulted in similar topologies. For ML, nine of the ten replicates yielded trees of optimal likelihood value. Both ML and BI analyses recovered the monophyly of the two genera.

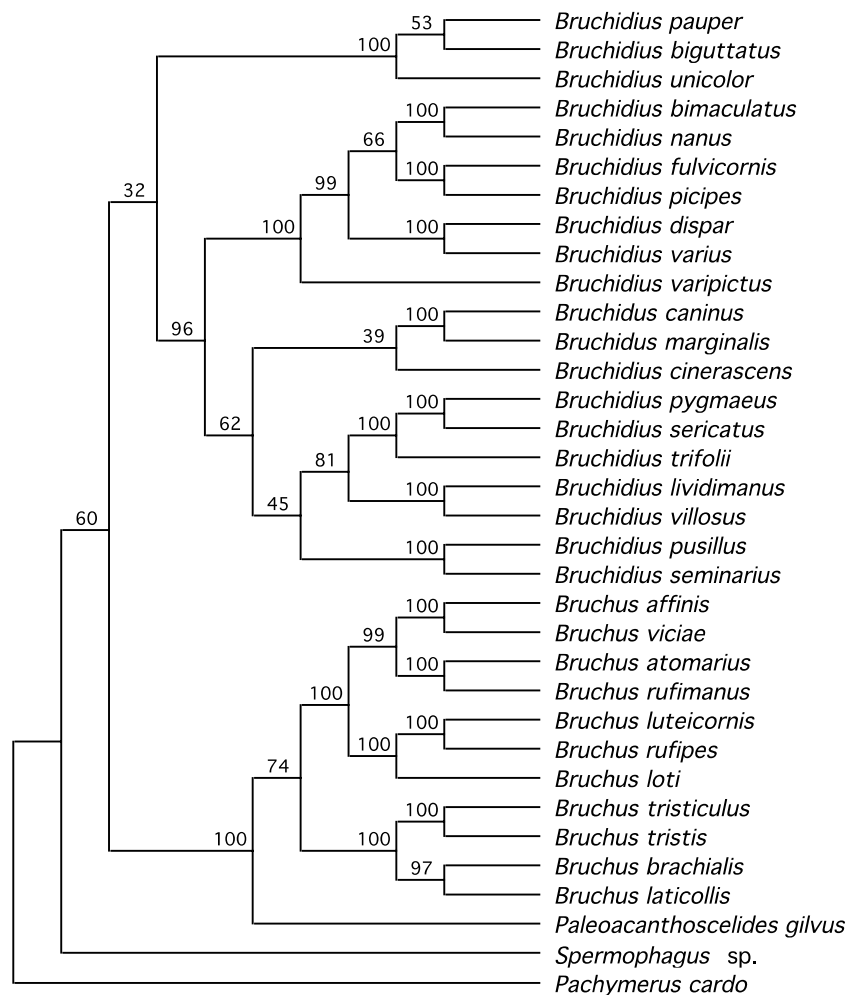


Fig. 3. Fifty percentage of majority-rule consensus tree from the Bayesian inference analysis of the combined data set under the GTR + I + Γ model. Numbers above branches show the posterior probability values.

The monophyly of *Bruchidius* was poorly supported by the bootstrap value (22%) and by the posterior probability (32%) in the BI analysis. Higher support was found for the monophyly of *Bruchus* bootstrap (41%) and posterior probability values (74%). Topologies obtained in the parsimony analyses were mostly congruent with the two topologies obtained from ML and BI analyses. Parsimony, ML, and BI recovered the same phylogenetic relationships for *Bruchus* species with the exception of *Bruchus tristriculus* and *Bruchus tristis*. These two species form a monophyletic group in all analyses except for the unweighted parsimony analysis. Several differences were observed in the *Bruchidius* topology between parsimony and ML/BI. The bootstrap support values (parsimony and ML) were low or moderate for most basal nodes but several internal nodes are well supported. By contrast, the overall level support of the BI topology was greater than bootstrap support of parsimony and ML analyses though we used the same model and parameters in BI and ML, as previously observed by Huelsenbeck et al. (2002) and Miller et al. (2002). Recent studies suggest that Bayesian posterior probabilities should overestimate phylogenetic support (Cummings et al., 2003; Douady et al., 2003; Suzuki et al., 2002). Caution must therefore be exerted when considering these values.

4. Discussion

All analyses support the monophyly of *Bruchus* and *Bruchidius* and figure *Paleoacanthoscelides gilvus* as the sister-group of the *Bruchus* group. Although these clades were moderately supported by bootstrap support values and Bremer indices nonetheless they were stable to parameter variation. This observation is consistent with a recent review (Giribet, 2003) showing evidence for nodal stability despite low nodal support. The phylogenetic relationship between the 11 *Bruchus* species in our sample is well resolved and presents essentially the same topology under all phylogenetic algorithms used. Relationships within the *Bruchidius* clade are mostly resolved but the position of *B. cinerascens* and that of the clade composed of *B. caninus* and *B. marginalis* remain unstable. Our results offer the opportunity to review existing taxonomic groups (Table 5) established by Borowiec (1988), primarily on the basis of external morphology. The monophyly of seven taxonomic groups (counting more than one species in our sample) recognized by Borowiec was supported by our analyses: the *affinis* group, the *atomarius* group, the *bimaculatus* group, the *brachialis* group, the *foveolatus* group, the *rufipes* group and the *tristis* group. Two groups appear as paraphyletic in our analyses: the *seminarius* group and the *varius* group. These discrepancies between our molecular based results and Borowiec hypotheses help

us reconsider some morphological characters used to define group boundaries. Species belonging to the *bimaculatus* and *varius* groups form a monophyletic clade in our analyses and are also well characterized by the particular shape of their male genitalia. So, the positioning of these species in two distinct groups apparently does not seem justified any longer. In the *seminarius* group, the shape of sclerites present in the median lobe (a structure of the male genitalia) seems to be a significant character distinguishing the two clades of this paraphyletic group. Consequently, this group could be separated into two distinct ones. Moreover, the study of some neglected morphological characters such as the shape of the urosternite (a structure of the *Bruchus* male genitalia) appears promising in view of some preliminary observations on our sample of *Bruchus* species. A critical analysis based on published data and field observations (Delobel and Delobel, 2003) enables us to define accurately the host-tribe or host-family (for non legume-feeders) of species included in this study. We mapped the hosts tribes and families on the phylogeny (Fig. 4) including new field observations (Delobel and Delobel, 2003) on the number and genera of host-plant species in order to make more precise their degree of specialization. As stated by Borowiec (1987), *Bruchus* species exhibit a significant level of specificity and are strictly associated with the tribe Viciae in the Fabaceae,

Table 5
Taxonomic groups present in our sample according to Borowiec (1987)

Genus	Group	Species
<i>Bruchidius</i>	<i>bimaculatus</i>	<i>bimaculatus</i>
		<i>nanus</i>
	<i>cinerascens</i>	<i>cinerascens</i>
		<i>pygmaeus</i>
		<i>sericatus</i>
	<i>foveolatus</i>	<i>trifolii</i>
		<i>pauper</i>
	<i>seminarius</i>	<i>lividimanus</i>
		<i>pusillus</i>
		<i>seminarius</i>
		<i>villosus</i>
		<i>unicolor</i>
		<i>dispar</i>
		<i>fulvicornis</i>
		<i>picipes</i>
		<i>pr. varius</i>
<i>Bruchus</i>	<i>affinis</i>	<i>affinis</i>
	<i>atomarius</i>	<i>viciae</i>
		<i>atomarius</i>
	<i>brachialis</i>	<i>rufimanus</i>
		<i>brachialis</i>
	<i>loti</i>	<i>laticollis</i>
		<i>loti</i>
<i>Bruchus</i>	<i>rufipes</i>	<i>luteicornis</i>
		<i>rufipes</i>
	<i>tristis</i>	<i>tristriculus</i>
		<i>tristis</i>

and all *Bruchus* species of our sample are equally associated with the genera *Lathyrus* and *Vicia*. For the *Bruchidius* species studied here it is difficult to distinguish a strong trend towards oligophagy (and even monophagy) or polyphagy. Yet the four most polyphagous species (*B. lividimanus*, *B. pusillus*, *B. seminarius*, and *B. villosus*) did not form a monophyletic group in our analyses. If we consider *Bruchidius* species, we notice that phylogenetically related insects feed on the same host-plant tribes, and in some cases of the same genus, especially in the case of the clade including the *bimaculatus* and *varius* groups. However, the insect–host plant pattern does not follow the host-plant phylogeny recently proposed by Wink and Mohamed (2003). Species of *Bruchidius* associated with Galegeae form a monophyletic group, and it is also the case of the two species associated with Genisteae. The most striking pattern apparent from Fig. 4 is the position of the Trifolieae feeders, which form two distinct monophyletic

groups. This implies two independent host-shifts towards Trifolieae. This assumption is consistent with observations on the male genitalia, that show two distinct types. A similar host-shift pattern is observed in species associated with the Loteae tribe (*B. pauper*, *B. pusillus*, and *B. seminarius*). The fact that *B. pauper* appears as a very specialized species and *B. pusillus* and *B. seminarius* as highly polyphagous species suggests that ancestry or driving evolutionary mechanism of each Loteae shift could have been different. The analysis of the position of *B. biguttatus* is interesting: this species is morphologically very close to *B. pauper* and *B. unicolor* but it develops on plants belonging to a botanical family (Cistaceae) not phylogenetically related to Fabaceae. It likely experienced a shift to Cisteaceae from a Papilionoideae ancestral host-plant. A similar pattern can be observed for *B. cinerascens* (associated with Apiaceae) although its phylogenetic relationships with the other *Bruchidius* species remain uncertain.

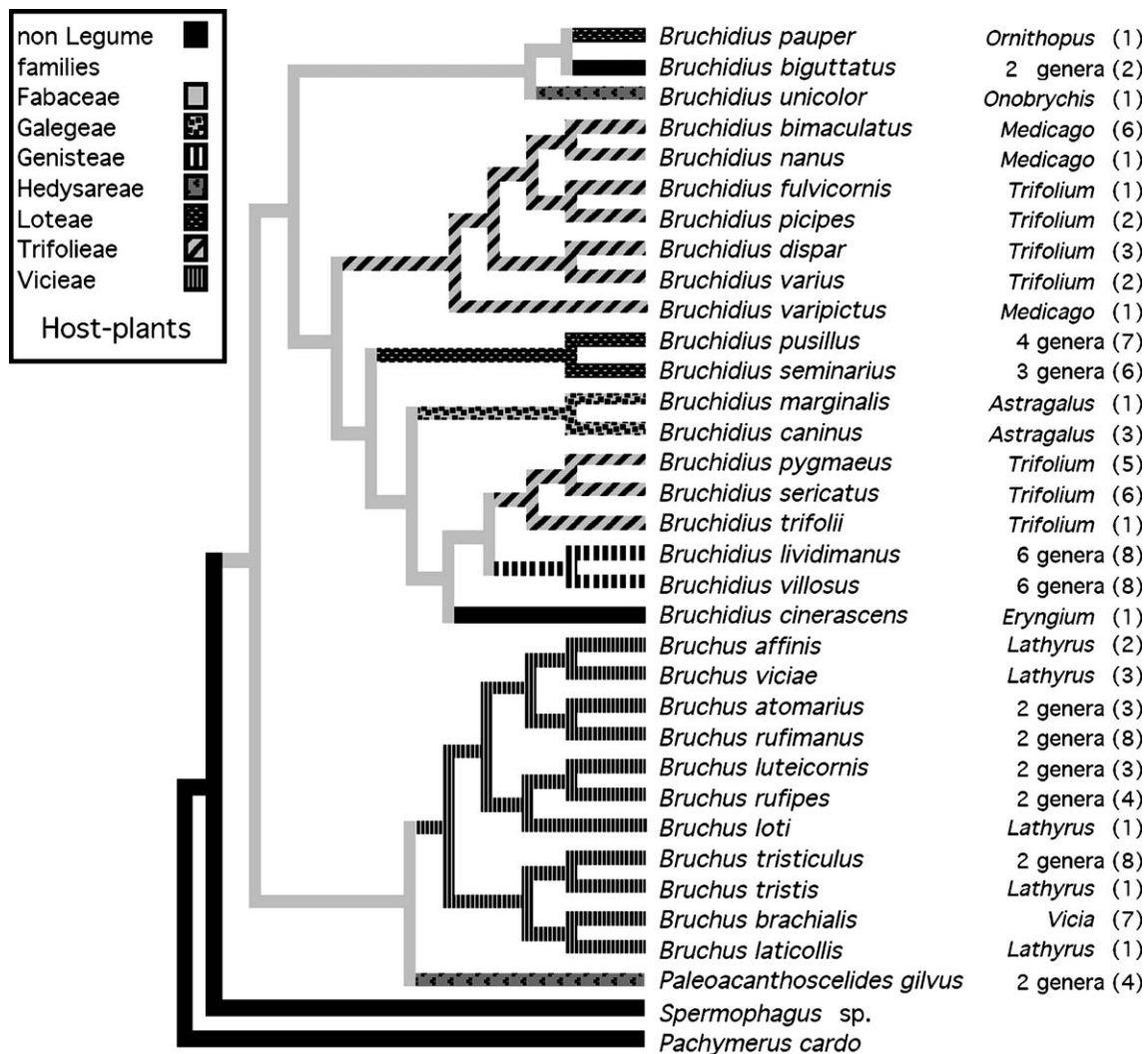


Fig. 4. Character tracing of host-plant families or tribes (for the family Fabaceae) on the phylogenetic tree from the maximum likelihood analysis. The host-plant genus or the number of host-plants genera (if the species feeds on different genera) is given for each bruchid species. The number of host-plants species for each bruchid species (see Delobel and Delobel, 2003 for details) is indicated in parentheses.

5. Conclusions

Our data provide the first well-supported phylogenetic hypothesis for a number of European bruchids and fill a gap emphasized by recent authors (Jermy and Szentesi, 2003). Topologies obtained support the monophyly of the genera *Bruchus* and *Bruchidius* with some reservations for the latter due to low nodal support, although the result is stable to parameter variation. The lack of resolution observed for some basal nodes may reflect an episode of rapid diversification among Bruchidae but this situation could also be explained by a lack of resolution at that level using our markers, or may be due to a sample bias. Our results indicate that phylogenetically related bruchids are generally associated with phylogenetically related host-plants of the same tribe. Nevertheless, we have no evidence of congruent phylogenies. Thus, it seems difficult to conclude on the exact nature of mechanisms which might explain the diversification of these insects. The inclusion of additional data on host-plant phylogeny and the nature of seed secondary compounds is a stimulating research perspective in the light of previous studies (Becerra, 1997; Farrell and Mitter, 1990; Silvain and Delobel, 1998; Termonia et al., 2001; Wahlberg, 2001; Wilf et al., 2000). Also, we should not neglect the contribution of morphological data to these studies, in particular those concerning the structure of the male genitalia which seems very informative. Understanding the evolution of the Bruchidae requires the integration of all possible data and well-founded phylogenetic hypotheses. This study should help us to shed new light on the evolution of plant–insect interactions.

Acknowledgments

We are indebted to G. Giribet, and two anonymous reviewers for helpful comments on the manuscript. We thank N. Berti (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France) for access to the Coleoptera collections of the Museum and B. Delobel (INRA, Villeurbanne, France) for the identification of botanical specimens. We are also grateful to G. Fédière (IRD, Cairo, Egypt) for the *Bruchidius trifolii* specimen and G. Couturier (IRD, Paris, France) for the *Pachymerus cardo* specimen.

References

- Anton, K.-W., 1998. Revision of the genus *Bruchidius*. Part I: the *B. seminarius* group (Coleoptera: Bruchidae). Stuttgart. Beitr. Naturkunde Ser. A 573, 1–13.
- Anton, K.-W., 2001. Bemerkungen zur Faunistik und Taxonomie mitteleuropäischer Samenkäfer (Coleoptera: Bruchidae). Folia Entomol. Hung. 62, 43–49.
- Baker, R.H., DeSalle, R., 1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of the Hawaiian drosophilids. Syst. Biol. 46, 645–673.
- Baker, R.H., Yu, X., DeSalle, R., 1998. Assessing the relative contribution of molecular and morphological characters in simultaneous analysis trees. Mol. Phylogenet. Evol. 9, 427–436.
- Becerra, J.X., 1997. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. Science 276, 253–256.
- Borowiec, L., 1987. The genera of seed-beetles (Coleoptera, Bruchidae). Polsk. Pismo Entomol. 57, 3–207.
- Borowiec, L., 1988. Bruchidae-Strakowce (Insecta: Coleoptera). Fauna Polski-Fauna Poloniae, Tom. 11. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- Clary, D.O., Wolstenholme, D.R., 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J. Mol. Evol. 22, 252–271.
- Cummings, M.P., Handley, S.A., Myers, D.S., Reed, D.L., Rokas, A., Winka, K., 2003. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. Syst. Biol. 52, 477–487.
- Cunningham, C.W., 1997. Can three incongruence tests predict when data should be combined? Mol. Biol. Evol. 14, 733–740.
- Delobel, A., Delobel, B., 2003. Les plantes hôtes des bruches de la faune de France, une analyse critique (Coleoptera Bruchidae). Bull. Soc. Linn. Lyon 72, 199–221.
- DeSalle, R., Freedman, T., Prager, E.M., Wilson, A.C., 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. J. Mol. Evol. 26, 157–164.
- Douady, C.J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W.F., Douzery, E.J.P., 2003. Comparison of Bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. Mol. Biol. Evol. 20, 248–254.
- Ehrlich, P.R., Raven, P.H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. Evolution 18, 586–608.
- Farrell, B.D., Mitter, C., 1990. Phylogenesis of insect/plant interactions: have *Phyllobrotica* leaf beetles (Chrysomelidae) and the Lamiales diversified in parallel? Evolution 44, 1389–1403.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. Cladistics 10, 315–319.
- Giribet, G., Wheeler, W.C., 1999. On gaps. Mol. Phylogenet. Evol. 13, 132–143.
- Giribet, G., 2003. Stability in phylogenetic formulations and its relationship to nodal support. Syst. Biol. 52, 554–564.
- Gu, X., Fu, Y.-X., Li, W.-H., 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. Mol. Biol. Evol. 12, 546–557.
- Hillis, D.M., Huelsenbeck, J.P., Cunningham, C.W., 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. Science 264, 671–677.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17, 754–755.
- Huelsenbeck, J.P., Miller, R.E., Ronquist, F., 2002. Potential applications and pitfalls of bayesian inference of phylogeny. Syst. Biol. 51, 673–688.
- Janzen, D.H., 1981. The defense of legumes against herbivores. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), Advances in Legume Systematics 2. The Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 951–977.
- Jermy, T., Szentesi, A., 2003. Evolutionary aspects of host plant specialisation—a study on bruchids (Coleoptera: Bruchidae). OIKOS 101, 196–204.
- Johnson, C.D., 1981. Seed beetle host specificity and the systematics of the Leguminosae. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), Advances in Legume Systematics 2. The Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 995–1027.
- Jordal, B.H., Normark, B.B., Farrell, B.D., Kirkendall, L.R., 2002. Extraordinary haplotype diversity in haplodiploid inbreeders: phylogenetics and evolution of the bark beetle genus *Coccotrypes*. Mol. Phylogenet. Evol. 23, 171–188.

- Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., Serio, G., 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20, 86–93.
- Lawrence, J.F., 1982. Coleoptera. In: Parker, S.P. (Ed.), *Synopsis and Classification of Living Organism*, vol. 2. MacGraw-Hill, New-York, pp. 482–553.
- Marvaldi, A.E., Sequeira, A.S., O'Brien, C.W., Farrell, B.D., 2002. Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionoidea): do niche shifts accompany diversification? *Syst. Biol.* 51, 761–785.
- Miller, R.E., Buckley, T.R., Manos, P.S., 2002. An examination of the monophyly of morning glory taxa using Bayesian phylogenetics inference. *Syst. Bot.* 51, 740–753.
- Mitter, C., Farrell, B.D., Wiegmann, B., 1988. The phylogenetic study of adaptive zones: has phytophagy promoted insect diversification? *Am. Nat.* 132, 107–128.
- Monteiro, A., Pierce, N.E., 2001. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and Ef-1 α gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 264–281.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Powell, J.A., Mitter, C., Farrell, B.D., 1999. Evolution of larval feeding preferences in Lepidoptera. In: Kristensen, P.N., (Ed.), *Lepidoptera, Moths and Butterflies*, vol. 1. Chapter 20, pp. 403–422.
- Silvain, J.-F., Delobel, A., 1998. Phylogeny of west African *Caryedon* (Coleoptera: Bruchidae): congruence between molecular and morphological data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9, 533–541.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651–702.
- Sorenson, M.D., 1999. Tree Rot. v2. Boston University, Boston.
- Suzuki, Y., Glazko, G.V., Nei, M., 2002. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16138–16143.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony *and Other Methods. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Termonia, A., Hsiao, T.H., Pasteels, J.M., Milinkovitch, M., 2001. Feeding specialization and host-derived chemical defense in chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3909–3914.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876–4882.
- Wahlberg, N., 2001. The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in Melitaeine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution* 55, 522–537.
- Wheeler, W.C., Gatesy, J., DeSalle, R., 1995. Elision: a method for accomodating multiple molecular sequence alignments with alignment-ambiguous sites. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4, 1–9.
- Wilf, P., Labandeira, C.C., Kress, W.J., Staines, C.L., Windsor, D.M., Allen, A.L., Johnson, K.R., 2000. Timing the radiation of leaf beetles: hispines on gingers from latest Cretaceous to recent. *Science* 289, 291–294.
- Wink, M., Mohamed, G.I.A., 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 897–917.
- Yang, Z., 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J. Mol. Evol.* 39, 105–111.

Section II : Article.

« Both host-plant phylogeny and chemistry have shaped the african seed-bettle radiation »

Kergoat, G.J., Delobel, A., Fédière, G., Le Rü, B. & Silvain, J.-F.

Molecular Phylogenetics and Evolution (accepté).

Cette étude repose sur un important travail de terrain qui a été conduit en Afrique pendant près de dix années. Les graines de plus de 300 espèces de plantes-hôtes potentielles ont été collectées afin d'obtenir par élevage des bruches. Des séquences de quatre gènes (12S, Cyt b, COI, 28S-D2) ont été obtenues pour plus de cinquante espèces (qui appartiennent majoritairement au genre *Bruchidius*). Les hypothèses phylogénétiques correspondantes ont été analysées à la lumière des informations sur la phylogénie des plantes-hôtes et la nature des composés secondaires toxiques des graines.

Au moyen d'optimisations de deux caractères⁷⁸ sur la phylogénie des insectes nous avons cherché à déterminer le niveau de conservatisme taxonomique dans l'utilisation des plantes-hôtes, ainsi que l'importance de la chimie des graines comme contrainte évolutive.

⁷⁸ nature des plantes-hôtes, et nature des composés secondaires toxiques des graines



Both host-plant phylogeny and chemistry have shaped the African seed-beetle radiation

Gaël J. Kergoat ^{a,b,*}, Alex Delobel ^b, Gilles Fédrière ^c,
Bruno Le Rü ^d, Jean-François Silvain ^a

^a IRD, UR R072 clo CNRS, UPR 9034, Lab. PGE, avenue de la Terrasse, 91198 Gif/Yvette, France

^b Antenne IRD, Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Systématique et Evolution, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France

^c IRD, UR R072, LEC-Faculty of Agriculture, Cairo University, P.O. Box 26, 12211 Giza, Egypt

^d IRD, UR R072, ICIPE, P.O. Box 30772, Nairobi, Kenya

Received 21 October 2004

Abstract

For the last 40 years, many authors have attempted to characterize the main patterns of plant–insect evolutionary interactions and understand their causes. In the present work on African seed-beetles (Coleoptera: Bruchidae), we have performed a 10-year field work to sample seeds of more than 300 species of potential host-plants (from the family Fabaceae), to obtain bruchids by rearing. This seed sampling in the field was followed by the monitoring of adult emergences which gave us the opportunity to identify host-plant use accurately. Then, by using molecular phylogenetics (on a combined data set of four genes), we have investigated the relationships between host-plant preferences and insect phylogeny. Our objectives were to investigate the level of taxonomic conservatism in host-plant fidelity and host-plant chemistry. Our results indicate that phylogenetically related insects are associated with phylogenetically related host-plants but the phylogeny of the latter cannot alone explain the observed patterns. Major host shifts from Papilionoideae to Mimosoideae subfamilies have happened twice independently suggesting that feeding specialization on a given host-plant group is not always a dead end in seed-beetles. If host-plant taxonomy and chemistry in legumes generally provide consistent data, it appears that the nature of the seed secondary compounds may be the major factor driving the diversification of a large clade specializing on the subfamily Mimosoideae in which host-plant taxonomy is not consistent with chemical similarity.

© Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Evolution; Host shift; Host specificity; Phytophagous insects; Plant secondary compounds; Seed-beetles

1. Introduction

Endopterygote insects and especially Lepidoptera and Coleoptera have experienced a great evolutionary success that several authors have linked to the phytophagous behavior of near all (Lepidoptera) or the majority (Coleoptera) of the species of these insect orders (Farrell, 1998; Mitter et al., 1988). Likely the use of Angiosperms as

feeding resources has facilitated the radiation of phytophagous Lepidoptera and Coleoptera (Farrell, 1998; Grimaldi, 1999). Thanks to PCR tune up, cheap sequencing facilities availability and improvement of tree building methods, an increasing number of comparisons between phytophagous insect and host-plant phylogenies have been performed during the last 15 years and have contributed to a better understanding of the evolution of plant–insect interactions. In addition to the classic Ehrlich and Raven's coevolutionary process (Berenbaum and Zangerl, 1998; Ehrlich and Raven, 1964; Farrell, 2001; Farrell and Mitter, 1998) which is debatable,

* Corresponding author. Fax: +33 169 070 421.

E-mail address: kergoat@pge.cnrs-gif.fr (G.J. Kergoat).

phylogenetic studies in several groups of phytophagous Coleoptera and Lepidoptera have suggested several evolutionary patterns: (i) parallel evolution when the phylogeny of host-plants strongly constrained host affiliation and its evolution (Farrell and Mitter, 1990); (ii) conservatism of host-use when host shifts only occurred between closely related plants (Funk et al., 1995; Futuyma and McCafferty, 1990); (iii) diversification constrained by ecological and geographical factors (Dobler and Farrell, 1999; Dobler et al., 1996; Gomez-Zurita et al., 2000; Mar-dulyn et al., 1997; Menken et al., 1992); and (iv) chemical specialization when the major factor is the nature of the plants secondary compounds (Becerra, 1997; Garin et al., 1999; Swigonova and Kjer, 2004; Termonia et al., 2001; Wahlberg, 2001). However, a combination of these evolutionary patterns are not exclusive from one another to describe the diversification of a given group, highlighting the complexity of plant–insect interactions through time (Becerra and Venable, 1999; Bucheli et al., 2002; Jordal et al., 2004; Kelley and Farrell, 1998; Köpf et al., 1998). Many of the published studies focused on Chrysomelidae, a species rich family of phytophagous Coleoptera that belongs to the Chrysomeloidea super-family that also includes the longhorn-beetles (family Cerambycidae) and the seed-beetles. For the latter recent changes in taxonomy and thus nomenclature seem to favor the use of the subfamily name Bruchinae rather than Bruchidae (C.D. Johnson, pers. comm.), but for convenience (e.g., when using nomenclature ranks below the family level) we have used Bruchidae in this study. Bruchids comprise about 1700 species in about 60 genera (Johnson, 1994; Southgate, 1979). Five years after Ehrlich and Raven's (1964) classic paper, Janzen (1969) was the first to discuss the concept of coevolution in seed-beetles. The study of the evolutionary patterns driving the evolution of this highly specialized phytophagous group of Coleoptera was further discussed (Bleiler et al., 1988; Center and Johnson, 1974; Janzen et al., 1977) and Johnson (1990) presented a review of the literature related to this subject. The latter author suggested for future research on bruchid-plant associations the use of studies of systematics in conjunction with rigorous ecological and biogeographical studies. The integration of strong phylogenetic hypotheses with reliable ecological data were retained by Silvain and Delobel (1998) in their study of West African *Caryedon* and more recently by Kergoat et al. (2004) for European bruchids. The latter suggested a clear relationship between cladogenesis and host-plant association but to a certain extent only. Indeed, host shifts between non-related host-plants (from different botanical families) have occurred several times in the evolutionary history of these bruchids.

We have used molecular phylogenetics and host chemistry to investigate the radiation of African seed-beetles. These insects are known as seed-beetles because their larvae develop strictly in seeds. According to

Johnson (1970), about 84% of their known host-plants (the use of host-plant refer to larvae feeding in seeds of the plants) belong to the family Fabaceae. Many species are pests of plants of economic importance and have become cosmopolitan (Johnson, 1981) whereas others are potentially important as natural enemies of invasive legumes such as *Acacia* spp. (Rohner and Ward, 1999; Van Tonder, 1985) or Scotch broom (Downey and Smith, 2000). We have focused on the large and probably paraphyletic (Johnson, 1981; Kergoat and Silvain, 2004) genus *Bruchidius* SCHILSKY. This genus is restricted to the Old World (Borowiec, 1987) and more than 250 species are known (Udayagiri and Wadhi, 1989). Since the systematic of this genus is still debated, we have chosen to include closely related genera (*Callosobruchus*, *Conicobruchus*, *Decellebruchus*, and *Tuberculobruchus*) in what is regarded as the group *Bruchidius* sensu lato, to have a better overall view. Interestingly, almost all known host-plants in the group *Bruchidius* sensu lato belong to the family Fabaceae but we have accurate records of host-plant use for at least two other botanical families (Delobel and Delobel, 2003). The evaluation of insect host-plant associations is a critical issue, as available literature usually includes many errors and unverified records (Ehrlich and Raven, 1964). According to Delobel and Delobel (2003), Jermy and Szentesi (2003), and Johnson et al. (2004), most published host records for bruchids are unreliable and literature must be used cautiously. Indeed, in earlier studies, host-plant data were frequently based on adult beetles collected on plants in nature. This emphasizes the necessity of performing extensive seed sampling in the field, and eventually monitoring adult emergences to identify host-plant associations accurately.

Regarding host-plant secondary compounds, the phytochemistry of the family Fabaceae is well documented (Bisby et al., 1994). Nitrogen-based defensive compounds (alkaloids, amino acids, cyanogenic glycosides, lectins, and proteinase inhibitors) are frequently encountered in legume seeds, and their role as an efficient defense against bruchids has been demonstrated (Birch et al., 1986; Gatehouse et al., 1990; Janzen et al., 1977; Janzen, 1981; Rosenthal, 1990). In their recent study, Wink and Mohamed (2003) have suggested a complex history of the Fabaceae chemical defense traits. For example, the observed distribution of some secondary compounds (e.g., the L-canavanine in subfamily Papilionoideae) implies many loss or gain events whereas other secondary compounds are restricted to phylogenetically related groups of taxa (e.g., the quinolizidine alkaloids in genistoids sensu lato). The repeated development of such potent chemical defense traits in the evolutionary history of the family Fabaceae has certainly influenced the evolution of the highly specialized family Bruchidae, constraining some of its members to develop key innovations (Berenbaum et al., 1996; Simpson, 1953)

allowing further shift toward well protected plants. However, until now, the influence of these secondary compounds on seed-beetles evolution has not been studied within a phylogenetic framework.

We have sequenced three mitochondrial genes (12S rRNA, cytochrome *b*, and cytochrome *c* oxidase subunit I) and a nuclear gene (D2 domain of the 28S rDNA) for 50 African bruchids species and two outgroups. The phylogenetic hypotheses obtained for the insects will subsequently be analyzed in view of existing host-plant relationships (based on published molecular phylogenetic trees) and host-plant chemistry. Thus we will investigate the level of taxonomic conservatism in host-plant fidelity, and host-plant chemistry, questioning the general assessment that host-plant taxonomy is generally consistent with chemical similarity.

2. Materials and methods

2.1. Taxon sampling

Several thousand seeds of potential host-plants (from the family Fabaceae) were collected to obtain bruchids by rearing. This extensive field work was conducted in Senegal (from 1994 to 1999), Egypt (from 2000 to 2003), and Kenya (from 2001 to 2003). The sampling in Senegal (from 95 localities) was particularly extensive, resulting in seeds from 96 potential host-plants (corresponding to 33 distinct genera). In Egypt, the seeds from 95 potential host-plants (corresponding to 49 distinct genera) were collected from 29 localities. In Kenya, the seeds from 50 potential host-plants (corresponding to 19 distinct genera) were collected from 49 localities. Seed samples were afterwards transferred to local laboratories. They were kept separately for several months at room temperature in aerated plastic bags or boxes, until emergence of adults. These were fixed and stored in 100% ethanol and transferred to France for identification and DNA extraction. Specimens corresponding to this study are kept in the “Institut de Recherche pour le Développement (IRD)” collection of the “Muséum National d’Histoire Naturelle (MNHN)” (45 rue Buffon, Paris). Slide preparations of male genitalia and external morphological key-characters were used for identification. Despite the availability of many types of African bruchids (from MNHN in France and J. Decelle collections), 17 species with unique male genitalia remain unidentified. The species analyzed, their countries of origin, the host-plant records and their systematics are listed in Table 1. For the *Acacia* species, we have followed Vassal’s (1972) subgeneric classification. When necessary, host-plant name records were updated using the ILDIS (International Legume Database and Information Services: www.ildis.org) database.

2.2. DNA sequencing and alignments

DNA was extracted, amplified, and sequenced with standard protocols described elsewhere (Kergoat et al., 2004). For the amplification of 28S-D2 rDNA gene the following primers were used: (i) 28S01 (5′-GAC TACCCCTGAATTTAAGCAT-3′); (ii) 28SR01 (5′-GACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG-3′). Alignment of coding sequences (COI and Cyt *b*) was unambiguous as no gap event was detected. Alignment of 12S rRNA and 28S-D2 rDNA genes were performed by using ClustalX (Thompson et al., 1997) with default settings. After alignment, the combined sequence data set was 2963 bp in length, with 899 parsimony-informative characters. The resulting sequences and Voucher information were deposited in GenBank under Accession Nos. AY390636, AY390668, AY390700, and AY625282–AY625477, and the combined sequence data set was deposited to Tree-Base under Accession No. SN1978-6644.

2.3. Phylogenetic analyses

Bayesian inference was used to reconstruct phylogenetic relationships among taxa with *Pachymerus cardo* and *Gibbobruchus* sp. used as outgroup species. Preliminary analyses using incongruence length difference tests (Farris et al., 1994) have indicated that our four gene data sets were not congruent. To better take the heterogeneity of our data into account, we have chosen to perform a partitioned Bayesian analysis (Nylander et al., 2004). This analysis was carried out by using MrBayes version 3.0b4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001), with four partitions defined (corresponding to the four genes sequenced). For each gene, the best-fit substitution model was determined by Modeltest 3.06 (Posada and Crandall, 1998) through hierarchical likelihood ratio tests. Afterwards, a 2,000,000 generations run with four incrementally heated chains and distinct parameters estimated for each partition was conducted. Trees were saved to a file every 100 generations. The results were presented in the form of a 50% majority-rule consensus tree and the support for the nodes of this tree were given by clade posterior probability estimates.

2.4. Host-plant phylogenies

Phylogenetic hypotheses for the whole family Fabaceae were provided by recent studies (Doyle et al., 1997; Käss and Wink, 1997; Miller and Bayer, 2001; Robinson and Harris, 2000; Wink and Mohamed, 2003). According to these reviews the following assumptions can be made: (i) the family Fabaceae, the subfamilies Mimosoideae and Papilionoideae constitute monophyletic groups; (ii) the subfamily Caesalpinioideae constitutes a paraphyletic group in which tribes Cercideae and Detarieae are basal; (iii) the clade constituted by the tribes

Table 1
Material examined in this study

Species	Host-plant species	Systematic ^a	Source ^b
<i>Bruchidius</i>			
<i>albopubens</i>	<i>Indigofera aspera</i>	Pap.: Ind.	1.
	<i>Indigofera parviflorum</i>	Pap.: Ind.	1.
	<i>Indigofera senegalensis</i>	Pap.: Ind.	1.
<i>auratopubens</i>	<i>Faidherbia albida</i>	Mim.: Ing.	1.
<i>aurivillii</i>	<i>Acacia tortilis</i>	Mim.: Ac. ¹	1, 2.
<i>cadei</i>	<i>Faidherbia albida</i>	Mim.: Ing.	1.
<i>campylacanthae</i>	<i>Acacia polyacantha</i>	Mim.: Ac. ²	1.
<i>chloroticus</i>	<i>Sesbania grandiflora</i>	Pap.: Rob.	1.
	<i>Sesbania keniensis</i>	Pap.: Rob.	2.
	<i>Sesbania leptocarpa</i>	Pap.: Rob.	1.
	<i>Sesbania pachycarpa</i>	Pap.: Rob.	1.
	<i>Sesbania quadrata</i>	Pap.: Rob.	2.
	<i>Sesbania rostrata</i>	Pap.: Rob.	1.
	<i>Sesbania sesban</i>	Pap.: Rob.	1.
<i>centromaculatus</i>	<i>Acacia farnesiana</i>	Mim.: Ac. ¹	3.
	<i>Acacia nilotica</i>	Mim.: Ac. ¹	1, 3.
	<i>Acacia sieberiana</i>	Mim.: Ac. ¹	1.
<i>dichrostachydis</i>	<i>Dichrostachys cinerea</i>	Mim.: Mim.	1.
<i>dialii</i>	<i>Dialium guineense</i>	Cae.: Cas.	1.
<i>elnaiensis</i>	<i>Acacia dolichocephala</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
<i>fulvus</i>	<i>Alhagi graecorum</i>	Pap.: Gal.	3.
<i>incarnatus</i>	<i>Vicia faba</i>	Pap.: Vic.	3.
<i>lineatopygus</i>	<i>Indigofera tinctoria</i>	Pap.: Ind.	1.
<i>niokolobaensis</i>	<i>Tephrosia bracteolata</i>	Pap.: Mil.	1.
<i>nodieri</i>	<i>Indigofera astragalina</i>	Pap.: Ind.	1.
	<i>Indigofera hirsuta</i>	Pap.: Ind.	1.
<i>pygidiopictus</i>	<i>Faidherbia albida</i>	Mim.: Ing.	1.
<i>quadrisignatus</i>	<i>Acacia ataxacantha</i>	Mim.: Ac. ²	2.
	<i>Acacia brevispica</i>	Mim.: Ac. ²	2.
<i>raddianae</i>	<i>Acacia ehrenbergiana</i>	Mim.: Ac. ¹	3.
	<i>Acacia seyal</i>	Mim.: Ac. ¹	3.
	<i>Acacia tortilis</i>	Mim.: Ac. ¹	1, 3.
<i>rubicundus</i>	<i>Acacia laeta</i>	Mim.: Ac. ²	2.
	<i>Acacia mellifera</i>	Mim.: Ac. ²	2.
	<i>Acacia polyacantha</i>	Mim.: Ac. ²	2.
	<i>Acacia thomasi</i>	Mim.: Ac. ²	2.
<i>saudicus</i>	<i>Acacia etbaica</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
	<i>Acacia reficiens</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
	<i>Acacia zanzibarica</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
<i>securiger</i>	<i>Dichrostachys cinerea</i>	Mim.: Mim.	1.
<i>submaculatus</i>	<i>Acacia ataxacantha</i>	Mim.: Ac. ²	1.
	<i>Acacia dudgeoni</i>	Mim.: Ac. ²	1.
	<i>Acacia macrostachya</i>	Mim.: Ac. ²	1.
	<i>Acacia polyacantha</i>	Mim.: Ac. ²	1.
	<i>Acacia senegal</i>	Mim.: Ac. ²	1.
<i>uberatus</i>	<i>Acacia nilotica</i>	Mim.: Ac. ¹	1, 3.
sp. KE01	<i>Faidherbia albida</i>	Mim.: Ing.	2.
sp. KE02	<i>Acacia brevispica</i>	Mim.: Ac. ²	2.
sp. KE03	<i>Acacia etbaica</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
sp. KE04	<i>Acacia etbaica</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
	<i>Acacia reficiens</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
sp. KE05	<i>Acacia nilotica</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
sp. KE06	<i>Acacia nilotica</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
sp. KE07	<i>Acacia oerfota</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
sp. KE08	<i>Acacia zanzibarica</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
sp. KE09	<i>Albizia grandibracteata</i>	Mim.: Ing.	2.
	<i>Albizia versicolor</i>	Mim.: Ing.	2.
sp. KE10	<i>Delonix elata</i>	Cae.: Cae.	2.
sp. KE11	<i>Indigofera arrecta</i>	Pap.: Ind.	2.
sp. KE12	<i>Indigofera arrecta</i>	Pap.: Ind.	2.

Table 1 (continued)

Species	Host-plant species	Systematic ^a	Source ^b
sp. KE14	<i>Desmodium velutinum</i>	Pap.: Des.	2.
sp. SE01	<i>Aeschynomene indica</i>	Pap.: Aes.	1.
	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Pap.: Aes.	1.
<i>Callosobruchus</i>			
<i>chinensis</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Pap.: Pha.	3.
<i>maculatus</i>	<i>Vigna radiata</i>	Pap.: Pha.	2.
	<i>Vigna unguiculata</i>	Pap.: Pha.	1.
<i>phaseoli</i>	<i>Lablab purpureus</i>	Pap.: Pha.	3.
<i>subinnotatus</i>	<i>Vigna subterranea</i>	Pap.: Pha.	1.
<i>Conicobruchus</i>			
<i>strangulatus</i>	<i>Crotalaria comosa</i>	Pap.: Cro.	1.
	<i>Crotalaria glaucoides</i>	Pap.: Cro.	1.
	<i>Crotalaria goreensis</i>	Pap.: Cro.	1.
	<i>Crotalaria perrottetii</i>	Pap.: Cro.	1.
	<i>Crotalaria podocarpa</i>	Pap.: Cro.	1.
<i>Decellebruchus</i>			
<i>atrolineatus</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Pap.: Pha.	1.
<i>Tuberculobruchus</i>			
<i>albizziarum</i>	<i>Albizia lebeck</i>	Mim.: Ing.	1.
<i>babaulti</i>	<i>Acacia amythethophylla</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
	<i>Acacia etbaica</i>	Mim.: Ac. ¹	2.
<i>natalensis</i>	<i>Acacia sieberiana</i>	Mim.: Ac. ¹	1.
<i>silaceus</i>	<i>Acacia ataxacantha</i>	Mim.: Ac. ²	1.
	<i>Acacia macrostachya</i>	Mim.: Ac. ²	2.
<i>sinaitus</i>	<i>Acacia tortilis</i>	Mim.: Ac. ¹	1, 3.
<i>subuniformis</i>	<i>Acacia ataxacantha</i>	Mim.: Ac. ²	2.
<i>Gibbobruchus</i>			
sp.		Cae.: Cer.	4.
<i>Pachymerus</i>			
<i>cardo</i>	<i>Elaeis guineense</i>	Arecaceae	4.

^a Host-plant systematic was abbreviated as follows: Cae. (Caesalpinioideae), Mim. (Mimosoideae), Pap. (Papilionoideae), Ac.¹ (Acaciae: *Acacia* subgenus *Acacia*), Ac.² (Acaciae: *Acacia* subgenus *Aculeiferum*), Aes. (Aeschynomeneae), Cae. (Caesalpinieae), Cas. (Cassieae), Cer. (Cercideae), Cro. (Crotalariae), Ind. (Indigoferae), Des. (Desmodieae), Ing. (Ingeae), Gal. (Galegeae), Mil. (Milletieae), Mim. (Mimoseae), Pha. (Phaseoleae), Rob. (Robinieae), and Vic. (Vicieae).

^b Source: 1., Senegal field data; 2., Kenya field data; 3., Egypt field data; and 4., French Guyana field data.

Cassieae and Caesalpinieae (belonging to the subfamily Caesalpinioideae) and the subfamily Mimosoideae is the sister-clade of the subfamily Papilionoideae; and (iv) the monogeneric tribe Acaciae (and therefore the genus *Acacia*) constitutes a paraphyletic group.

2.5. Character optimizations

The host-plant preferences and host-plant seed chemistry were mapped parsimoniously on the same phylogenetic tree by using the program MacClade 4.05 (Maddison and Maddison, 2002) with the ACCTRAN algorithm. Host-plant preference optimizations followed a two step process. First, character optimizations at the subfamily level (Caesalpinioideae, Mimosoideae, and Papilionoideae) were performed. Then, more accurate mapping of host-plant preferences were carried out below the subfamily level. These character optimizations were exclusively based upon host-plant affiliations

provided by our field data, to avoid erroneous host-plant records. Regarding the mapping of host-plant chemistry, we focused on recognized toxic seed secondary compounds (Bleiler et al., 1988; Center and Johnson, 1974; Evans et al., 1979; Gatehouse et al., 1990; Janzen et al., 1977). Then, character optimizations for five classes of secondary compounds (amines, alkaloids, non-proteic amino acids, isoflavonoids, and proteinase inhibitors) were performed. Corresponding data on seed secondary compounds were taken from the literature (Bell et al., 1978; Bisby et al., 1994; Di Martino-Ferrer and Ferrer, 1983; Evans et al., 1977; Gatehouse et al., 1980; Ignacimuthu et al., 2000; Pando et al., 2001; Seigler, 2003; Wink and Mohamed, 2003). We deliberately choose to simplify data relative to the non-proteic amino acids composition of seeds with albizzine (Bisby et al., 1994; Evans et al., 1977, 1979; Seigler, 2003). Indeed, several other non-proteic amino acids are associated with albizzine (e.g., *S*-carboxyethylcysteine, *S*-[β -carboxyisopropyl]-L-cysteine, α -amino- β -acetylaminopropionic acid, α -amino- β -oxalylaminopropionic acid, and free $\alpha\beta$ -diaminopropionic acid) with some variations. Consequently we choose to code this character as “albizzine and others” in our analyses. Regarding proteinase inhibitors, we have distinguished the following types of inhibitors (Pando et al., 2001): (i) Bowman-Birk inhibitors which inhibit both trypsin and chymotrypsin at independent reactive sites and are specific to the subfamily Papilionoideae; (ii) Kunitz inhibitors which have varied performances, inhibiting either trypsin or chymotrypsin or the two of them the Kunitz type inhibitors of *Delonix* spp. inhibit trypsin only (Pando et al., 2001), and are more widely distributed in Fabaceae.

3. Results

The partitioned Bayesian analysis of the combined data set was carried out with the same best-fit model of evolution that is the general time reversible model with a proportion of invariable sites and a gamma distribution (Gu et al., 1995; Lanave et al., 1984; Yang, 1994). After the 2,000,000 generations run, a burn-in period of 50,000 generations was identified, by plotting graphically likelihood values every 100 generations. The 500 trees corresponding to this burn-in period were subsequently not retained in the 50% majority-rule consensus tree shown in Fig. 1. The latter topology is well supported by the different clade posterior-probability estimates, and provides a clear picture of African *Bruchidius* sensu lato relationships. Moreover, it strongly assesses the supposed paraphyly of the genera *Bruchidius* sensu stricto and *Tuberculobruchus*. The various host-plant records (listed in Table 1) for the seed-beetles sampled in this study suggest a strong trend toward oligophagy and specialization. Not only most of the bruchids sampled in

this study feed on a small number of host-plants, but they also present a high level of specificity (e.g., species feeding on genus *Acacia* present a higher level of specialization as they only feed on a given subgenus). As indicated in Table 1, each of the seed-beetles studied exclusively feeds on plants belonging to a given botanical tribe. Due to this high level of host-plant specificity, the mapping of host-plant preferences was facilitated and the inclusion of polymorphous characters was not necessary. The character optimization of host chemistry was also trivial since each bruchid species was feeding on a set of host-plants with identical secondary compounds. Yet, one species, *Bruchidius quadrisignatus*, was feeding on host-plants presenting two of the secondary compounds retained in our analyses (amine and non-proteic amino acids). Both character optimizations (host preferences and host chemistry) are presented on a mirror image cladogram (Fig. 1). We have also performed parsimonious analyses of the data sets but they have resulted in poorly supported topologies (not figured), especially for basal nodes. Character optimizations of the corresponding topologies essentially yield similar conclusions to the ones obtained by using the topology resulting from the partitioned Bayesian analysis. Since the results of character optimizations are highly dependent on the robustness of the phylogenetic hypotheses available, we have not chosen to present them.

4. Discussion

4.1. Evolution of host-plant associations

Character mapping of host-plant preferences at the plant-subfamily level reveals a strong conservatism of host use and provides valuable information on the evolutionary history of host-plant associations. Thus, each of the seed-beetles studied exclusively feeds on a given subfamily, and phylogenetically related species are generally associated with plants belonging to the same subfamily. Our analyses also suggest that the subfamily Papilionoideae is the ancestral host-plant group of the African genus *Bruchidius* sensu lato. Given that non-African members of the genus *Bruchidius* sensu lato are associated with the subfamily Papilionoideae (with some exceptions for species feeding outside the family Fabaceae), our results indicate that the subfamily Papilionoideae could be the ancestral host-plant group of all *Bruchidius* sensu lato species. Two independent host shifts from Papilionoideae toward Mimosoideae have given rise to two subsequent and successful radiations on plants of that subfamily. Finally, two species (*Bruchidius dialii* and *Bruchidius* sp. KE10) have independently shifted toward the subfamily Caesalpinoideae, from distinct mimosoid feeder ancestors belonging to the same group. Despite a large sampling of seeds from 50

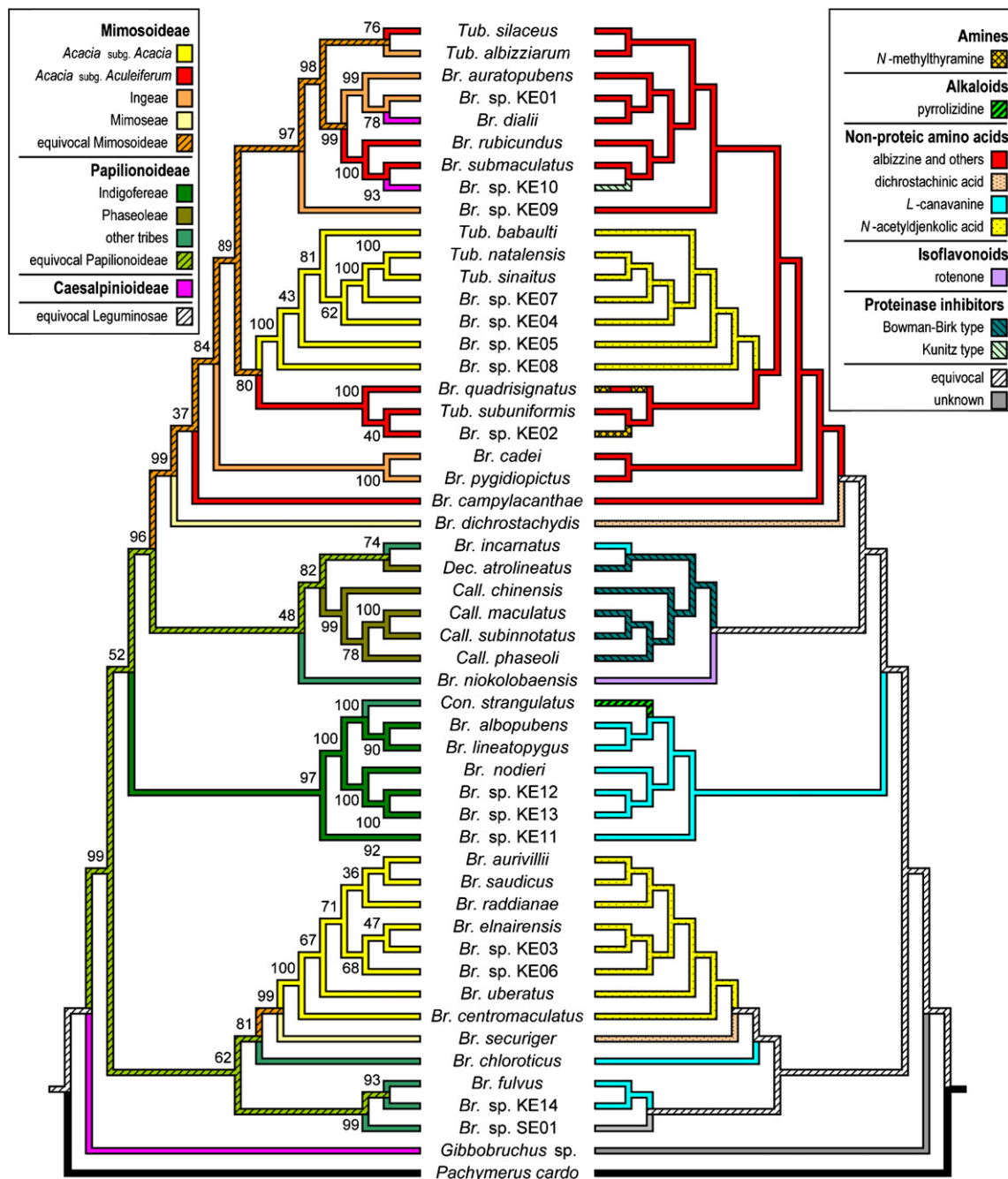


Fig. 1. Mirror image of the 50% majority-rule consensus tree from the partitioned Bayesian inference analysis of the combined data set; numbers indicate the clade posterior probability estimates for each node. On the left phylogram the parsimonious reconstruction of host-plant preferences at the subfamily level, and below the subfamily level are figured. On the right phylogram the parsimonious reconstruction of host-plant chemistry is figured. Detailed legends for both character optimizations are provided on the top of the figure.

Caesalpinoideae species (belonging to 18 distinct genera), we have only reared bruchids from two of these Caesalpinoideae species (*Dialium guineense* and *Delonix elata*). In contrast with the mimosoid feeders history, host shifts toward Caesalpinoideae appear isolated as they are not followed by a successful seed-beetle radiation on other host-plants of that subfamily. This assumption is consistent with our observations in the field and host-plant data from the literature

(Johnson, 1981), which seldom mention Caesalpinoideae as host-plants of *Bruchidius* seed-beetles (less than five *Bruchidius* species are known to feed on Caesalpinoideae). *Bruchidius* sensu lato offer a contrasted view of the evolutionary significance of feeding specialization in phytophagous insects (Janz et al., 2001; Kelley and Farrell, 1998; Nosil, 2002; Scheffer and Wiegmann, 2000; Termonia et al., 2001). The two independent host-shifts from Papilionoideae toward Mimosoideae show that

feeding specialization on papilionoid legumes did not hamper subsequent shifts to Mimosoideae, suggesting that feeding specialization, at least at the host-plant subfamilial level, is not always a dead end. On the contrary, shifts to Caesalpinioideae seem to have engaged the two species that experienced it in such a dead end. It is interesting to note that the hypothesis of a mimosoid origin of caesalpinoid feeders was previously suggested by Delobel et al. (2000) for seed-beetles belonging to the genus *Caryedon*. However, unlike *Bruchidius* species, the latter have undergone a successful radiation on several species of Caesalpinioideae.

The examination of host preference patterns below the subfamily level for species associated with the Papilionoideae strengthens the idea that host fidelity was a predominant factor in their evolutionary history. Thus, species associated with plants from the same tribe (Indigofereae or Phaseoleae in our study) are phylogenetically related, and this tallies with similar observations for European members of this genus (Kergoat et al., 2004). Nonetheless, for the mimosoid feeders, the observed host affiliation patterns for both tribes Ingeae and Acacieae suggest that host fidelity was lost at this level, with the exception of species associated with the subgenus *Acacia*.

Despite the strong conservatism in host-plant use revealed by the mapping of host preferences, the hypothesis of a possible co-speciation between African *Bruchidius* sensu lato and their host-plants is not supported by the comparison of their respective phylogenies. On the subfamily level, the two phylogenies are not congruent. Indeed, our analyses suggest that the subfamily Papilionoideae is the ancestral host-plant group of the African genus *Bruchidius* sensu lato and that caesalpinoid feeders came from ancestors feeding on Mimosoideae. On the contrary, phylogenetic hypotheses for the family Fabaceae indicate that the Mimosoideae and Papilionoideae both originate from the paraphyletic Caesalpinioideae group. Besides, when examining sister-clades of bruchids associated with distinct host-plant tribes, we found no evidence of a relation with plant phylogenies (e.g., species feeding on Indigofereae and Crotalariaeae tribes are related but the latter tribes are phylogenetically distant).

4.2. Influence of host-plant chemistry

According to Johnson (1990), “seed toxins are one of the most robust selective agents driving bruchids to specificity to their hosts.” Rotenone, for instance, is a complex isoflavonoid well-known for its strong insecticidal properties (Birch et al., 1985; Center and Johnson, 1974) and therefore very few bruchids do develop in seeds containing this compound (Gatehouse et al., 1990). Until now, only two *Bruchidius* sensu lato species (*Bruchidius nalandus* and *Bruchidius tephrosiae*) were known to feed

on *Tephrosia* spp. seeds (which contain rotenone). Similarly, only two bruchid species (*Conicobruchus indicus* and *Conicobruchus strangulatus*) are known to feed on *Crotalaria* spp. seeds (which contain crotalarine, a specific pyrrolizidine alkaloid). For some of these compounds, the mechanisms of detoxification are now better understood: (i) for instance, the adaptation to L-canavanine in many bruchid species have been intensively investigated (Bleiler et al., 1988; Rosenthal, 1990) and the corresponding detoxifying biochemical pathways are known; (ii) a recent study (Oliveira et al., 2002) on the activity of various proteinase inhibitors toward bruchids suggests that some bruchid species have circumvented their deleterious effect by using serine proteinases as major digestive enzymes (instead of using cysteine proteinases).

The examination of the secondary compound distribution within a phylogenetic framework (i.e., the bruchid phylogeny) provides significant information on the evolution of the African seed-beetles. The observed pattern shows a clear correlation between host-plant chemistry and the seed-beetle phylogeny and indicates that phylogenetically related bruchids generally feed on host-plants with similar defensive traits. However, since phylogenetically related host-plants often share similar chemical defensive traits, the influence of plant phylogeny cannot be denied. For instance, the L-canavanine non-proteic amino acid is present in the seeds of almost all studied species of the genus *Indigofera* (Bell et al., 1978; Bisby et al., 1994) and consequently both character optimizations of host preferences and host chemistry yield a similar pattern. It is also the case for the various species feeding on the tribe Phaseoleae which consistently contain Bowman-Birk type proteinase inhibitors. Interestingly, the mapping of host chemistry suggest either a widespread preadaptation to many toxic compounds or multiple independent apparitions of detoxifying abilities in the evolutionary history of African seed-beetles. It is particularly the case for several lineages of seed-beetles feeding on the tribe Papilionoideae which have the ability to detoxify the widespread L-canavanine non-proteic amino acid.

As emphasized previously, the most striking pattern in our analyses is observed in the largest clade of mimosoid feeders where host fidelity has been lost. In this group, the mapping of host preferences suggests that bruchid species associated with the subgenus *Aculeiferum* are more phylogenetically related to species feeding on the tribe Ingeae or on the subfamily Caesalpinioideae than the ones associated with the subgenus *Acacia* (with the exception of a clade of three species), although *Acacia* and *Aculeiferum* are sister clades. Indeed, this pattern of host affiliation is better explained by the nature of seeds secondary compounds. Species belonging to the subgenus *Acacia* consistently contain *N*-acetyldjenkolic acid, whereas species from subgenus *Aculeiferum* have

different non-proteic amino acids (Bisby et al., 1994; Evans et al., 1977, 1979; Seigler, 2003). These non-proteic amino acids (e.g., albizzine) also occur in the seeds of the studied species from the Ingeae tribe and in the caesalpinoid *Dialium guineense*. Therefore host chemistry appears to be the major factor explaining the diversification of this clade of mimosoid feeders.

5. Conclusions

This study casts a new light on the evolution of African seed-beetles and suggests a complex evolutionary history resulting from the combination of different evolutionary patterns. Despite the strong taxonomic conservatism of host fidelity exhibited by the species studied, host shifts toward plants from different botanical subfamilies have nonetheless occurred several times in bruchid evolutionary history. This result also suggests that feeding specialization on a given host-plant group is not always a dead end in seed-beetles. The originality of the present work is to provide counter-examples to the general rule of taxonomic conservatism in host-plant use. If most bruchid lineages have consistently diversified in agreement with that rule (the phylogenetic relationships of seed-beetles reflects host-plant taxonomy which in turn is consistent to chemical similarity), one clade of bruchid has followed a different pathway. This clade originally on Papilionoideae has subsequently shifted to Mimosoideae and diversified according to host-plant chemistry which does not match the plant taxonomy. This clearly shows that the key-factor driving diversification within this clade of seed-beetles was primarily plant chemistry and not plant taxonomy. As a result, it appears that the factors prevailing in the radiation of phytophagous insects may differ even within closely related lineages.

Acknowledgments

We are indebted to V. Savolainen and two anonymous reviewers for helpful comments on the manuscript. We are grateful to C.D. Johnson (Northern Arizona University, Flagstaff, USA) and D. Lachaise (CNRS, Gif/Yvette, France) for comments and corrections on the manuscript. We thank N. Berti (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France) for access to the Coleoptera collections of the Museum and the staff of the “Institut Fondamental d’Afrique Noire” (Dakar, Senegal) for the communication of specimens identified by J. Decelle. We are also grateful to the following collectors in Senegal: Y. Auger, B. Badji, C. Bass, D. Bauwens, H. Delobel, A. Faye, M.T. Gueye, A. Ndour, P. Danthu, M. Sembène, M. Tran, and all the ISRA/PF staff. We thank G. Couturier (IRD, Paris, France) for the *Gibbibruchus* sp. and *Pachymerus cardo* specimens.

References

- Becerra, J.X., 1997. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science* 276, 253–256.
- Becerra, J.X., Venable, D.L., 1999. Macroevolution of insect–plant associations: the relevance of host biogeography to host affiliation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12626–12631.
- Bell, E.A., Lackey, J.A., Polhill, R.M., 1978. Systematic significance of canavanine in the Papilionoideae (Fabaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 6, 201–212.
- Berenbaum, M.R., Favret, C., Schuler, M.A., 1996. On defining “key innovation” in an adaptive radiation: cytochrome P450S and Papilionidae. *Am. Nat.* 148, S139–S155.
- Berenbaum, M.R., Zangerl, A.R., 1998. Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13743–13748.
- Bleiler, J.A., Rosenthal, G.A., Janzen, D.H., 1988. Biochemical ecology of canavanine-eating seed predators. *Ecology* 69, 427–433.
- Birch, A.N.E., Crombie, L., Crombie, W.M., 1985. Rotenoids of *Lonchocarpus salvadorensis*: their effectiveness in protecting seeds against bruchid predation. *Phytochemistry* 24, 2881–2883.
- Birch, A.N.E., Fellows, L.E., Evans, S.V., Doherty, K., 1986. Para-aminophenylalanine in *Vigna*: possible taxonomic and ecological significance as a seed defence against bruchids. *Phytochemistry* 25, 2745–2749.
- Bisby, F.A., Buckingham, J., Harborne, J.B., 1994. *Phytochemical Dictionary of the Fabaceae*. vol. 1. Plants and their Constituents. Chapman and Hall, London.
- Borowiec, L., 1987. The genera of seed-beetles (Coleoptera, Bruchidae). *Polsk. Pismo Entomol.* 57, 3–207.
- Bucheli, S., Landry, J.-F., Wenzel, J., 2002. Larval case architecture and implications of host-plant associations for north american *Coleophora* (Lepidoptera: Coleophoridae). *Cladistics* 18, 71–93.
- Center, T.D., Johnson, C.D., 1974. Coevolution of some seed beetles (Coleoptera: Bruchidae) and their hosts. *Ecology* 55, 1096–1103.
- Delobel, A., Tran, M., Sembène, M., 2000. Influence du choix alimentaire sur la fécondité et le développement larvaire des *Caryedon* des Légumineuses (Coleoptera: Bruchidae) au Sénégal. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 36, 61–73.
- Delobel, A., Delobel, B., 2003. Les plantes hôtes des bruches de la faune de France, une analyse critique (Coleoptera Bruchidae). *Bull. Soc. Linn. Lyon* 72, 199–221.
- Di Martino-Ferrer, M., Ferrer, A., 1983. Trypsin inhibitor from bambara pea. *Phytochemistry* 22, 813–816.
- Dobler, S., Farrell, B.D., 1999. Host use evolution in *Chrysochus* milkweed beetles: evidence from behaviour, population genetics and phylogeny. *Mol. Ecol.* 8, 1297–1307.
- Dobler, S., Mardulyn, P., Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M., 1996. Host-plant switches and the evolution of chemical defense and life history in the leaf beetle genus *Oreina*. *Evolution* 50, 2373–2386.
- Downey, P.O., Smith, J.M.B., 2000. Demography of the invasive shrub scotch broom (*Cytisus scorpiarius*) at Barrington Tops, New South Wales: insights for management. *Aus. Ecol.* 25, 477–485.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., Ballenger, J.A., Dickson, E.E., Kajita, T., Ohashi, H., 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *RBCL* in the Fabaceae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *Am. J. Bot.* 84, 541–554.
- Ehrlich, P.R., Raven, P.H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18, 586–608.
- Evans, C.S., Qureshi, M.Y., Bell, E.A., 1977. Free amino acids in the seeds of *Acacia* species. *Phytochemistry* 16, 565–570.
- Evans, C.S., Bell, E.A., Johnson, E.S., 1979. N-methyltyramine, a biologically active amine in *Acacia* seeds. *Phytochemistry* 18, 2022–2023.
- Farrell, B.D., 1998. “Inordinate fondness” explained: why are there so many beetles? *Science* 281, 555–559.

- Farrell, B.D., 2001. Evolutionary assembly of the milkweed fauna: cytochrome oxidase I and the age of *Tetraopes* beetles. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 467–478.
- Farrell, B.D., Mitter, C., 1990. Phylogenesis of insect/plant interactions: have *Phyllobrotica* leaf beetles (Chrysomelidae) and the Lamiales diversified in parallel? *Evolution* 44, 1389–1403.
- Farrell, B.D., Mitter, C., 1998. The timing of insect/plant diversification: might *Tetraopes* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Asclepias* (Asclepiadaceae) have co-evolved? *Biol. J. Linn. Soc.* 63, 553–577.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315–319.
- Funk, D.J., Futuyma, D.J., Orti, G., Meyer, A., 1995. A history of host associations and evolutionary diversification for *Ophraella* (Coleoptera: Chrysomelidae): new evidence from mitochondrial DNA. *Evolution* 45, 1008–1017.
- Futuyma, D.J., McCafferty, S.S., 1990. Phylogeny and the evolution of host plant associations in the leaf beetle genus *Ophraella* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Evolution* 44, 1885–1913.
- Garin, C.F., Juan, C., Petitpierre, E., 1999. Mitochondrial DNA phylogeny and the evolution of host-plant use in Palearctic *Chrysolina* (Coleoptera, Chrysomelidae) leaf beetles. *J. Mol. Evol.* 48, 435–444.
- Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A., Boulter, D., 1980. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*). *Phytochemistry* 19, 751–756.
- Gatehouse, A.M.R., Minney, B.H., Dobie, P., Hilder, V., 1990. Biochemical resistance to bruchid attack in legume seed; investigation and exploitation. In: Fuji, K., Gatehouse, A.M.R., Johnson, C.D., Mitchel, R., Yoshida, T. (Eds.), *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution*. Kluwer Academics Publishers, New York, pp. 241–256.
- Gomez-Zurita, J., Juan, C., Petitpierre, E., 2000. The evolutionary history of the genus *Timarcha* (Coleoptera Chrysomelidae) inferred from mitochondrial COII gene and partial 16S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 14, 304–317.
- Grimaldi, D., 1999. The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. *Ann. Missouri Bot. Garden* 86, 373–406.
- Gu, X., Fu, Y.-X., Li, W.-H., 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Mol. Biol. Evol.* 12, 546–557.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Ignacimuthu, S., Janarthanan, S., Balachandran, B., 2000. Chemical basis of resistance in pulses to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stor. Prod. Res.* 36, 89–99.
- Janz, N., Nyblom, K., Nylin, S., 2001. Evolutionary dynamics of host-plant specialization: a case study of the tribe Nymphalini. *Evolution* 55, 783–796.
- Janzen, D.H., 1969. Seed-eaters versus seed size, number, toxicity, and dispersal. *Evolution* 23, 1–27.
- Janzen, D.H., 1981. The defense of legumes against herbivores. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics 2*. The Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 951–977.
- Janzen, D.H., Juster, H.B., Bell, E.A., 1977. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Phytochemistry* 16, 223–227.
- Jermý, T., Szentesi, A., 2003. Evolutionary aspects of host plant specialisation—a study on bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *OIKOS* 101, 196–204.
- Johnson, C.D., 1970. Biosystematics of the Arizona, California, and Oregon species of the seed beetle genus *Acanthoscelides* Schilsky (Coleoptera: Bruchidae). *Univ. Calif. Publ. Entomol.* 59, 1–116.
- Johnson, C.D., 1981. Seed beetle host specificity and the systematics of the Fabaceae. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics 2*. The Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 995–1027.
- Johnson, C.D., 1990. Coevolution of Bruchidae and their hosts: evidence, conjecture, and conclusions. In: Fuji, K., Gatehouse, A.M.R., Johnson, C.D., Mitchel, R., Yoshida, T. (Eds.), *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution*. Kluwer Academics Publishers, New York, pp. 181–188.
- Johnson, C.D., 1994. The enigma of the relationships between seeds, seed beetles, elephants, cattle and other organisms. *Aridus* 6, 1–4.
- Johnson, C.D., Southgate, B.J., Delobel, A., 2004. A revision of the Caryedontini (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae) of Africa and the Middle East. *Mem. Am. Entomol. Soc.* 44, 1–120.
- Jordal, B.H., Kirkendall, L.R., Harkstad, K., 2004. Phylogeny of a Macaronesian radiation: host-plant use and possible cryptic speciation in *Liparthrum* bark beetles. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 554–571.
- Käss, E., Wink, M., 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Fabaceae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS 1 and 2). *Mol. Phylogenet. Evol.* 8, 65–88.
- Kelley, S.T., Farrell, B.D., 1998. Is specialization a dead end? The phylogeny of host use in *Dendroctonus* bark beetles (Scolytidae). *Evolution* 52, 1731–1743.
- Kergoat, G.J., Delobel, A., Silvain, J.-F., 2004. Phylogeny and host-specificity of European seed beetles (Coleoptera, Bruchidae), new insights from molecular and ecological data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 855–865.
- Kergoat, G.J., Silvain, J.-F., 2004. Le genre *Bruchidius* (Coleoptera: Bruchidae) est-il monophylétique? Apports des méthodes de parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne. *Biosystema* 22, 113–125.
- Köpf, A., Rank, N.E., Roininen, H., Julkunen-Tiitto, R., Pasteels, J.M., Tahvanainen, J., 1998. The evolution of host-plant use and sequestration in the leaf beetle genus *Phratora* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Evolution* 52, 517–528.
- Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., Serio, G., 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20, 86–93.
- Maddison, D.R., Maddison, W.P., 2002. *MacClade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Mardulyn, P., Milinkovitch, M.C., Pasteels, J.M., 1997. Phylogenetic analyses of DNA and allozyme data suggest that *Goniocotena* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) experienced convergent evolution in their history of host-plant family shift. *Syst. Biol.* 46, 722–747.
- Menken, S.B.J., Herrebout, W.M., Wiebes, J.T., 1992. Small Ermine moths (Yponomeuta): their host relations and evolution. *Ann. Rev. Entomol.* 37, 41–66.
- Miller, J.T., Bayer, R.J., 2001. Molecular phylogenetics of *Acacia* (Fabaceae: Mimosoideae) based on the chloroplast *MatK* coding sequence and flanking *TrnK* intron spacer regions. *Am. J. Bot.* 88, 697–705.
- Mitter, C., Farrell, B.D., Wiegmann, B., 1988. The phylogenetic study of adaptive zones: has phytophagy promoted insect diversification? *Am. Nat.* 132, 107–128.
- Nosil, P., 2002. Transition rates between specialization and generalization in phytophagous insects. *Evolution* 56, 1701–1706.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., Nieves-Aldrey, J.L., 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Syst. Biol.* 53, 47–67.
- Oliveira, A.S., Pereira, R.A., Lima, L.M., Morais, A.H.A., Melo, F.R., Franco, O.L., Bloch, C., Grossi-de-Sa, M.F., Sales, M.P., 2002. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the Algaroba tree (*Prosopis juliflora* D.C.). *Pest. Biochem. Phys.* 72, 122–132.
- Pando, S.C., Oliva, M.L.V., Sampaio, C.A.M., Di Ciero, L., Novello, J.C., Marangoni, S., 2001. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry* 57, 625–631.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.

- Robinson, J., Harris, S.A., 2000. A plastid DNA phylogeny of the genus *Acacia* Miller (Acaciaeae, Leguminosae). Bot. J. Linn. Soc. 132, 195–222.
- Rohner, C., Ward, D., 1999. Large mammalian herbivores and the conservation of arid *Acacia* stands in the Middle East. Cons. Biol. 13, 1162–1171.
- Rosenthal, G.A., 1990. Biochemical adaptations by the bruchid beetle, *Caryedes brasiliensis*. In: Fujii, K., Gatehouse, A.M.R., Johnson, C.D., Mitchel, R., Yoshida, T. (Eds.), Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution. Kluwer Academics Publishers, New York, pp. 161–169.
- Scheffer, S.J., Wiegmann, B.M., 2000. Molecular phylogenetics of the holly leafminers (Diptera: Agromyzidae; *Phytomyza*): species limits, speciation, and dietary specialization. Mol. Phylogenet. Evol. 17, 244–255.
- Seigler, D.S., 2003. Phytochemistry of *Acacia*—sensu lato. Biochem. Syst. Ecol. 31, 845–873.
- Silvain, J.-F., Delobel, A., 1998. Phylogeny of west African *Caryedon* (Coleoptera: Bruchidae): congruence between molecular and morphological data. Mol. Phylogenet. Evol. 9, 533–541.
- Simpson, G.G., 1953. The Major Features of Evolution. Columbia U. Press, New York.
- Southgate, B.J., 1979. Biology of the Bruchidae. Ann. Rev. Entomol. 24, 449–473.
- Swigonova, Z., Kjer, K.M., 2004. Phylogeny and host-plant association in the leaf beetle genus *Trirhabda* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). Mol. Phylogenet. Evol. 32, 358–374.
- Termonia, A., Hsiao, T.H., Pasteels, J.M., Milinkovitch, M., 2001. Feeding specialization and host-derived chemical defense in chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3909–3914.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24, 4876–4882.
- Udayagiri, S., Wadhi, S.R., 1989. Catalog of Bruchidae. Mem. Am. Entomol. Inst. 45, 1–301.
- Van Tonder, S.J., 1985. Annotated records of southern african Bruchidae (Coleoptera) associated with acacias, with a description of a new species. Phytophylactica 17, 143–148.
- Vassal, J., 1972. Apport des recherches ontogeniques et seminologiques de l'étude morphologique, taxonomique et phylogénique du genre *Acacia*. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse 108, 125–247.
- Wahlberg, N., 2001. The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in Melitaeine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). Evolution 55, 522–537.
- Wink, M., Mohamed, G.I.A., 2003. Evolution of chemical defense traits in the Fabaceae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. Biochem. Syst. Ecol. 31, 897–917.
- Yang, Z., 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. J. Mol. Evol. 39, 105–111.

Section III : Article.

« Parallels in the evolution of the two largest New and Old World seed-beetle genera (Coleoptera: Bruchidae) »

Kergoat, G.J., Alvarez, N., Hossaert-McKey, M., Faure, N. & Silvain, J.-F.

Molecular Ecology (en révision).

Cette étude s'intéresse aux deux genres comptant le plus grand nombre d'espèces, au sein de la famille des Bruchidae ; les genres *Acanthoscelides* et *Bruchidius*. On a cherché à mieux définir les limites de ces deux groupes (supposés paraphylétiques par de nombreux auteurs) et à tester différentes hypothèses explicatives concernant leurs évolutions respectives.

Ce travail a tout d'abord consisté en une analyse phylogénétique, qui a porté sur plus de 70 espèces appartenant aux deux groupes (pour trois marqueurs moléculaires). Pour ces espèces on a optimisé le caractère plante-hôte sur la phylogénie des insectes, afin de mettre en évidence des patrons évolutifs potentiels. Parallèlement, ce travail s'est doublée d'une revue critique des données de la littérature sur les associations plantes-insectes connues chez ces deux genres. L'ensemble de ces données doit permettre de discuter et de comparer les évolutions respectives de ces deux groupes.

1. Title: Parallels in the evolution of the two largest New and Old World seed-beetle genera (Coleoptera, Bruchidae)

2. Authors: G.J. KERGOAT, *†[¶] N. ALVAREZ,‡[¶] M. HOSSAERT-MCKEY,‡ N. FAURE,* and J.-F. SILVAIN*

[¶] These authors have contributed equally and are considered joint first authors.

3. Full postal addresses: * IRD, UR 072 c/o CNRS, UPR 9034, Laboratoire PGE, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France,† IRD, UR 072 c/o Muséum National d'Histoire Naturelle, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France, ‡ CEFECNRS, 1919 rte de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

4. Date of receipt:

5. Keywords: adaptive radiation; Bruchidae; key innovation; host-plant associations; parallel evolution; phytophagous insects

6. Corresponding author: G.J. KERGOAT - Lab. PGE, avenue de la Terrasse, BP1, 91198 Gif/Yvette, France - Fax: (+33) 169 823 736 - E-mail: kergoat@pge.cnrs-gif.fr

7. Running title: Parallel evolution in seed-beetles

Abstract

This study provides the first phylogenetic analysis of a large sample of the two largest genera of seed-beetles, *Acanthoscelides* Schilsky and *Bruchidius* Schilsky, which mostly feed on legumes (Fabaceae). The goal of this study was to investigate evolutionary patterns in relation to biogeography and host-plant associations. We used three mitochondrial molecular markers and parsimony and Bayesian inference methods to reconstruct the phylogeny of 76 species. In addition, we critically reviewed host-plant records in the literature for these two bruchid genera. Our results demonstrated the existence of two major clades, one New World and one largely Old World, which generally correspond to the two genera. Yet, current classification of several species is erroneous, so that both genera as currently defined are paraphyletic. We highlighted a strong trend toward specialization (with high taxonomic conservatism in host-plant use) exhibited by the two studied genera. However, we showed the existence of several host shifts during the evolution of this group of bruchids. Our phylogenetic hypotheses and our evaluation of host-plant associations both suggest that the two genera have undergone parallel evolution, as they have independently colonized similar host-plants in their respective areas of distribution. Our estimation of divergence times indicated a more ancient origin for bruchids than that suggested by the fossil records. Interestingly, the suggested timing of diversification is consistent with the hypothesis of a radiation which could have occurred contemporaneously with the diversification of their legume hosts.

1. Introduction

The evolution of the species-rich superfamily Chrysomeloidea is a fascinating example of insect radiation on angiosperms. During their diversification, they successfully used almost all flowering plant parts as larval food resources (Johnson 1981). In Curculionoidea, the sister group of Chrysomeloidea, a similar trend is observed (Anderson 1995; Marvaldi *et al.* 2002), and many authors have introduced the concept of adaptive radiation (Simpson 1953; Schluter 2000) to explain the enhanced rate of diversification of phytophagous Coleoptera on angiosperms (Mitter *et al.* 1988; Farrell 1998; Marvaldi *et al.* 2002; Farrell & Sequeira 2004). According to these authors this diversification is likely to be linked either to the frequent availability of new ecological niches (for which the insect is pre-adapted) or to the development of “key innovations” (Simpson 1953) which enable the use of new food resources (in effect, creating new potential niches). In the coevolutionary model of Ehrlich & Raven (1964), evolutionary novelties enable insects to circumvent the defenses of plants, particularly toxic secondary compounds. The insects able to bypass these defenses are then likely to undergo a successful diversification on these hitherto unexploited resources. Adaptation to chemical defenses which then constrain host-plant use can account for two major patterns in phytophagous insect host-plant associations. First, the strong trend of taxonomic conservatism in host-use observed among endopterygote insects can be explained by the fact that related plants often share similar chemical defenses (Kergoat *et al.* 2005). Secondly, convergent similarity in host-plant chemistry can explain host-shifts among taxonomically unrelated plants observed in groups such as Chrysomelidae (Becerra, 1997; Termonia *et al.* 2001).

The study of the evolutionary processes driving the diversification of Chrysomeloidea has been particularly intensive in the seed-beetles and is well summarized in Johnson’s (1990a) review. Recent changes in taxonomy and thus nomenclature seem to favor the use of the subfamily name Bruchinae rather than Bruchidae (C.D. Johnson, pers. comm.), but for convenience we have retained the name Bruchidae in this study. Bruchids constitute a homogeneous group of about 1,700 described species in about 60 genera (Southgate 1979; Johnson 1994), most of which are associated with the family Fabaceae (Johnson 1981). Most bruchid species are specialized on a narrow range of host-plants and their larval stages develop exclusively inside seeds (Borowiec 1987). This adaptation has led bruchids to specialize on legumes, but has likely allowed them to undergo numerous parallel radiations on other taxa with hard-coated seeds. Moreover, the family Bruchidae is of particular interest as it contains several pest species of economic importance with worldwide distributions (Delobel & Tran 1993). Bruchid taxonomy, biology and ecology have been intensively investigated by many authors (e.g., Johnson 1981; Borowiec 1987), but only recently have molecular phylogenetic methods been applied to evolutionary studies of this group (Silvain & Delobel 1998; Kergoat *et al.* 2004, 200x).

In this study, we have focused on the two largest seed-beetle genera, *Acanthoscelides* and *Bruchidius*, which represent about half of the known bruchid species. As currently circumscribed, *Acanthoscelides* is restricted to the New World and *Bruchidius* to the Old World. Working with distinct bruchid groups that have radiated independently in different geographic areas will allow us to test hypotheses concerning adaptive radiation in the sense of Schluter (2000) who defines it as “the evolution of ecological and phenotypic diversity within a rapidly multiplying lineage”. Indeed, these two largest bruchid genera are relevant models to examine general patterns in adaptive radiation of specialized phytophagous insects, especially concerning the role of host-plant association.

We will also study possible parallel patterns between these two genera by comparing the diversification they have undergone on a large number of host-plant species (Johnson 1981; Borowiec 1987) in their respective areas of distribution, in which they seem to occupy similar ecological niches (Borowiec 1987). Our approach is based on the hypothesis that each of the two genera constitutes a distinct monophyletic group. However, the two genera are morphologically very similar and can only be distinguished by the number of femoral spines on the hind leg. Nonetheless, this usually diagnostic character fails to separate some *Bruchidius* species from *Acanthoscelides* species (A. Delobel, pers. comm.). This observation could be explained if the genera as currently circumscribed were in some respects artificial. Considering the lack of clear synapomorphies supporting the monophyly of each, several authors have considered these genera as paraphyletic (Johnson 1981; Borowiec 1987; A. Delobel, pers. comm.). Therefore, we decided to test the monophyly of the two genera.

To test these phylogenetic hypotheses, and examine the radiation of these bruchids we investigated a large sample of *Acanthoscelides* and *Bruchidius* species, and other representatives of tribe Acanthoscelidini, by using sequences for three different mitochondrial genes (12S rRNA, cytochrome *b*, and cytochrome *c* oxidase subunit I).

2. Materials and methods

Taxon sampling and DNA sequencing

The 76 species analyzed, their geographical provenance, collectors and host-records are listed in Table 1. Although the species included in this study comprise fewer than 20% of known species for the two genera, our sample can be considered as representative of the diversity of host-plant associations. For instance, we have sampled species associated with 16 of the 19 tribes of the family Fabaceae which are known to be larval hosts of *Acanthoscelides* and *Bruchidius*. Sampled individuals were generally obtained by rearing larvae from seeds collected in the field, with the exception of two species as presented in Table 1. As outgroups, in addition to 11 other species of the tribe Acanthoscelidini, a representative of the supposed primitive subfamily Pachymerinae (Borowiec 1987) was used. Both dry and ethanol-preserved specimens were used for DNA extractions (one individual was sequenced per species). With the exception of the *Pachymerus cardo* specimen (for which we only used hind legs), whole specimens were used to obtain total DNA by using QIAGEN extraction columns. Partial sequences for the three mitochondrial genes were amplified using primers listed by Simon *et al.* (1994) and by Monteiro & Pierce (2001). Standard cycling conditions were 5 min at 94°C followed by 35-40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 45-50°C (depending on the primers used), 1 min at 72°C, and a final step at 72°C for 10 min. Partial sequences for the 12S rRNA gene were successfully amplified for all specimens, but for some dry specimens it was not possible to obtain PCR products for the two other genes. PCR products were purified by using QIAGEN purification kits. Both strands of the PCR products were sequenced by the Sanger dideoxy method and sequence data were obtained by analyzing samples on ABI 373 and ABI 3100 automated sequencers (Applied Biosystems). The new sequences generated in this study were deposited in GenBank (see Table 1 for accession numbers). Specimens corresponding to this study are kept in the collection of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) (MNHN, Paris, France) and in the Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE) (Montpellier, France).

Phylogenetic analyses

The alignment of coding sequences (cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase subunit I fragments) was trivial, as no gap event was detected. Minor differences in the length of 12S rRNA sequences were observed, and their alignments were performed by using ClustalX (Thompson *et al.* 1987) with default settings. After alignment, the combined sequence data set was 2,216 bp in length: (i) the sequenced cytochrome *b* region contained 782 characters, 305 of which were parsimony-informative; (ii) the sequenced cytochrome *c* oxidase I region contained 1,018 characters, 375 of which were parsimony-informative; (iii) the sequenced 12s rRNA region contained 416 characters, 171 of which were parsimony-informative (gaps were treated as a fifth character). To estimate phylogenetic relationships among taxa, we carried out parsimony analyses, using PAUP* version 4.0b10 (Swofford 2003), and Bayesian inferences, using MrBayes version 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

All parsimony analyses were performed using heuristic search option (TBR, random sequence addition, MaxTrees: 500) with 1,000 random-addition replicates. We first conducted separate analyses of the three data sets. Congruence between the data sets for the three gene was assessed by using the incongruence length difference (ILD) test (Farris *et al.* 1994), as implemented in PAUP*, with 1,000 replicates and all invariant characters excluded (Cunningham 1997). Although several sequences were missing for some specimens (only the 12s rRNA data set was complete) we have analyzed the combined data set following Wiens (1998), who demonstrated, by performing multiple analyses of simulated data sets, that the addition of an incomplete data set to a data set complete for other markers is more likely to increase than decrease the phylogenetic accuracy. The robustness of topologies was assessed by bootstrap procedures (1,000 replicates) and the estimation of decay indexes (Bremer 1994) using TreeRot 2.0 (Sorenson 1999). Preliminary analyses were also conducted to estimate partitioned Bremer support (PBS) values (Baker & DeSalle 1997) for each data set (with TreeRot). However the incompleteness of the cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase I data sets resulted in an underestimation of PBS values. As a result, decay indexes and summed PBS values exhibited major discrepancies (e.g., summed PBS values were negative for some nodes) so that we have chosen to present only decay indexes on the tree corresponding to the combined data set analysis under parsimony.

For Bayesian inference we performed partitioned Bayesian analyses (Nylander *et al.* 2004; Jordal & Hewitt 2004) on the combined data set. Under this approach, the computational efficiency of the Bayesian MCMC method allows the use of more realistic and complex evolutionary models for each data partition (Nylander *et al.* 2004). For each defined partition (one partition per gene sequenced) the best-fit substitution model was determined by Modeltest 3.06 (Posada & Crandall 1998) through hierarchical likelihood ratio tests (LRTs). We subsequently used four Metropolis-coupled chains with incremental heating in four distinct runs of 2,000,000 generations. Distinct parameters were estimated for each partition defined under the appropriate best-fit substitution models previously determined. During the run process, trees were saved to a file every 100 generations (20,000 trees were thus saved at the end of each MCMC run). Overall model likelihood scores were further plotted against generations of the chains in order to determine the burn-in period. The results were presented in the form of a 50% majority-rule consensus tree (in which trees corresponding to the burn-in period were discarded) and the support for the nodes of this tree was given by posterior probability estimates for each clade. In addition the branch lengths of this topology were estimated through maximum likelihood by using the best-fit substitution model determined by Modeltest.

Character optimizations and hypothesis testing

To study the evolutionary history of several characters of interest, we used the program Mesquite 1.05 (Maddison & Maddison 2004), which allows the reconstruction of ancestral character states under maximum-likelihood. In comparison with parsimony optimizations the likelihood reconstruction method has the advantage of providing, for each node, a probability estimate for each ancestral character state (Jordal & Hewitt 2004). This state assignment maximizes the probability of arriving at the observed states in the terminal taxa (for a given model of evolution) and it allows the states at all other nodes to vary (Maddison & Maddison 2004). Two independent optimizations were performed using likelihood reconstruction: (i) character optimization of host-plant associations at the plant subfamily level; (ii) character optimization of host-plant associations at the plant tribal level (for the legume feeders only). Owing to the high level of host-plant specificity of the sampled bruchid species (all the species studied were associated with only one botanical family, subfamily and tribe) the character coding of host-plant associations was facilitated and no polymorphic characters were included in the analyses. Since the results of character optimizations are highly dependent on the robustness of the phylogenetic hypotheses available, we chose to only perform character optimizations on the tree resulting from the Bayesian analyses.

To test several competing evolutionary hypotheses we generally used a likelihood-based statistical test, the SH test (Shimodaira & Hasegawa 1999; Goldman *et al.* 2000), as implemented in PAUP* (RELL method; 1,000 replicates). This test was used to see if the difference between an optimal tree (resulting from an unconstrained analysis under likelihood) and a constrained tree (e.g., a tree in which some groups of species were constrained to be monophyletic) was significant. SH tests were used to test hypotheses regarding biogeography and evolution of host-plant associations and to evaluate the monophyly of the genera *Acanthoscelides* and *Bruchidius*. In addition, Wilcoxon signed-ranks tests (Templeton 1983), as implemented in PAUP*, were conducted to test the possible paraphyly of both genera under parsimony.

Estimation of divergence times

To estimate ages of nodes we first tested the hypothesis of a molecular clock for the combined data set by implementing a LRT that compares the likelihood score of the Bayesian phylogenetic hypothesis with (L_1) and without (L_0) the molecular clock enforced (the best-fit model of evolution selected by Modeltest was used). As the LRT rejected the hypothesis of overall rate homogeneity ($-2(\ln L_1 - \ln L_0) = 188.68$, $df = 74$, $P = 95.081$), we further estimated an ultrametric tree using the non-parametric rate smoothing (NPRS) method of Sanderson (1997), as implemented in TreeEdit (Rambault & Charleston 2002; <http://evolve.zoo.ox.ac.uk>). This penalized likelihood method is appropriate for data sets that depart from a molecular clock as it smoothes the rapidity of rate change among lineages (in the same way as smoothing techniques in regression analyses). For the timescale estimation, we used the standard rate estimate (2% per Myr) for mitochondrial DNA evolution in arthropods (Brower 1994). In addition, standard errors for estimates of node age were calculated for seven nodes (corresponding to possible vicariant events) by using the bootstrap resampling method under PAUP* (no swapping option; topological constraints enforced; 100 replicates). For each of the 100 resulting trees a distribution of the variation in node height was created and used to obtain the standard error for the estimate of node age.

Furthermore, to test the adaptive radiation hypothesis, we calculated rates of diversification ($r_{0.0}$ and $r_{0.9}$) of both genera as a whole by using Magallon & Sanderson (2001)'s equation for a crown group age. Estimates of branch lengths were also used to investigate this hypothesis.

Evaluation of host-plant associations

Associations were determined both by sampling seeds of potential host-plants in the field with subsequent monitoring of adult emergences (e.g., Janzen 1980; Gillon *et al.* 1992; Silvain & Delobel 1998; Jermy & Sventesi 2003; Kergoat *et al.* 2004, 200x), and by critical examination of the available literature. A summary of known host-plant associations (based on literature and field data) for the genera *Acanthoscelides* and *Bruchidius* is provided in Table 2. Host-plant records for *Acanthoscelides* were intensively and rigorously investigated by Johnson (e.g., see Johnson 1989). He published major studies on species of North and Central America (Johnson 1970, 1983) and of northern South America (Johnson 1990b). However, there is still a gap in knowledge concerning southern South American species. For *Bruchidius*, many studies on specific groups of species and local and regional faunas are available (e.g., Hoffmann 1945; Lukjanovitsch & Ter-Minassian 1957; Arora 1977), but must be used cautiously if they are not explicitly based on rearing. A major review on the family Bruchidae (Udayagiri & Wadhi 1989) which includes extensive host-plant information was used as a major source of information for *Bruchidius* species, but in a very conservative way, so as to avoid many unreliable and unverified records (Delobel & Delobel 2003; Jermy & Szentesi 2003). Indeed, numerous host-plant records in this study were doubtful, and names for many bruchids and host-plants were outdated. Therefore we have only included questionable host-plant records if they have been reported by at least two independent sources. Data from 12 other studies were also included in our evaluation of host-plant associations (Janzen 1980; Borowiec 1988; Johnson 1990c; Morimoto 1990; Gillon *et al.* 1992; Delobel & Tran 1993; Johnson & Siemens 1995; Anton 1998; Anton & Delobel 2003; Delobel & Anton 2003; Delobel & Delobel 2003; Delobel *et al.* 2004). Supplementary information on host-plant biogeography and specific host-use in some bruchid taxa were also provided. The International Legume Database and Information Services (<http://www.ildis.org>) database was used to update host-plant names from the literature and as a source of information on host-plant biogeography and species richness.

3. Results

Phylogenetic hypotheses

Separate analyses performed under parsimony yielded poorly resolved topologies (not shown). The ILD test was not significant ($P=0.674$) and thus supported the combination of the data sets for the three genes. The analysis of the combined data set yielded a single most-parsimonious tree (7375 steps; CI=0.236; RI=0.360) which is presented in Fig.1. Overall, this topology is not well supported, as only 20 of 73 nodes are supported by bootstrap values greater than 70% and only 29 of 73 nodes are supported by decay indexes greater than 5.

For Bayesian analyses, the same model of evolution was selected by the LRTs for the three defined partitions, namely the GTR model with a proportion of invariable sites and a gamma distribution. After four distinct runs of 2,000,000 generations, a burn-in period of 100,000 generations was identified, by plotting graphically likelihood values for each generation. The 1,000 trees corresponding to this burn-in period were subsequently not retained in the 50% majority-rule

consensus trees. Three of the four analyses yielded the same consensus trees (Fig.2) but one of the four runs resulted in another topology which only differs by the position of one species (not shown; SH test not significant). Basal and terminal nodes are well supported in this phylogenetic hypothesis but some internal nodes are only weakly supported (less than 50%), probably because of the missing sequences of the dried specimens.

Both *Acanthoscelides* and *Bruchidius* appear paraphyletic in all analyses, in agreement with the views of several authors (Johnson 1981; Borowiec 1987; A. Delobel, pers. comm.). Within *Acanthoscelides*, two clades are recovered under Bayesian inference, whereas parsimony analyses suggested a more scattered pattern. Within *Bruchidius*, the majority of the sampled species are included in a major clade which also includes other representatives from the tribe Acanthoscelidini. In all analyses, the genus *Tuberculobruchus* appears paraphyletic as the two sampled species of *Tuberculobruchus* are included within a clade of morphologically similar *Bruchidius* species, which present similar genitalia (Kergoat & Silvain 2004). Interestingly, one *Bruchidius* species, *Bruchidius lineatopygus*, is found grouped, with strong support (posterior probability of 100%; bootstrap of 89%; decay index of 9), with the sole studied representative of the genus *Conicobbruchus* in a very basal position. Although Bayesian and parsimony analyses recovered similar relationships to a large extent, some major discrepancies were found between them, as indicated by a significant SH test ($P=0.016$). For instance, under Bayesian inference, *Decellebruchus atrolineatus* is related to a *Bruchidius* species whereas it is related to an *Acanthoscelides* species under parsimony. In comparison with the tree obtained with Bayesian analyses, the phylogenetic hypothesis from the combined analysis under parsimony appears less resolved, as fewer nodes are well supported. The parsimony tree also shows greater conflicts with the systematic propositions (i.e., taxonomic groups) based on morphological data (see Table 3). It thus appears that the results of Bayesian analyses provide a clearer view of the phylogeny of the tribe Acanthoscelidini, and a clearer circumscription of the genera *Acanthoscelides* and *Bruchidius*, than do parsimony analyses.

Character optimization and hypothesis testing

In Fig.3, character histories of host-plant preferences are mapped onto a mirror-image cladogram. On the left cladogram, the character history of host-plant preferences at the subfamily level indicates a fairly high conservative pattern of host-plant use (phylogenetically related insects are generally associated with phylogenetically related host-plants). Our results show two unambiguous independent host shifts onto Malvaceae (each time to a distinct subfamily) for New World species of *Acanthoscelides*. Regarding the species associated with the Fabaceae, only five unambiguous independent host shifts have occurred at the subfamily level. Interestingly, the latter events have always involved a shift from the subfamily Papilionoideae toward subfamilies Caesalpinioideae or Mimosoideae. Thus, the ancestral host-plants for the lineage represented by the sampled species of *Acanthoscelides* and *Bruchidius* appear to have been members of the subfamily Papilionoideae. The latter assumption is strongly supported by a probability of 97% under likelihood ancestral state reconstruction. On the right cladogram, the character history of host-plant preferences at the tribe level (for the studied legume feeders) is illustrated and suggests a more dynamic pattern. This is well illustrated for the species associated with the tribe Phaseoleae, in which character optimization indicates three independent colonizations but also three secondary losses of plant use. Several gain and loss events have also occurred for the species associated with tribes Desmodieae and Trifolieae, but to a lesser extent.

In addition to the previous results, the phylogenetic framework allows investigation of the biogeographical patterns of the sampled species. Most of the sampled species group into two large clades, each of which is restricted either to the New World or the Old World (see Fig.4). The first clade includes *Algarobius prosopis* and all *Acanthoscelides* species with the exception of the *Acanthoscelides* species associated with Mimosoideae that in both parsimony and Bayesian inference are separated from the main clade of *Acanthoscelides*. The second clade groups all *Bruchidius* species (with the exception of *Bruchidius lineatopygus*), but also the sampled members of genera *Callosobruchus*, *Decellebruchus* and *Tuberculobruchus*. The results of the character optimization of the geographical distribution of species under maximum likelihood suggest that the observed pattern for the Old World species results from two distinct vicariant events (see Fig.4). However, the hypothesis of a single vicariant event cannot be excluded, as the result of a SH test in which Old World species are constrained to form a monophyletic group is not significant ($P=0.165$).

Regarding the hypothesis of the monophyly of genera *Acanthoscelides* and *Bruchidius*, both SH and Wilcoxon signed-ranks tests were significant for the genus *Bruchidius* ($P=0.001$ and $P<0.0001$ respectively). For the genus *Acanthoscelides*, unlike the Wilcoxon signed-ranks test ($P=0.0472$) the SH test was not significant ($P=0.105$). As a consequence, although the paraphyly of this genus is strongly suggested, the hypothesis of monophyly for this genus cannot be totally excluded.

Estimation of divergence times

We present in Fig.4 a time-scaled NPRS ultrametric tree estimated under TreeEdit, using the topology estimated through Bayesian analyses and initial branch lengths estimated under maximum likelihood (Ribera *et al.* 2004). Our dating indicates an older origin (~70 Myr) for bruchids than suggested by the extant fossil record, as the oldest known bruchid fossils (assigned to tribe Pachymerinae) only date from the early Eocene some 50 Myr ago (Archibald & Mathewes 2000). Our dating is consistent with the estimation of bruchid divergence times from previous molecular studies which also suggest a late Cretaceous-early Tertiary origin (Farrell 1998; Farrell & Sequeira 2004). This older origin is particularly interesting from an evolutionary perspective, as it suggests that the diversification of seed-beetles could have occurred nearly at the same time as that of their legume host-plants (Herendeen *et al.* 1992).

On the basis of a crown group age estimate of 49.5 Myr, and on an estimated diversity of 600 species (for *Acanthoscelides* plus *Bruchidius*), we estimated a maximum diversification rate ($r_{0.0}$) of 0.050 net speciation events per Myr in the absence of extinction and a minimum rate ($r_{0.9}$) of 0.035 net speciation events per Myr under a high relative extinction rate.

Patterns of host-plant associations in Acanthoscelides and Bruchidius

Our results indicate that the two genera share a similar pattern in their host-plant use. Host-plant records indicate that most species of *Acanthoscelides* and *Bruchidius* are specialists which feed on a limited number of host-plants. At the plant family level, each of the *Acanthoscelides* and *Bruchidius* species samples exhibited a strong specificity, feeding exclusively on seeds of species from a single plant family. They are also mostly associated with the family Fabaceae, like most bruchids. This trend is stronger for the genus *Bruchidius*, in which only four species are known to feed outside the Fabaceae. For *Acanthoscelides*, the known host-range is wider as valid host-plant records are known for six other plant families, most frequently Malvaceae.

Regarding species associated with the family Fabaceae, a closer look at the subfamily level reveals once again a high degree of specificity, for species of both genera. In both, each species feeds exclusively on a single subfamily, with the exception of *Acanthoscelides compressicornis*, which is known to feed on both *Desmanthus* (Mimosoideae) and *Hoffmanseggia* (Caesalpinioideae). Fewer than ten species of *Acanthoscelides* and *Bruchidius* are known to feed on members of the subfamily Caesalpinioideae, whereas dozens of species are associated with subfamilies Mimosoideae or Papilionoideae. For these latter subfamilies, important differences in host use pattern are noticeable. Indeed *Acanthoscelides* and *Bruchidius* associated with Mimosoideae predominantly feed on three genera, namely *Acacia*, *Albizia* and *Mimosa*, whereas species associated with Papilionoideae do not exhibit such strong preferences and are associated with 66 distinct genera of host-plants.

At the tribal level, the previously observed taxonomic conservatism in host-plant use is still evident, and most species feed on plant species belonging to a single botanical tribe. A total of 14 papilionoid tribes are exploited by *Acanthoscelides* and *Bruchidius* species, and 12 of these 14 tribes are used by both genera. Careful examination of the pattern of host-plant distribution shows that when a host-plant genus occurs in both the New World and Old World, it is generally attacked by both *Bruchidius* (Old World) and *Acanthoscelides* (New World). This finding is consistent with the suggestion of Borowiec (1987) that the two genera seem to occupy similar ecological niches in their respective areas of distribution.

4. Discussion

Phylogeny and taxonomy

Although this study focuses on only 76 species, our results provide valuable information on bruchid phylogeny and taxonomy. Our molecular analyses support the paraphyly of genera *Bruchidius* and *Tuberculobruchus* and, to a large extent, that of *Acanthoscelides* (given the results of the SH test). Species of *Callosobruchus* and *Decellebruchus* are found within the clade which groups the majority of *Bruchidius* species. Members of these two genera are morphologically very similar to certain *Bruchidius* species which are closely related to them in our analyses. They are distinguishable only by the structure of the hind femur (for *Callosobruchus*) and of the antenna in males (for *Decellebruchus*). All these results suggest the utility of either redefining a larger genus *Bruchidius* or further splitting this genus into smaller monophyletic genera. The status of the basal *Bruchidius lineatopygus* is also questionable and we advocate its inclusion within a larger redefined genus *Conicobruchus*. Regarding *Acanthoscelides* species, two groups seem to be well differentiated. Interestingly the position of *Merobruchus placidus* as the sister taxon of one of the two clades of *Acanthoscelides* is consistent with morphological evidence (J. Romero, pers. comm.). Further studies should investigate larger samples of *Acanthoscelides* to clarify relationships within the genus. The boundaries of some extant taxonomic groups should also be investigated in view of our results. For example, the inclusion of *Bruchidius grandemaculatus* and *Bruchidius uberatus* within the group *centromaculatus* should be studied closely from a morphological point of view.

Evolution of host-plant use and role of host-plant chemistry

Our mapping of host-plant preferences onto bruchid phylogeny underlines the strong taxonomic conservatism of host use, which is shared by both of the genera studied. Within the species

specialized on Fabaceae, only a few species, such as *Acanthoscelides compressicornis*, are known to develop on host-plants belonging to more than one tribe or subfamily. For these species, the extant patterns of host-plant use may be better explained by an expansion of host-plant range (C.D. Johnson, pers. comm.). The majority of species are specialized on a given host-plant genus or tribe and most host shifts have occurred between related host-plants. However, a few host shifts between distantly related plants, followed by successful diversifications, have occurred in the evolutionary history of the two genera. This quite dynamic pattern underlines the fact there is no evidence of cospeciation processes between either *Acanthoscelides* or *Bruchidius* and their respective host-plants. Thus, for our sample, at least two major host shifts between distinct plant families, and five major host shifts between distinct subfamilies (for the Fabaceae) are revealed. Moreover, character optimizations of plant families and subfamilies (for the Fabaceae) suggest that the subfamily Papilionoideae is the ancestral host-plant group of *Acanthoscelides* and *Bruchidius*, at least for the species we sampled. Nonetheless, hasty generalization of this finding is unwarranted, since our sample represents only a subset of the known species of these two bruchid genera.

The integration of reliable host-plant records for a large number of species of *Acanthoscelides* and *Bruchidius* permits discussion of the evolution of host-plant use at a larger scale. In view of our evaluation of host-plant associations, the trend suggested by the mapping of host-plant preferences onto bruchid phylogeny is likely to fit with all *Acanthoscelides* and *Bruchidius* as well. Indeed, in both genera, related species belonging to the same taxonomic group are generally associated with host-plants of the same tribe (if they develop on Fabaceae) or family (if they develop on hosts other than the Fabaceae) as shown in Table 3. We can thus assume that conservatism in host use and specialization has strongly influenced the evolution of the two genera. Our molecular analyses also suggest that a total of at least four lineages of *Acanthoscelides* and *Bruchidius* have radiated independently on various host-plant groups. Yet our sampling certainly does not encompass the full extent of these successful diversifications, particularly for the clade which is represented only by *Bruchidius lineatopygus* and *Conicobruchus strangulatus*. These independent radiations have occurred on similar host-plants (belonging to the same taxonomic groups) in the New World and the Old World and thus suggest that *Acanthoscelides* and *Bruchidius* have undergone a parallel evolution in their history, successfully colonizing the same niches (i.e., new food resources) in their respective areas of distribution. The occurrence of multiple independent host shifts between distinct plant families, and between distinct subfamilies (for the Fabaceae), is suggested not only by our character optimization but also by many host-plant records from the literature. We can suppose that these host-shifts between distantly related host-plants have played an important role in the successful diversification of these seed-beetles.

Host-plant chemistry is likely to be important in the evolution of host-plant use. Many secondary compounds (alkaloids, non-protein amino acids, cyanogenic glycosides, lectins, proteinase inhibitors) are frequently found in seeds, and their toxicity against bruchids has been demonstrated by previous studies (Janzen *et al.* 1977; Janzen 1981; Birch *et al.* 1986; Gatehouse *et al.* 1990). Consequently the strong specificity and taxonomic conservatism in host use exhibited by most bruchids suggests that they are somewhat constrained to feed on chemically similar host-plants. However since host-plant chemistry is generally correlated with host-plant phylogeny we can hardly exclude other factors that may constrain bruchid evolution (but see Kergoat *et al.* 200x). Insects feeding inside plant organs must be finely adapted to the morphology, the physiology and the chemistry of the host, and generally tend to be more constrained in host-plant choice than are externally feeding phytophagous insects (Bucheli *et al.* 2002; Farrell & Sequeira 2004). Furthermore, our results also suggest that some species have undergone host shifts to chemically

dissimilar host-plants (Wink & Mohamed 2003) (e.g., between plants belonging to the subfamilies Papilionoideae and Mimosoideae), a phenomenon that likely has involved the development of “key innovations” in the form of detoxification mechanisms. Members of both *Acanthoscelides* and *Bruchidius* have independently developed abilities to feed on many toxic seeds. A striking example is the adaptation of many *Acanthoscelides* and *Bruchidius* species to the non-protein amino acid *L*-canavanine, widespread in Papilionoideae (Bell *et al.* 1978). The mechanisms of detoxification of canavanine and other compounds (e.g., proteinase inhibitors) are now well understood (Bleiler *et al.* 1988; Rosenthal 1990; Oliveira *et al.* 2002) and suggest either widespread preadaptation to many toxic compounds or the independent evolution of similar “key innovations” at several times.

Biogeography

Our analyses point to the existence of two large clades, one strictly New World, the other Old World in distribution. Using the timescale presented in Fig. 4, we can suppose that the separation between Old World and New World species occurred early in the history of the tribe Acanthoscelidini, some 50-40 Myr ago. The suggested early Tertiary period of divergence is consistent with biogeographical evidences (Sanmartin *et al.* 2001), which indicate that the observed basal splits could be accounted by two distinct vicariant events. First, the closure of the Tulean land bridge which connected Europe and North America (this landbridge was definitively closed some 50 Myr ago). Second, the progressive closure of the early Beringian Bridge which connected the Eastern Palearctic with the Western Nearctic. Yet, prior to his closure some 35 Myr ago (Sanmartin *et al.* 2001), the early Beringian Bridge was under the influence of major climate changes (from warm climates to colder ones) that have certainly posed intermittent barriers to the migration of non-cold tolerant organisms such as seed-beetles. Interestingly our timing excludes the alternative hypothesis of an older vicariant event, found in other Chrysomeloidea (Becerra 2003), namely the breakup of West Gondwana (between Africa and South America) some 100 Myr ago.

Evidence for adaptive radiation in Acanthoscelides and Bruchidius?

Schluter (2000) has linked the concept of adaptive radiation to the following four major features: common ancestry, trait utility, phenotype-environment correlation and rapid speciation. At least two of these features are exhibited by the bruchids we have studied. Common ancestry is assessed by our phylogenetic analyses, whereas trait utility is supported by the multiple suggested “key innovations” that are involved in detoxifying many toxic seed compounds (Bleiler *et al.* 1988; Rosenthal 1990; Oliveira *et al.* 2002). In the absence of strong morphological differentiation within bruchids, it is difficult to demonstrate a phenotype-environment correlation, even if the latter seems to be quite intuitive when examining larval structures involved in seed boring. The hypothesis of rapid speciation is not supported by our estimated diversification rates which are significantly lower than the rates observed in fast-diversifying clades of organism (Magallon & Sanderson 2001). The hypothesis of rapid speciation is also not fully supported by our estimation of divergence times (Fig.4) as branch lengths between ancestors are not short on the average. Yet more precise information on more recent vicariant events are required to better constrain the ages of nodes under NPRS optimization to render our conclusions more precise.

Conclusions

This study has produced the first phylogenetic reconstruction for a large sample of the two largest genera of seed-beetles, allowing investigation of their evolutionary patterns. Despite some

limitations due to sample size, we have clarified phylogenetic relationships within the tribe Acanthoscelidini and circumscribed more clearly the genera *Acanthoscelides* and *Bruchidius*. We have also shown a strong trend towards taxonomic conservatism in host use, despite the occurrence of several host shifts during the evolution of these two genera. Our phylogenetic analysis and our evaluation of host-plant associations both suggest that the two genera have undergone parallel evolution, as they have independently colonized similar host-plants, and probably developed similar mechanisms of detoxification, in their respective areas of distribution. The more ancient than previously thought origin of seed-beetles that is suggested by our estimation of divergence times is consistent with the hypothesis of a radiation which could have occurred contemporaneously with the diversification of their legume host-plants. However, adaptive radiation cannot yet be fully demonstrated because we lack sufficient evidence of rapid speciation.

References

- Anderson RS (1995) An evolutionary perspective of diversity in Curculionoidea. *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, **14**, 103-114.
- Anton K-W (1998) Results of the Czechoslovak-Iranian entomological expeditions to Iran 1970, 1973 and 1977 Coleoptera Bruchidae. *Casopis Narodnhho muzea Rada prirodovedna*, **167**, 73-90.
- Anton K-W, Delobel A (2003) African species of the *Bruchidius centromaculatus* group with "eyed" female pygidium (Coleoptera: Bruchidae: Bruchinae). *Genus*, **14**, 159-190.
- Archibald SB, Mathewes RW (2000) Early Eocene insects from Quilchena, British Columbia, and their paleoclimatic implications. *Canadian Journal of Zoology*, **78**, 1441-1462.
- Arora GL (1977) Taxonomy of the Bruchidae (Coleoptera) of Northwest India. Part I. Adults. *Oriental Insects Supplement*, **7**, 1-132.
- Baker RH, DeSalle R (1997) Multiple sources of character information and the phylogeny of the Hawaiian drosophilids. *Systematic Biology*, **46**, 645-673.
- Becerra JX (1997) Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science* **276**, 253-256.
- Becerra JX (2003) Synchronous coadaptation in an ancient case of herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12804-12807.
- Bell EA, Lackey JA, Polhill RM (1978) Systematic significance of canavanine in the Papilionoideae (Faboideae). *Biochemichal Systematics and Ecology*, **6**, 201-212.
- Birch ANE, Fellows LE, Evans SV, Doherty K (1986) Para-aminophenylalanine in *Vigna*: possible taxonomic and ecological significance as a seed defense against bruchids. *Phytochemistry*, **25**, 2745-2749.
- Bleiler JA, Rosenthal GA, Janzen DH (1988) Biochemical ecology of canavanine-eating seed predators. *Ecology*, **69**, 427-433.

- Borowiec L (1987) The genera of seed-beetles (Coleoptera, Bruchidae). *Polskie Pismo Entomologiczne*, **57**, 3–207.
- Borowiec L (1988) Bruchidae. Strakowce (Insecta: Coleoptera). *Fauna Polski*, **11**, 226 pp.
- Bremer K (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics*, **6**, 369-372.
- Brower AVZ (1994) Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 6491-6495.
- Bucheli S, Landry J-F, Wenzel J (2002) Larval case architecture and implications of host-plant associations for north American *Coleophora* (Lepidoptera: Coleophoridae). *Cladistics*, **18**, 71-93.
- Cunningham CW (1997) Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 733-740.
- Delobel A, Tran M (1993) *Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Faune tropicale XXXII*. Orstom/CTA.
- Delobel A, Anton K-W (2003) Les *Bruchidius* consommateurs des graines de *Dichrostachys* et du genre allié *Alantsilodendron* en Afrique et à Madagascar (Coleoptera, Bruchidae). *Annales de la Société Entomologique Française*, **108**, 313-322.
- Delobel A, Delobel B (2003) Les plantes hôtes des bruches de la faune de France, une analyse critique (Coleoptera Bruchidae). *Bulletin de la société Linnéenne de Lyon*, **72**, 199-221.
- Delobel A, Anton K-W, Kergoat GJ (2004) New data on European *Astragalus*-feeding *Bruchidius*, with the description of a new species from Southern Italy (Coleoptera: Bruchidae: Bruchinae). *Genus*, **15**, 173-185.
- Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* **18**, 586-608.
- Farrell BD (1998) “Inordinate fondness” explained: why are there so many beetles? *Science* **281**, 555-559.

- Farrell BD (2001) Evolutionary assembly of the milkweed fauna: cytochrome oxidase I and the age of *Tetraopes* beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**, 467-478.
- Farrell BD, Sequeira AS (2004) Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. *Evolution*, **58**, 1984-2001.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10**, 315-319.
- Gatehouse AMR, Minney BH, Dobie P, Hilder V (1990) Biochemical resistance to bruchid attack in legume seed; investigation and exploitation. In: *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution* (eds Fuji K, Gatehouse AMR, Johnson CD, Mitchel R, Yoshida T), pp. 241-256. Kluwer Academic Publishers.
- Gillon Y, Rasplus J-Y, Boughdad A, Mainguet A-M (1992) Utilisation des graines de Légumineuses par un peuplement de Bruchidae et d'Anthribidae (Coleoptera) en zone de mosaïque forêt-savane (Lamto: Côte d'Ivoire). *Journal of African Zoology*, **106**, 421-443.
- Goldman N, Anderson JP, Rodrigo AG (2000) Likelihood-based tests of topologies in phylogenetics. *Systematic Biology*, **49**, 652-670.
- Herendeen PS, Crepet WL, Dilcher DL (1992) The fossil history of the Leguminosae: phylogenetic and biogeographic implications. In: *The Fossil Record* (eds. Herendeen PS, Dilcher DL), pp. 303-316. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hoffmann A (1945) Coléoptères Bruchidae et Anthribidae. *Faune de France 44* (ed. Lechevalier), Paris.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, **17**, 754-755.
- Janzen DH, Juster HB, Bell EA (1977) Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Phytochemistry*, **16**, 223-227.

- Janzen DH (1980) Specificity of seed-attacking beetles in a Costa Rican deciduous forest. *Journal of Ecology*, **68**, 929-952.
- Janzen DH (1981) The defense of legumes against herbivores. In: *Advances in Legume Systematics* (eds. Polhill RM, Raven PH), pp. 951-977. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- Jermey T, Szentesi A (2003) Evolutionary aspects of host plant specialization - a study on bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *OIKOS*, **101**, 196-204.
- Johnson CD (1970) Biosystematics of the Arizona, California, and Oregon species of the seed beetle genus *Acanthoscelides* Schilsky (Coleoptera: Bruchidae). *University of California Publications in Entomology*, **59**, 1-116.
- Johnson CD (1981) Seed beetle host specificity and the systematics of the Leguminosae. In: *Advances in Legume Systematics* (eds. Polhill RM, Raven PH), pp. 995-1027. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- Johnson CD (1983) Ecosystematics of *Acanthoscelides* (Coleoptera: Bruchidae) of southern Mexico and Central America. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of American*, **56**, 1-370.
- Johnson CD (1989) Adaptive radiation of *Acanthoscelides* in seeds: examples of legume-bruchid interactions. In: *Advances in Legume Biology* (eds Stirton ICH, Zarucchi JL), pp. 747-779. Monograph in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.
- Johnson CD (1990a) Coevolution of Bruchidae and their hosts: evidence, conjecture, and conclusions. In: *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution* (eds Fuji K, Gatehouse AMR, Johnson CD, Mitchel R, Yoshida T), pp. 27-51. Kluwer Academic Publishers.
- Johnson CD (1990b) Systematics of the seed beetle genus *Acanthoscelides* (Bruchidae) of northern South America. *Transactions of the American Entomological Society*, **116**, 297-618.

- Johnson CD (1990c) Confirmation of *Hedysarum boreale* Nuttall (Leguminosae) as a host plant for *Acanthoscelides fraterculus* (Horn) (Coleoptera: Bruchidae). *Pan-Pacific Entomologist*, **66**, 175-176.
- Johnson CD, (1994) The enigma of the relationships between seeds, seed beetles, elephants, cattle and other organisms. *Aridus*, **6**, 1-4.
- Johnson CD, Siemens DH (1991) Interactions between a new species of *Acanthoscelides* and a species of Verbenaceae, a new host family for Bruchidae (Coleoptera). *Annals of the Entomological Society of America*, **84**, 165-169.
- Johnson CD, Siemens DH (1995) New host records from Ecuador and Venezuela for the genus *Acanthoscelides* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, **31**, 267-269.
- Jordal BH, Hewitt GM (2004) The origin and radiation of macaronesian beetles breeding in *Euphorbia*: The relative importance of multiple data partitions and population sampling. *Systematic Biology*, **53**, 711-734.
- Kergoat GJ, Delobel A, Silvain J-F (2004) Phylogeny and host-specificity of European seed beetles (Coleoptera, Bruchidae), new insights from molecular and ecological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**, 855-865.
- Kergoat GJ, Delobel A, Fédère G, Le Rü B, Silvain J-F (200x) Both host-plant phylogeny and chemistry have shaped the African seed-beetle radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *in press*.
- Kergoat GJ, Silvain, J-F (2004) Le genre *Bruchidius* (Coleoptera: Bruchidae) est-il monophylétique? Apports des méthodes de parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne. *Biosystema*, **22**, 113-125.
- Lopez-Vaamonde C, Godfray HCJ, Cook JM (2003) Evolutionary dynamics of host-plant use in a genus of leaf-mining moths. *Evolution*, **57**, 1804-1821.

- Lukjanovich FK, Ter-Minasian ME (1957) Zhuki-zernovski (Bruchidae). *Fauna SSSR, Zhestkokrylye*, **24**, 209 pp. Moscow.
- Maddison WP, Maddison DR (1992) MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Maddison WP, Maddison DR (2004) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 1.05 <http://mesquiteproject.org>.
- Magallon S, Sanderson MJ (2001) Absolute diversification rates in Angiosperm clades. *Evolution*, **55**, 1762-1780.
- Marvaldi AE, Sequeira AS, O'Brien CW, Farrell BD (2002) Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionoidea): do niche shifts accompany diversification? *Systematic Biology*, **51**, 761-785.
- Mitter C, Farrell BD, Wiegmann B (1988) The phylogenetic study of adaptative zones: has phytophagy promoted insect diversification? *American naturalist*, **132**, 107-128.
- Monteiro A, Pierce NE (2001) Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and Ef-1a gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**, 264-281.
- Morimoto K (1990) A synopsis of the bruchid fauna of Japan. In: *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution* (eds Fuji K, Gatehouse AMR, Johnson CD, Mitchel R, Yoshida T), pp. 131-140. Kluwer Academic Publishers.
- Nylander JAA, Ronquist, F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL (2004) Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, **53**, 47-67.
- Oliveira AS, Pereira RA, Lima LM *et al.* (2002) Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the Algaroba tree (*Prosopis juliflora* D.C.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **72**, 122-132.

- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.
- Ribera I, Nilsson AN, Vogler AP (2004) Phylogeny and historical biogeography of Agabinae diving beetles (Coleoptera) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**, 545-562.
- Rosenthal GA (1990) Biochemical adaptations by the bruchid beetle, *Caryedes brasiliensis*. In: *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution* (eds Fuji K, Gatehouse AMR, Johnson CD, Mitchel R, Yoshida T), pp. 161-169. Kluwer Academic Publishers.
- Sanderson MJ (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 1218–1231.
- Sanmartin I, Enghoff H, Ronquist F (2001) Patterns of animal dispersal, vicariance and diversification in the Holarctic. *Biological Journal of the Linnean Society*, **73**, 345-390.
- Schluter D (2000) *The ecology of adaptive radiation*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Shimodaira H, Hasegawa, M (1999) Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 1114-1116.
- Silvain J-F, Delobel A (1998) Phylogeny of west African *Caryedon* (Coleoptera: Bruchidae): congruence between molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**, 533-541.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A *et al.* (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651-702.
- Simpson GG (1953) *The major features of evolution*. Columbia University Press. New York, New York.
- Sorenson MD (1999) TreeRot. Boston University. Boston, Massachusetts.

- Southgate BJ (1979) Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology*, **24**, 449-473.
- Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Templeton AR (1983) Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution*, **37**, 221-244.
- Termonia A, Hsiao TH, Pasteels JM, Milinkovitch M. (2001) Feeding specialization and host-derived chemical defense in chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 3909-3914.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-4882.
- Udayagiri S, Wadhi SR (1989) Catalog of Bruchidae. *Memoirs of the American Entomological Institute*, **45**, 1-301.
- Wiens JJ (1998) Does adding characters with missing data increase or decrease phylogenetic accuracy? *Systematic Biology*, **47**, 625-640.
- Wink M, Mohamed, GIA (2003) Evolution of chemical defense traits in the Fabaceae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**, 897-917.

Figure legends

Fig.1 Most parsimonious tree (7375 steps; CI=0.236; RI=0.360) from the unweighted parsimony analysis of the combined data set (heuristic search option with 1,000 random-addition replicates). Numbers adjacent to nodes give bootstrap support values greater than 50% calculated for 1,000 replicates and secondly decay indexes.

Fig.2 Single tree from the partitioned Bayesian inference analysis of the combined data set (topology identical to the 50% majority-rule consensus tree). Branch lengths were estimated through maximum likelihood by using the general time reversible model with a proportion of invariable sites and a gamma distribution. Numbers adjacent to nodes give Bayesian posterior probabilities of nodes greater than 50%. In addition, on the right, extant taxonomic groups are figured.

Fig.3 Mirror-image of the 50% majority-rule consensus tree from the partitioned Bayesian inference analysis of the combined data set. On the left cladogram the character history of host-plant preferences at the plant subfamily level is figured. On the right cladogram the character history of host-plant preferences at the plant tribe level is figured. Ancestral character states were reconstructed under Mesquite using likelihood reconstruction (probabilities of character states are figured at the nodes with colored pie diagrams). Detailed legends for both character optimizations are provided on the top of the figure. In addition, between trees vertical bars with the corresponding patterns show the actual host-plant associations.

Fig. 4 Time-calibrated NPRS ultrametric tree estimated under TreeEdit, using the topology estimated through partitioned Bayesian inference analyses and initial branch length estimates obtained by using maximum likelihood. Standard errors for estimates of node age are figured for seven important nodes. On the right vertical bars show the distribution of the species. Hypothetical vicariant events are also figured (A and B).

Table 1 : Material examined in this study

Taxon	Locality*	Collector	Host-plant†		Gen Bank Accession No.		
					12S rRNA	Cyt <i>b</i>	COI
Subfamily Bruchinae Latreille, 1802							
Tribe Acanthoscelidini Bridwell, 1946							
<i>Acanthoscelides</i> Schilsky, 1905							
<i>anoditus</i> Johnson, 1983	Mex. El Copal	N Alvarez	<i>Anoda cristata</i>	Malvoideae	AY945966	none	none
<i>argillaceus</i> (Sharp, 1885)	Mex. Playa azul	A Aebi	<i>Phaseolus lunatus</i>	Fab. Phaseoleae	AY945967	none	AY947513
<i>biustulus</i> (Fall, 1910)	Mex. Amealco	J Romero N	<i>Desmodium</i> sp.	Fab. Desmodieae	AY945968	none	none
<i>clandestinus</i> (Motschulsky, 1874)	Mex. C. Carmen	R Ramírez D	<i>Vigna adenantha</i>	Fab. Phaseoleae	AY945969	none	none
<i>cuernavaca</i> Johnson, 1983	Mex. S. Huautla	J Romero N	<i>Desmodium</i> sp.	Fab. Desmodieae	AY945970	none	AY947514
<i>desmodicola</i> Johnson, 1983	Mex. S. Huautla	I Figueroa R	<i>Desmodium</i> sp.	Fab. Desmodieae	AY945971	none	AY947515
<i>desmoditus</i> Johnson, 1983	Ven. Barquisimeto	CD Johnson	<i>Desmodium tortuosum</i>	Fab. Desmodieae	AY945972	none	AY947516
<i>flavescens</i> (Fähræus, 1839)	Mex. Presa Diablo	J Luna Cozar	<i>Rhynchosia minima</i>	Fab. Phaseoleae	AY945973	none	none
<i>guazumae</i> Johnson & Kingsolver, 1971	Mex. S. Huautla	J Romero N	<i>Guazuma tomentosa</i>	Malvoideae	AY945974	none	none
<i>isla</i> Johnson, 1983	Ecu. Guayaquil	CD Johnson	<i>Rhynchosia minima</i>	Fab. Phaseoleae	AY945975	none	none
<i>macrophthalmus</i> (Schaeffer, 1907)	Vie. Saïgon (I)	H Delobel	<i>Leucaena leucocephala</i>	Fab. Mimoseae	AY945976	none	AY947517
<i>malvastrumicis</i> Johnson, 1983	Mex. El Cielo	S Niño	<i>Malvastrum americanum</i>	Malvoideae	AY945977	none	none
<i>mazatlan</i> Johnson, 1983	Mex. S. Huautla	J Romero N	<i>Desmodium</i> sp.	Fab. Desmodieae	AY945978	none	none
<i>mexicanus</i> (Sharp, 1885)	Mex. Coxcatlan	N Alvarez	<i>Mimosa</i> sp.	Fab. Mimoseae	AY945979	none	AY947518
<i>mundulus</i> (Sharp, 1885)	Mex. Jalcomulco	J Romero N	<i>Nissolia fruticosa</i>	Fab. Aeschynomeneae	AY945980	none	none
<i>oblongoguttatus</i> (Fähræus, 1839)	Mex. Cotaxtla	J Romero N	<i>Acacia cornigera</i>	Fab. Acacieae	AY945981	none	none
<i>obtectus</i> (Say, 1831)	Egy. Giza (I)	G Fédière	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fab. Phaseoleae	AY945982	AY947505	AY947519
<i>obvelatus</i> Bridwell, 1942	Mex. Tepoztlan	N Alvarez	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fab. Phaseoleae	AY945983	none	AY947520
<i>palmasola</i> Johnson, 1983	Mex. Tenabo	CD Johnson	<i>Rhynchosia longeracemosa</i>	Fab. Phaseoleae	AY945984	none	none
<i>puellus</i> (Sharp, 1885)	Nic. Mombacho	JM Maes	<i>Calopogonium mucunoides</i>	Fab. Phaseoleae	AY945985	none	none
<i>sanblas</i> Johnson, 1983	Mex. Córdoba	J Romero N	<i>Triumfetta lappula</i>	Tilioideae	AY945986	none	none
<i>sanfordi</i> Johnson, 1983	Mex. S. Huautla	J Romero N	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Fab. Phaseoleae	AY945987	none	AY947521
<i>stylifer</i> (Sharp, 1885)	Mex. Ixmiquilpan	J Romero N	<i>Desmodium</i> sp.	Fab. Desmodieae	AY945988	AY947506	AY947522
<i>taboga</i> (Johnson, 1983)	Pan. Chepo	CD Johnson	<i>Calopogonium caeruleum</i>	Fab. Phaseoleae	AY945989	none	none
<i>zonensis</i> Johnson, 1983	Col. Palmira	CD Johnson	<i>Teramnus uncinatus</i>	Fab. Phaseoleae	AY945990	none	none
<i>Algarobius</i> Bridwell, 1946							
<i>prosopis</i> (LeConte, 1858)	Egy. El Tur (I)	G Fédière	<i>Prosopis glandulosa</i>	Fab. Mimoseae	AY945964	AY947503	AY947511

Bruchidius Schilsky, 1905

<i>auratopubens</i> Decelle, <i>in litt.</i>	Sen. Fatick	M Sembène	<i>Faidherbia albida</i>	Fab. Ingeae	AY625282	AY625429	AY625379
<i>aurivillii</i> (Blanc, 1889)	Sen. Fleuve	M Sembène	<i>Acacia tortilis</i>	Fab. Acacieae	AY625283	AY625430	AY625380
<i>bimaculatus</i> (Olivier, 1795)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Medicago marina</i>	Fab. Trifolieae	AY390640	AY390672	AY390704
<i>bernardi</i> Delobel & Anton, 2004	Ita. Basilicata	A Delobel	<i>Astragalus depressus</i>	Fab. Galegeae	AY945957	none	none
<i>cadei</i> Decelle, <i>in litt.</i>	Sen. Thies	H Delobel	<i>Faidherbia albida</i>	Fab. Ingeae	AY625284	AY625431	AY625381
<i>campylacanthae</i> Decelle, <i>in litt.</i>	Sen. Thies	H Delobel	<i>Acacia polyacantha</i>	Fab. Acacieae	AY625285	AY625432	AY625382
<i>caninus</i> (Kraatz, 1869)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Astragalus hamosus</i>	Fab. Galegeae	AY390641	AY390673	AY390705
<i>centromaculatus</i> (Allard, 1868)	Sen. Fleuve	MT Gueye	<i>Acacia nilotica</i>	Fab. Acacieae	AY625287	AY625434	AY625384
<i>chloroticus</i> (Dalm., 1833)	Sen. Fatick	H Delobel	<i>Sesbania pachycarpa</i>	Fab. Robinieae	AY625286	AY625433	AY625383
<i>dichrostachydis</i> Delobel & Anton, 2003	Sen. Fatick	H Delobel	<i>Dichrostachys cinerea</i>	Fab. Mimoseae	AY625288	AY625435	AY625385
<i>dispar</i> (Gyllenhal, 1833)	Fra. Montfuron	A Delobel	<i>Trifolium repens</i>	Fab. Trifolieae	AY945958	none	AY947507
<i>dialii</i> Decelle, 1973	Sen. Ziguinchor	A Delobel	<i>Dialium guineense</i>	Fab. Cassieae	AY625289	none	none
<i>elnaiensis</i> (Pic, 1921)	Ken. Kabarnet	B Le Rü	<i>Acacia dolichocephala</i>	Fab. Acacieae	AY625290	none	AY625386
<i>fulvicornis</i> (Motschulsky, 1874)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Trifolium vesiculosum</i>	Fab. Trifolieae	AY390644	AY380676	AY390708
<i>grandemaculatus</i> (Pic, 1933)	Ken. Tsavo	B Le Rü	<i>Acacia nilotica</i>	Fab. Acacieae	AY945959	none	AY947508
<i>incarnatus</i> (Boheman, 1833)	Egy. Bahariya (I)	G Fédière	<i>Vicia faba</i>	Fab. Vicieae	AY625292	AY625437	AY625388
<i>lineatopygus</i> (Pic, 1924)	Sen. Louga	H Delobel	<i>Indigofera tinctoria</i>	Fab. Indigoferae	AY625293	AY625438	AY625389
<i>lividimanus</i> (Gyllenhal, 1833)	Fra. Monsols	A Delobel	<i>Cytisus scorpius</i>	Fab. Cytiseae	AY390645	AY390677	AY390709
<i>marginalis</i> (Fabricius, 1776)	Fra. Montfuron	A Delobel	<i>Astrag. monspessulanus</i>	Fab. Galegeae	AY390646	AY390678	AY390710
<i>nanus</i> (Germar, 1824)	Ita. Basilicata	A Delobel	<i>Medicago orbicularis</i>	Fab. Trifolieae	AY390647	AY390679	AY390711
<i>niokolobaensis</i> (Decelle, 1969)	Sen. Thies	H Delobel	<i>Tephrosia bracteolata</i>	Fab. Millietiae	AY625294	AY625439	AY625390
<i>pauper</i> (Boheman, 1829)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Ornithopus compressus</i>	Fab. Loteae	AY390648	AY390680	AY390712
<i>picipes</i> (Germar, 1824)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Trifolium angustifolium</i>	Fab. Trifolieae	AY390649	AY390681	AY390713
<i>poecilus</i> (Germar, 1824)	Ita. Basilicata	A Delobel	<i>Astrag. contortuplicatus</i>	Fab. Galegeae	AY945960	AY947501	AY947509
<i>pusillus</i> (Germar, 1924)	Fra. Gard	A Delobel	<i>Hippocrepis emerus</i>	Fab. Loteae	AY390650	AY390682	AY390714
<i>pygidiopictus</i> Decelle, <i>in litt.</i>	Sen. Louga	M Sembène	<i>Faidherbia albida</i>	Fab. Ingeae	AY625295	AY624440	AY625391
<i>pygmaeus</i> (Boheman, 1833)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Trifolium angustifolium</i>	Fab. Trifolieae	AY390651	AY390683	AY390715
<i>quinqueguttatus</i> (Olivier, 1795)	Tur.	K-W. Anton	<i>Lupinus</i> sp. ¹	Fab. Cytiseae	AY945961	none	none
<i>raddianae</i> Anton & Delobel, 2003	Sen. Fleuve	M Sembène	<i>Acacia tortilis</i>	Fab. Acacieae	AY625297	AY625442	AY625393
<i>rubicundus</i> (Fahraeus, 1839)	Ken. Taveta	B Le Rü	<i>Acacia laeta</i>	Fab. Acacieae	AY625298	AY625443	AY625394
<i>rubiginosus</i> (Desbrochers, 1869)	Fra.	A Delobel	<i>Lupinus</i> sp.	Fab. Cytiseae	AY945962	AY947502	AY947510
<i>seminarius</i> (Linnaeus, 1767)	Fra. Séderon	A Delobel	<i>Lotus maritimus</i>	Fab. Loteae	AY390652	AY390684	AY390716
<i>sericatus</i> (Germar, 1824)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Trifolium angustifolium</i>	Fab. Trifolieae	AY390653	AY390685	AY390717
<i>submaculatus</i> (Fahraeus, 1839)	Sen. Fleuve	M Sembène	<i>Acacia senegal</i>	Fab. Acacieae	AY625301	AY625446	AY625397
<i>trifolii</i> (Motschulsky, 1874)	Egy. Bahariya (I)	G Fédière	<i>Trifolium alexandrinum</i>	Fab. Trifolieae	AY509806	AY509809	AY509812
<i>tuberculatus</i> (Hochhuth, 1847)	Kyr.	K-W. Anton	(not based on rearing)	Fab.	AY945963	none	none
<i>uberatus</i> (Fahraeus, 1895)	Sen. Fleuve	MT Gueye	<i>Acacia nilotica</i>	Fab. Acacieae	AY625302	AY625447	AY625398

<i>varipictus</i> (Motschulsky, 1874)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Medicago murex</i>	Fab. Trifolieae	AY390657	AY390689	AY390720
<i>villosus</i> (Fabricius, 1792)	Fra. Saclas	A Delobel	<i>Laburnum anagyroides</i>	Fab. Cytiseae	AY390655	AY390687	AY390719
<i>varius</i> (Olivier, 1795)	Fra. Corse	A Delobel	<i>Trifolium angustifolium</i>	Fab. Trifolieae	AY390656	AY390688	none
<i>Callosobruchus</i> Pic, 1902							
<i>chinensis</i> (Linnaeus, 1758)	Egy. Giza (I)	G Fédière	<i>Cajanus cajan</i>	Fab. Phaseoleae	AY625319	AY625465	AY625416
<i>maculatus</i> (Fabricius, 1775)	Vie. Saïgon (I)	H Delobel	<i>Vigna unguiculata</i>	Fab. Phaseoleae	AY625320	AY625466	AY625417
<i>phaseoli</i> (Gyllenhal, 1833)	Egy. Bahariya (I)	G Fédière	<i>Lablab purpureus</i>	Fab. Phaseoleae	AY625321	AY625467	AY625418
<i>subinnotatus</i> (Pic, 1914)	Sen. Cap Vert (I)	H Delobel	<i>Vigna subterranea</i>	Fab. Phaseoleae	AY625322	AY625468	AY625419
<i>Conicobruchus</i> Decelle, 1951							
<i>strangulatus</i> (Fahraeus, 1839)	Sen. Cap Vert	H Delobel	<i>Crotalaria podocarpa</i>	Fab. Crotalarieae	AY625323	AY625469	AY625420
<i>Decellebruchus</i> Borowiec, 1987							
<i>atrolineatus</i> (Pic, 1921)	Sen. Cap Vert	H Delobel	<i>Vigna unguiculata</i>	Fab. Phaseoleae	AY625324	AY625470	AY625421
<i>Gibbobruchus</i> Pic, 1913							
sp.	French Guyana	G Couturier	(unknown Cercidae)	Fab. Cercideae	AY625331	AY625477	AY625428
<i>Merobruchus</i> Bridwell, 1946							
<i>placidus</i> (Horn, 1873)	Mex. Coxcatlan	N Alvarez	<i>Leucaena leucocephala</i>	Fab. Mimoseae	AY945965	AY947504	AY947512
<i>Tuberculobruchus</i> Decelle, 1951							
<i>albizziarum</i> (Decelle, 1958)	Sen. Cap Vert (I)	H Delobel	<i>Albizia lebbek</i>	Fab. Ingeae	AY625325	AY635471	AY625422
<i>natalensis</i> (Pic, 1903)	Sen. Thies	H Delobel	<i>Acacia sieberiana</i>	Fab. Acacieae	AY625327	AY625473	AY625424
Subfamily Pachymerinae Bridwell, 1929							
Tribe Pachymerini Bridwell, 1929							
<i>Pachymerus</i> Thunberg, 1805							
<i>cardo</i> (Fahraeus, 1839)	French Guyana (I)	G Couturier	<i>Elaeis guineensis</i>	Arecaceae	AY390636	AY390668	AY390700

* Colombia (Col.), Ecuador (Ecu.), Egypt (Egy.), France (Fra.), Italy (Ita.), Kenya (Ken.), Kyrgistan (Kyr.), Mexico (Mex.), Nicaragua (Nic.), Panama (Pan.), Senegal (Sen.), Turkey (Tur.), Venezuela (Ven.), Vietnam (Vie.);

(I) introduced host-plant

† Host-plants systematic was abbreviated as follows: Fabaceae (Fab.), Malvaceae (Mal.)

¶ With high probability (A. Delobel, pers. comm..)

Table 2 : Host-plant use for the *Acanthoscelides* and *Bruchidius genera**

Host-plant systematic	Host-plant genus†	Host-plant distribution (by genus)	Estimated number of bruchid species‡	
			<i>Ac. spp.</i>	<i>Br. spp.</i>
Family Apiaceae			0	1
Family Cistaceae			1	3
Family Fabaceae				
Subfamily Caesalpinioideae				
Tribe Caesalpinieae	<i>Delonix</i> (3)	Old World	0	1
	<i>Hoffmannseggia</i> (26)	New World – Old World	1	0
Tribe Cassieae	<i>Apuleia</i> (1)	New World	3	0
	<i>Cassia</i> (73)	New World – Old World	1	1
	<i>Dialium</i> (30)	Old World	0	3
	<i>Senna</i> (234)	New World – Old World	5	4
Subfamily Mimosoideae				
Tribe Acacieae	<i>Acacia</i> (431)	New World – Old World	3	45
Tribe Ingeae	<i>Albizia</i> (70)	New World – Old World	0	22
	<i>Faidherbia</i> (1)	Old World	0	4
Tribe Mimoseae	<i>Desmanthus</i> (24)	New World	5	0
	<i>Dichrostachys</i> (5)	Old World	0	3
	<i>Leucaena</i> (25)	New World	4	0
	<i>Mimosa</i> (523)	New World – Old World	19	1
	<i>Piptadenia</i> (32)	New World	2	0
	<i>Prosopis</i> (45)	New World – Old World	1	1 (I)
Tribe Parkieae	<i>Parkia</i> (31)	New World – Old World	7	0
Subfamily Papilionoideae				
Tribe Aeschynomeneae	<i>Aeschynomene</i> (170)	New World – Old World	4	2
	<i>Chaetocalyx</i> (13)	New World	1	0
	<i>Nissolia</i> (14)	New World	2	0
	<i>Stylonsanthes</i> (41)	New World – Old World	1	0
Tribe Amorpheae	<i>Amorpha</i> (16)	New World	3	0
	<i>Dalea</i> (170)	New World	7	0
	<i>Errazurizia</i> (4)	New World	1	0
	<i>Parryella</i> (1)	New World	1	0
Tribe Cicereae	<i>Cicer</i> (31)	Old World	1 (I)	2
Tribe Cytiseae	<i>Adenocarpus</i> (15)	Old World	0	2
	<i>Argyrocytistus</i> (1)	Old World	0	1
	<i>Calicotome</i> (4)	Old World	0	2
	<i>Cytisophyllum</i> (1)	Old World	0	2
	<i>Cytisus</i> (62)	Old World	0	8
	<i>Genista</i> (114)	Old World	0	4
	<i>Laburnum</i> (2)	Old World	0	4
	<i>Lupinus</i> (463)	New World – Old World	0	2
	<i>Petteria</i> (1)	Old World	0	2
	<i>Spartium</i> (1)	Old World	0	4
Tribe Desmodieae	<i>Desmodium</i> (268)	New World – Old World	13	7
	<i>Lespedeza</i> (29)	New World – Old World	1	1
	<i>Pseudarthria</i> (5)	Old World	0	1
Tribe Galegeae	<i>Astragalus</i> (1399)	New World – Old World	7	13
	<i>Alhagi</i> (4)	Old World	0	3
	<i>Galega</i> (6)	Old World	0	1
	<i>Glycyrrhiza</i> (17)	New World – Old World	2	5

	<i>Halimodendron</i> (1)	Old World	0	1
	<i>Oxytropis</i> (173)	New World – Old World	1	2
	<i>Sphaerophysa</i> (2)	Old World	0	1
Tribe Hedysareae				
	<i>Hedysarum</i> (69)	New World – Old World	1	2
	<i>Onobrychis</i> (117)	Old World	0	7
Tribe Indigofereae				
	<i>Indigofera</i> (554)	New World – Old World	5	11
Tribe Loteae				
	<i>Acmispon</i> (8)	New World	1	0
	<i>Anthyllis</i> (22)	Old World	0	2
	<i>Coronilla</i> (9)	Old World	0	3
	<i>Dorycnium</i> (8)	Old World	0	1
	<i>Hippocrepis</i> (29)	Old World	0	1
	<i>Hosackia</i> (11)	New World	1	0
	<i>Hymenocarpus</i> (1)	Old World	0	1
	<i>Lotus</i> (116)	Old World	0	2
	<i>Ornithopus</i> (6)	New World – Old World	0	2
	<i>Ottleya</i> (12)	New World	1	0
	<i>Scorpiurus</i> (3)	Old World	0	1
	<i>Securigera</i> (13)	Old World	0	3
	<i>Syrmatium</i> (14)	New World	1	0
Tribe Milletieae	<i>Tephrosia</i> (307)	New World – Old World	3	3
Tribe Phaseoleae				
	<i>Cajanus</i> (17)	New World	1 (I)	0
	<i>Calopogonium</i> (9)	New World	6	0
	<i>Eriosema</i> (146)	New World – Old World	2	0
	<i>Flemingia</i> (13)	New World	1 (I)	0
	<i>Galactia</i> (98)	New World	2	0
	<i>Lablab</i> (2)	Old World	1 (I)	2
	<i>Macroptilium</i> (14)	New World	1	0
	<i>Pachyrhizus</i> (4)	New World	2	0
	<i>Phaseolus</i> (36)	New World – Old World	4	0
	<i>Rynchosia</i> (221)	New World – Old World	12	0
	<i>Teramnus</i> (8)	New World – Old World	2	1
	<i>Vigna</i> (86)	New World – Old World	5	1
Tribe Robinieae	<i>Sesbania</i> (52)	New World – Old World	2	6
Tribe Trifolieae				
	<i>Medicago</i> (74)	Old World	0	5
	<i>Trifolium</i> (227)	New World – Old World	3	10
	<i>Trigonella</i> (72)	Old World	0	2
Tribe Vicieae				
	<i>Lathyrus</i> (127)	New World – Old World	1 (I)	1
	<i>Lens</i> (4)	Old World	1 (I)	2
	<i>Pisum</i> (3)	Old World	1 (I)	3
	<i>Vicia</i> (193)	New World – Old World	1 (I)	5
Family Lythraceae			1	0
Family Malvaceae				
Subfamily Malvoideae			31	0
Subfamily Sterculioideae			2	0
Subfamily Tilioideae			7	0
Family Onagraceae			1	0
Family Rhamnaceae			1	0
Family Verbenaceae			1	0

* including *Decellebruchus* spp. and *Tuberculobruchus* spp.

† the estimated numbers of species for each plant genus is given into parentheses

‡ (I) : introduced host-plant. Although the corresponding plant genus originates from the other area of distribution (New World or Old World), a bruchid species has managed to develop upon it

Table 3 : Host-plant preference for existing *Acanthoscelides* and *Bruchidius* taxonomic groups

Taxonomic groups*	References†	Host-plant preference‡	
(Acanthoscelides)			
<i>aequalis</i>	Johnson 1983	subfamily Malvoideae	(exclusively)
<i>albopygus</i>	Johnson 1983	tribe Acacieae	(mainly)
<i>blanchardi</i>	Johnson 1983	subfamily Malvoideae	(mainly)
<i>chiricahuae</i>	Johnson 1983	tribe Mimoseae	(exclusively)
<i>flavescens</i>	Johnson 1983	tribe Phaseoleae	(mainly)
<i>megacornis</i>	Johnson 1983	subfamily Tilioideae	(mainly)
<i>mexicanus</i>	Johnson 1983	tribe Mimoseae	(mainly)
<i>mundulus</i>	Johnson 1983	tribe Aeschynomeneae	(exclusively)
<i>obtectus</i>	Johnson 1983	tribe Phaseoleae	(exclusively)
<i>pertinax</i>	Johnson 1983	tribe Desmodieae	(mainly)
<i>puellus</i>	Johnson 1983	tribe Phaseoleae	(mainly)
<i>quadridentatus</i>	Johnson 1983	tribe Mimoseae	(mainly)
(Bruchidius)			
<i>astragali</i>	Borowiec 1988; Delobel <i>et al.</i> 2004	tribe Galegeae	(exclusively)
<i>bimaculatus</i>	Borowiec 1988	tribe Trifolieae	(exclusively)
<i>centromaculatus</i>	Anton & Delobel 2003	tribe Acacieae	(exclusively)
<i>foveolatus</i>	Borowiec 1988	tribe Trifolieae	(mainly)
<i>glycyrrhizae</i>	Borowiec 1988	tribe Galegeae	(exclusively)
<i>murinus</i>	Borowiec 1988	tribe Trifolieae	(exclusively)
<i>seminarius</i>	Borowiec 1988; Anton 1998	various tribes	
<i>serraticornis</i>	K.-W. Anton <i>pers. comm.</i>	tribe Cytiseae	(mainly)
<i>tibialis</i>	Borowiec 1988	tribe Trifolieae	(exclusively)
<i>unicolor</i>	Borowiec 1988; A. Delobel <i>pers. comm.</i>	tribe Hedysareae	(mainly)
<i>varius</i>	Borowiec 1988	tribe Trifolieae	(mainly)

* only taxonomic groups with more than one species and those for which host plants are known for at least two species were studied

† sources used to circumscribe the taxonomic groups

‡ (mainly) indicates that more than 50 % of the species were associated with a specific plant group;

host-plant data were missing for about 20 % of the species belonging to the studied taxonomic groups

Figure 1

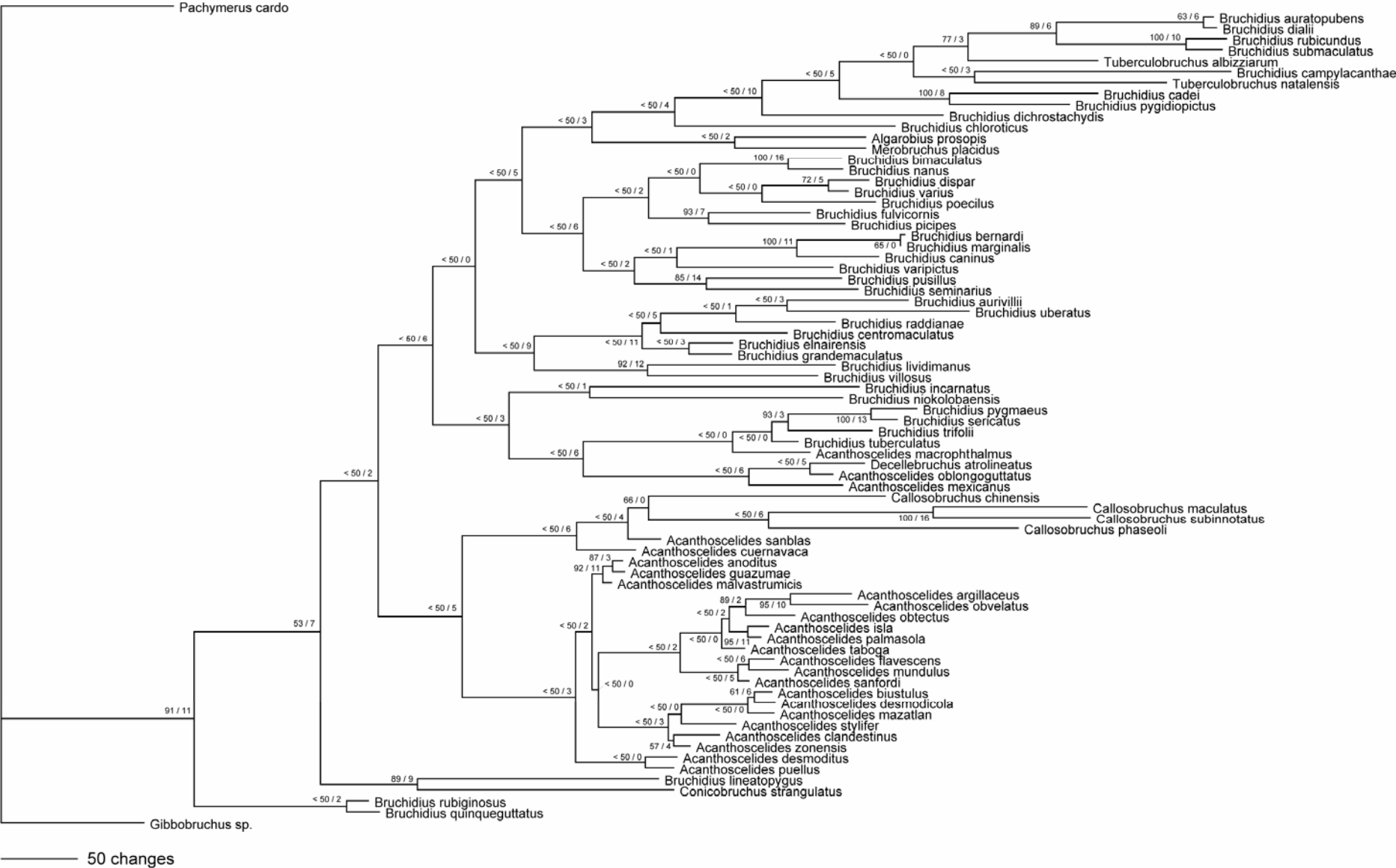


Figure 2

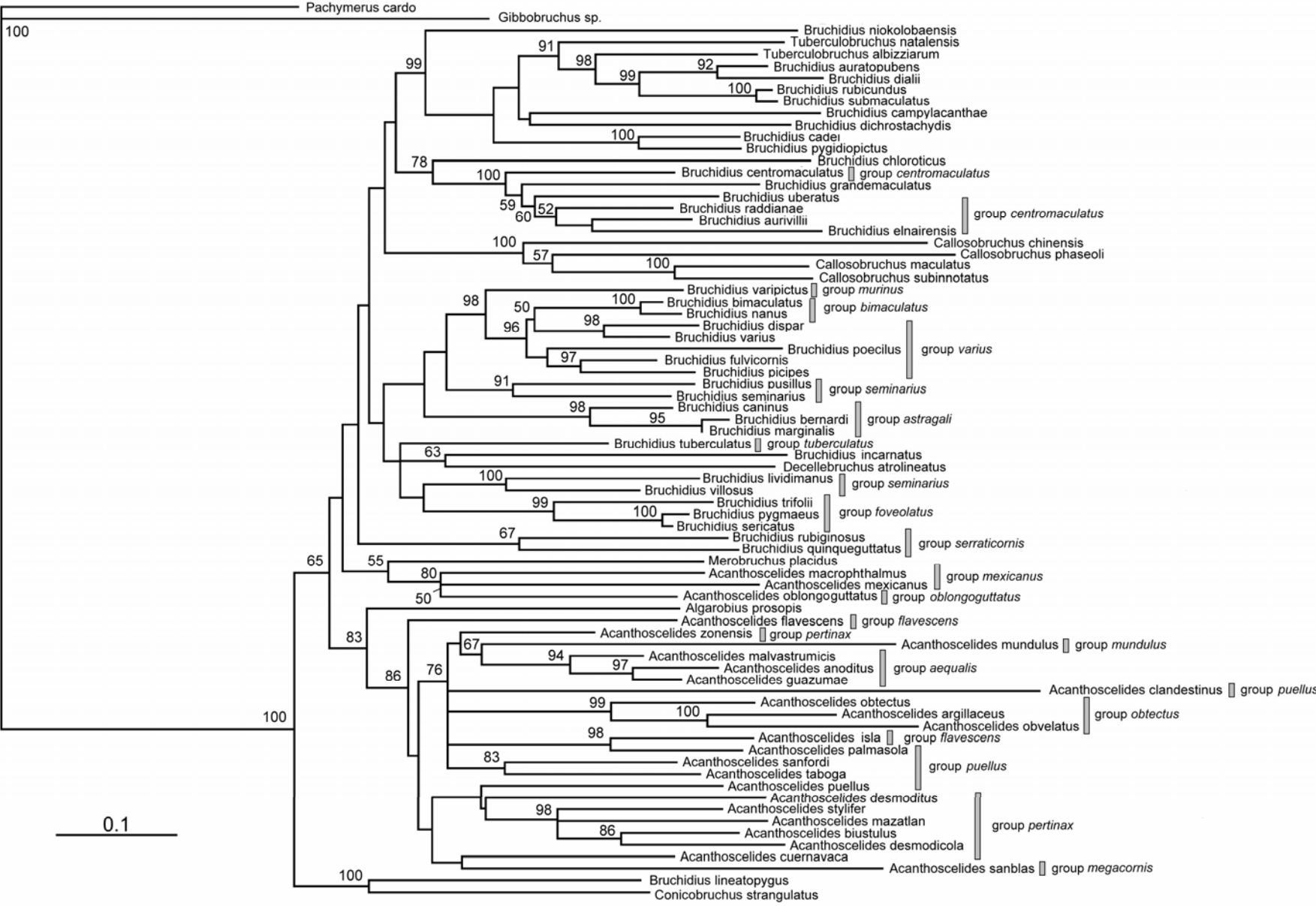


Figure 3

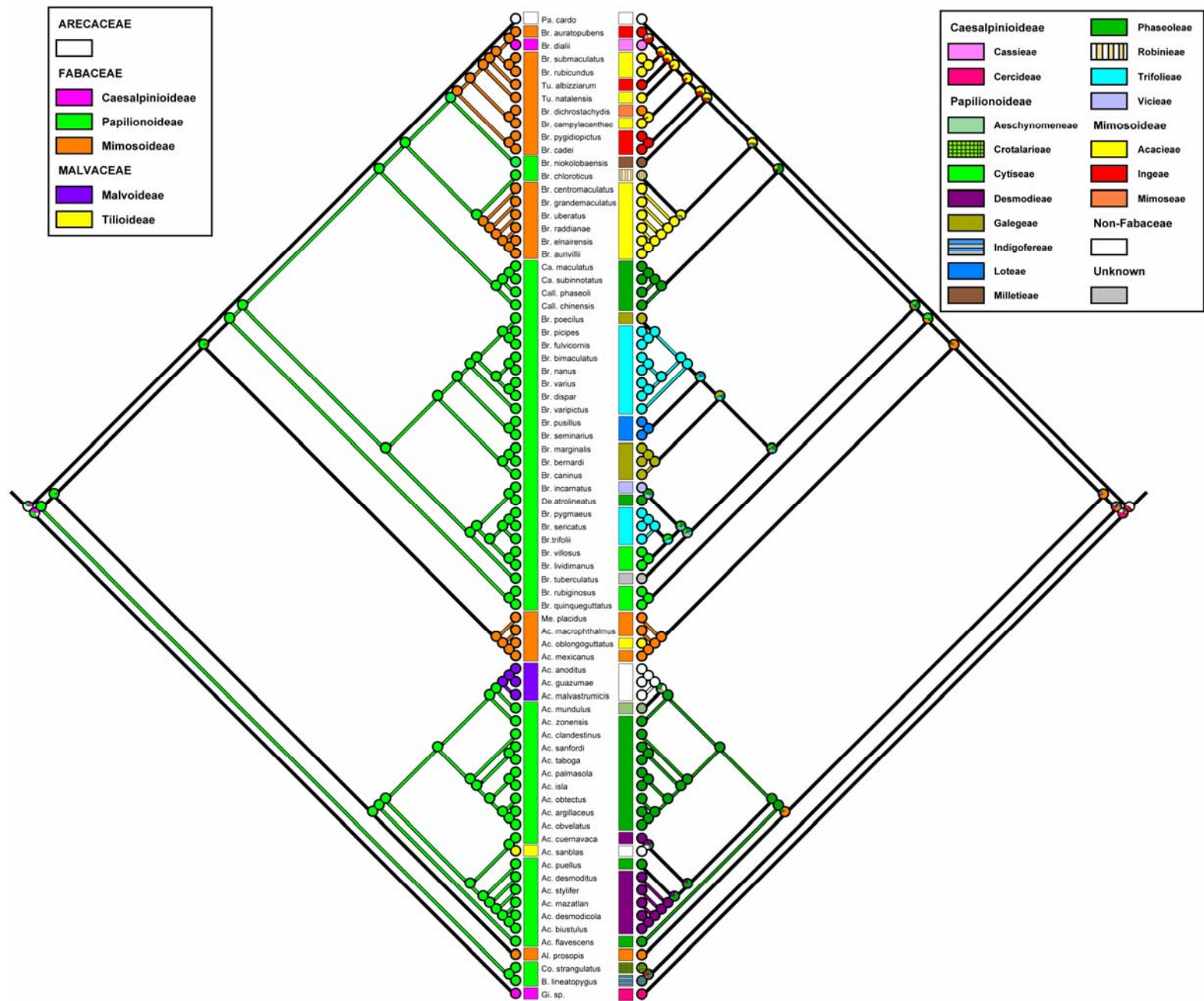
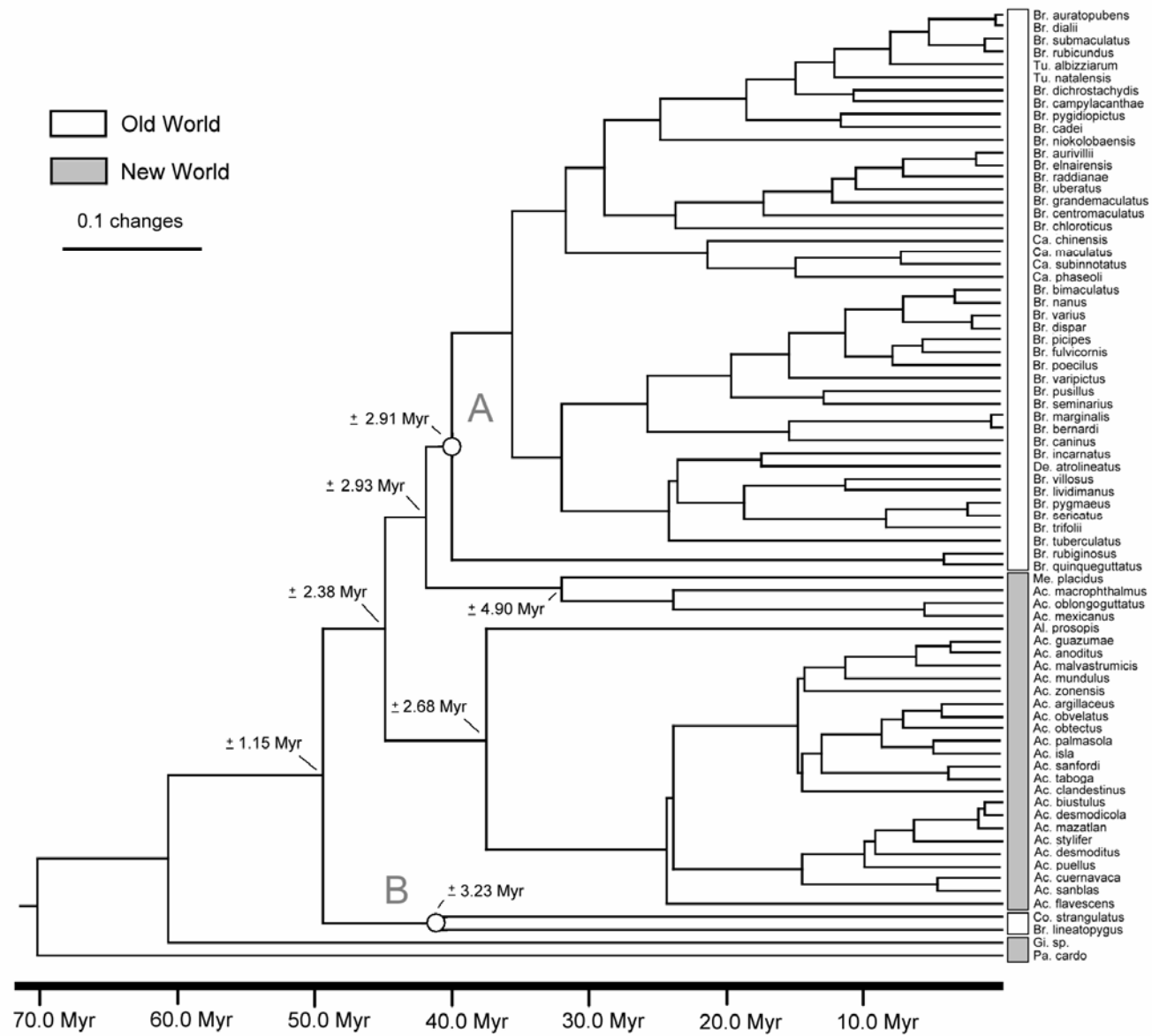


Figure 4



Section IV : Discussion

4.1. Systématique

Même si l'étude de la systématique des Bruchidae ne constituait pas un des objectifs principaux de cette thèse, les résultats des analyses phylogénétiques ont permis de clarifier et de remettre en question plusieurs points importants relatifs à la systématique de la famille.

Concernant les sous-familles, les analyses phylogénétiques effectuées ne regroupent pas les trois représentants de la sous-famille des Pachymerinae. Cette paraphylie des Pachymerinae a été aussi retrouvée par G. Morse (com. pers.). En conséquence, la sous-famille des Bruchinae ressort également comme paraphylétique quand on inclut plusieurs membres de la sous-famille des Pachymerinae. Afin de préciser ce point, il semble important de reconduire et de préciser ces résultats préliminaires en incluant la majorité des genres appartenants aux deux-sous familles. Concernant la sous-familles des Amblycerinae, il semble difficile d'être catégorique à ce stade de l'analyse. La plupart des analyses qui ont utilisées des Amblycerinae les regroupent, mais le soutien statistique de ces regroupements est assez faible.

Au niveau des tribus, la tribu des Bruchini (Bruchinae), qui est formée par les représentants du genre *Bruchus*, ressort monophylétique dans toutes les analyses qui ont été menées. A contrario, la tribu des Acanthoscelidini apparaît comme paraphylétique dans presque toutes les analyses. Un genre en particulier, le genre *Paleacanthoscelides* (Bruchinae, Acanthoscelidini) ressort comme étant le groupe frère du genre *Bruchus*. Ces deux genres présentent des similitudes dans la structure de leur génitalias mâles (absence d'anneau basal en particulier), ce qui renforce la confiance que l'on peut avoir dans ce statut de groupe-frère du genre *Paleoacanthoscelides*.

Enfin au niveau des genres, les résultats de nos analyses indiquent qu'au moins trois genres sont paraphylétiques, à savoir les genres *Acanthoscelides*, *Bruchidius* et *Tuberculobruchus*. Pour chacun de ces genres, on peut distinguer au moins deux ou trois ensemble bien distincts qui sont bien soutenus (voir Fig. 3.6.).

Un dernier point concerne la validité de groupes taxonomiques existants (voir Kergoat *et al.*, 2004). Il apparaît qu'une partie de ces groupes correspond bien à des ensembles monophylétiques, mais il est nécessaire d'inclure dans de futures analyses toutes les espèces qui appartiennent à ces groupes si l'on veut préciser leur statut de façon formelle.

Tous ces résultat suggèrent la nécessité d'une révision profonde de la classification des Bruchidae proposée par Bridwell (1929, 1932, 1946). Les contours des sous-familles et des tribus existantes sont à redéfinir, en se basant sur des analyses moléculaires exhaustives et la prise en compte systématique des données des génitalias mâles. En ce qui concerne les genres riches en espèces comme les genres *Acanthoscelides* et *Bruchidius*, il semble nécessaire de les diviser en une série de nouveaux genres. Cette division devra certainement se baser en grande partie sur des analyses moléculaires en raison du faible nombre de caractères morphologiques discriminants (Borowiec, 1987a).

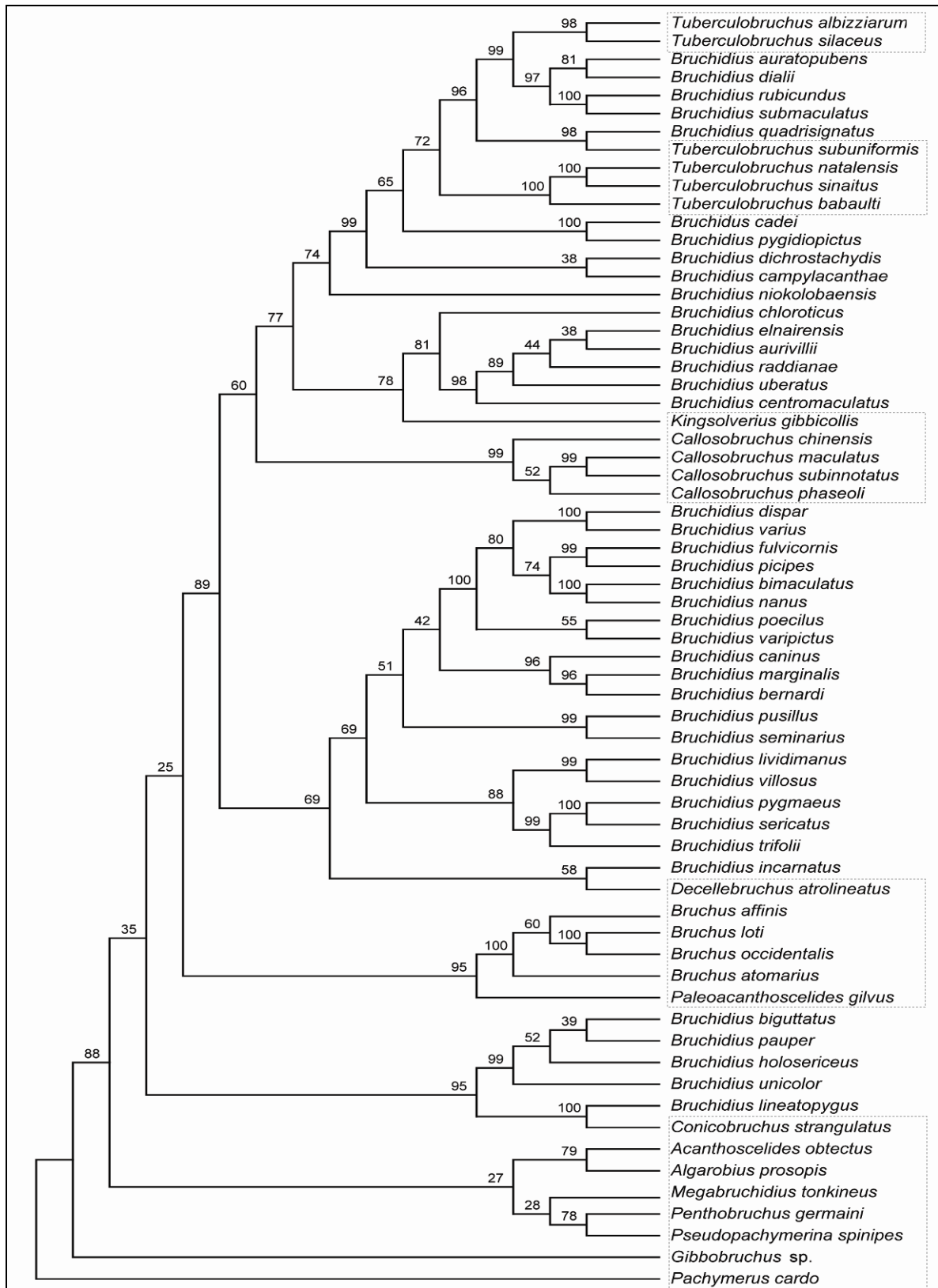


Figure 3.6. Figure (modifiée d'après Kergoat & Silvain, 2004) qui correspond à la topologie obtenue par une analyse partitionnée en inférence bayésienne. Les espèces n'appartenant pas au genre *Bruchidius* sont encadrées, ce qui souligne la paraphylie du genre *Bruchidius*, mais aussi celle du genre *Tuberculobruchus*. On peut aussi observer la position de *Paleoacanthoscelides gilvus* (Bruchinae, Acanthoscelidini) en groupe frère des espèces du genre *Bruchus* (Bruchinae, Bruchini).

4.2. Evolution et relations évolutives avec les plantes-hôtes

Plusieurs résultats significatifs peuvent être mis en évidence dans cette étude.

Le premier a trait au degré de spécialisation qui a été constaté chez les espèces étudiées, et en particulier chez les espèces du genre *Bruchidius*. Que ce soit pour les espèces européennes de l'échantillon, ou pour les espèces africaines, on observe une très forte spécialisation des insectes sur un nombre limité de plantes-hôtes. La plupart des espèces se nourrissent sur un nombre limité d'espèces de plantes qui appartiennent à une même tribu, voir sur des plantes appartenant à un genre donné⁷⁹. Les cas de spécialisation les plus poussés ont été mis en évidence chez des espèces africaines associées aux acacias appartenant aux genres *Bruchidius* et *Tuberculobruchus*. En effet, chez ces espèces, on observe une spécialisation systématique et exclusive sur un sous-genre donné du genre *Acacia* (sous-genre *Acacia* ou sous-genre *Aculeiferum*). Ces résultats sont particulièrement pertinents en raison du fait qu'ils reposent majoritairement sur des données d'élevage. Si l'on inclut toutes les données de la littérature sur les plantes-hôtes supposées des bruches, comme cela a été le cas pour dans le catalogue des Bruchidae (Udayagiri & Wadhi, 1989), on peut arriver à avoir une idée complètement différente et erronée du degré de spécialisation de ces insectes.

Un autre résultat intéressant est relatif au conservatisme taxonomique des associations plantes-insectes. En optimisant l'évolution du caractère « plante-hôtes »⁸⁰ sur les phylogénies des bruches de notre échantillon, il a été possible de mettre en évidence un fort conservatisme taxonomique des associations plantes-insectes. La majorité des espèces de bruches qui sont phylogénétiquement proches sont ainsi associées à des plantes qui le sont également. Ce conservatisme taxonomique est particulièrement manifeste si l'on optimise le caractère « sous-famille » des plantes-hôtes (pour les plantes-hôtes de la famille des Fabaceae). Ces optimisations suggèrent également que les plantes de la sous-famille des Papilionoideae constituent vraisemblablement les plantes-hôtes ancestrales des espèces appartenant aux genres *Acanthoscelides* et *Bruchidius*. De façon intéressante, plusieurs groupes sont passés indépendamment sur des plantes de la sous-famille des Caesalpinioideae et Mimosoideae. Ces colonisations se sont opérées à la fois dans l'Ancien et le Nouveau Monde, chez des représentants des deux genres *Acanthoscelides* et *Bruchidius*. Par contre, il est difficile d'estimer si ces changements d'hôtes entre plantes phylogénétiquement éloignées présentent un caractère réversible. Pour les espèces étudiées, nos données ne fournissent aucun exemple d'un retour secondaire vers des plantes anciennement exploitées.

Ce fort conservatisme taxonomique des associations plantes-insectes a permis de poser la question d'une éventuelle congruence entre la phylogénie des bruches et la phylogénie des plantes-hôtes. La figure 3.7. illustre la démarche qui a été suivie afin de tester cette hypothèse de co-cladogénèse, à partir des résultats des analyses phylogénétiques de Wink & Mohamed (2003), pour les plantes-hôtes, et de Kergoat *et al.* (2004), pour les bruches. On observe qu'il n'y a pas congruence entre les phylogénies des insectes et celle des plantes. Cette incongruence se retrouve également quand on compare les phylogénies des espèces africaines de l'échantillon, ou encore les phylogénies des espèces sud-américaines du genre *Acanthoscelides*.

⁷⁹ ce qui correspond à de l'oligophagie ou de la monophagie

⁸⁰ en général on a optimisé les associations à des tribus ou à des genres ou sous-genres donnés (cas du genre *Acacia*)

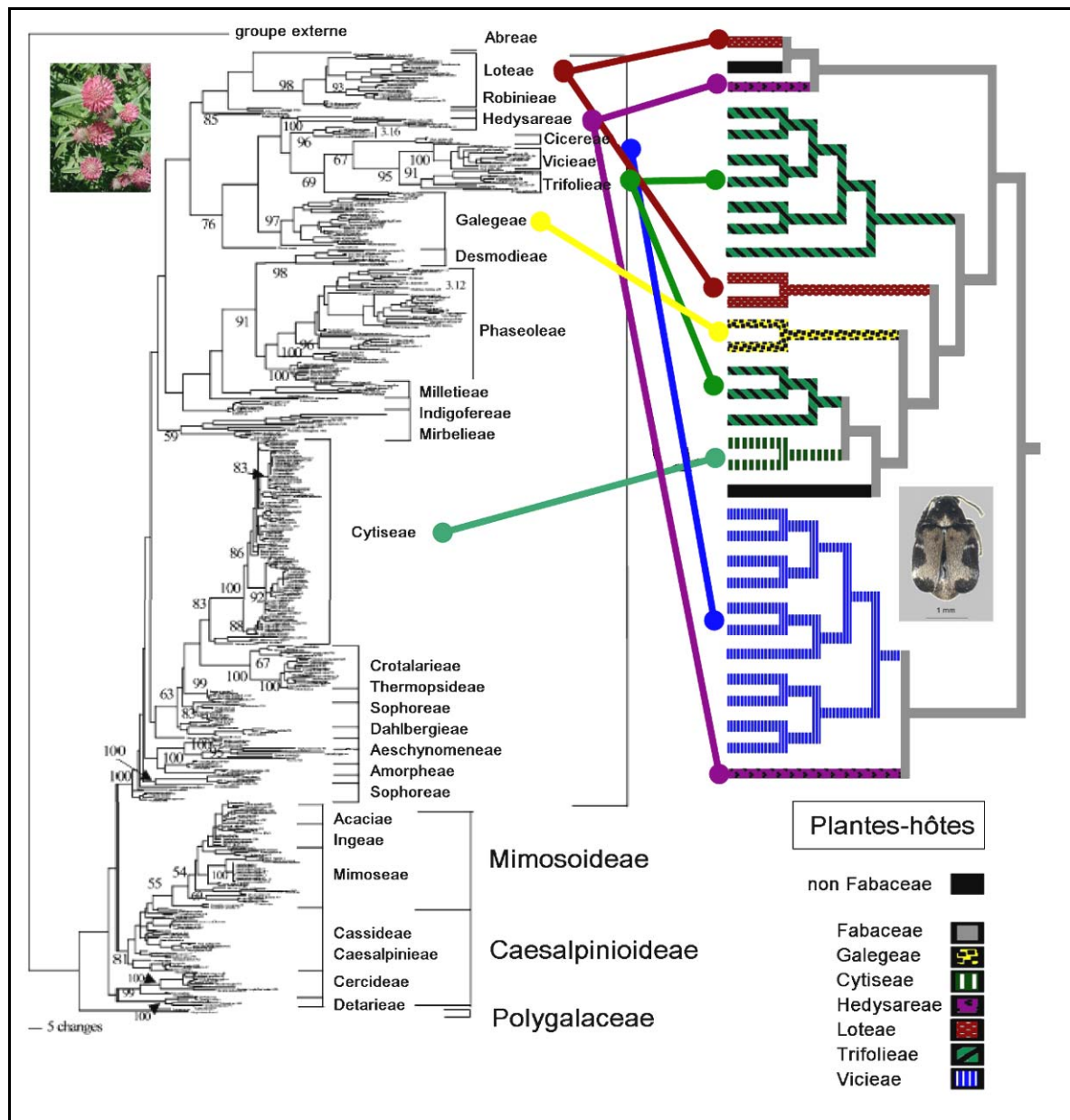


Figure 3.7. Figure (modifiée d'après Wink & Mohamed, 2003 et Kergoat *et al.*, 2004) illustrant l'incongruence entre les phylogénies des plantes (à gauche) et des insectes (à droite).

A la fin de l'article sur les espèces européennes on pose la question de savoir quelles sont les causes possibles de la spécialisation marquée et du fort conservatisme taxonomique des associations plantes-insectes que l'on observe chez les espèces étudiées. Un élément de réponse est fournis par l'étude qui a suivie, sur les espèces africaines. Dans cette étude des données exhaustives sur les composés secondaires toxiques présents dans les graines ont été incluses et optimisées sur la phylogénies des bruches. Les résultats de ces travaux ont été à la hauteur de nos espérances. En effet, notre objectif dans cette étude était de mettre en évidence le rôle des composés toxiques des graines comme contrainte évolutive sur la diversification des insectes (modèle de spécialisation chimique). A l'exception de quelques rares travaux (comme Becerra, 1997), il est difficile de mettre en évidence ce rôle des composés chimiques car des plantes phylogénétiquement proches partagent généralement les mêmes composés

secondaires. Pour les espèces africaines étudiées, il est apparu que la phylogénie des plantes-hôtes ne pouvait expliquer à elle seule toutes les associations observées. Au contraire, pour un clade donné, des bruches phylogénétiquement proches n'étaient pas associées avec des plantes-hôtes phylogénétiquement apparentées (voir Fig. 3.8.).

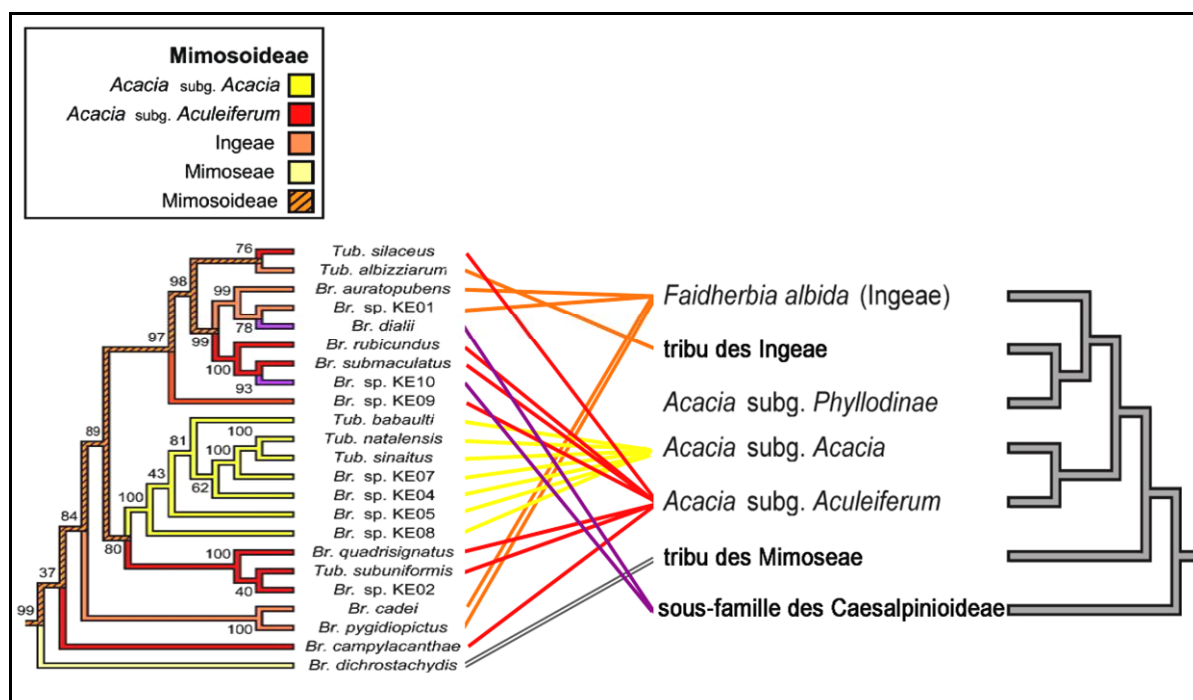


Figure 3.8. Figure illustrant l'incongruence entre les phylogénies des insectes (à gauche) et des plantes (à droite).

De façon intéressante, la radiation de ce groupe de bruches était mieux expliquée par la nature des composés secondaires toxiques des graines qui est apparu comme le facteur majeur qui explique des espèces qui se sont spécialisés sur les sous-familles des Caesalpinioideae et Mimosoideae. S'il est difficile de généraliser cette conclusion à toutes les espèces étudiées, l'hypothèse d'une diversification des bruches avec pour contrainte la nature des composés secondaires toxiques des graines⁸¹ apparaît comme étant plausible, du moins pour les espèces du genre *Bruchidius*.

La dernière étude a porté sur des espèces appartenant aux genres *Acanthoscelides* et *Bruchidius*. On a observé chez les espèces étudiées du genre *Acanthoscelides* un conservatisme taxonomique comparable à celui rencontré chez les *Bruchidius*. Une revue critique des données de la littérature combinée à des données d'élevage a mis en exergue le fait que les espèces des deux genres sont généralement associés aux mêmes plantes-hôtes quand ces dernières sont distribuées dans l'Ancien et le Nouveau monde. Ainsi, sur les seize tribus de Papilionoideae colonisées par ces bruches, quatorze le sont par des espèces deux genres. Cette étude suggère en outre une préadaptation généralisée à de nombreux composés toxiques, ou des apparitions multiples et indépendantes de capacités de détoxification dans leurs histoires évolutives respectives. Ces résultats suggèrent donc une évolution parallèle pour ces deux genres qui ont colonisés les mêmes niches de façon indépendante au cours de leur histoire.

⁸¹ cela correspond au modèle de spécialisation chimique, où les insectes se diversifient sur des plantes contenant des composés secondaires similaires

Conclusion

Cette étude sur les Coléoptères Bruchidae du genre *Bruchidius* permet de dégager plusieurs enseignements de valeur générale.

Tout d'abord, on rejoint les conclusions de certains auteurs qui font état d'une spécialisation accrue chez les insectes phytophages endophytes (Anderson, 1995 ; Gaston *et al.*, 1992 ; Marvaldi *et al.*, 2002). En effet, à travers les données d'élevage qui ont été obtenues et des revues critiques des données de la littérature, un fort niveau de spécialisation chez les espèces du genre *Bruchidius* a été mis en évidence.

D'une manière générale, nos résultats indiquent un très fort conservatisme taxonomique dans les associations plantes-bruches qui ne correspond pas à une cospéciation entre les insectes et leur plantes-hôtes. En effet, les phylogénies des bruches ne sont pas congruentes avec les phylogénies de leurs plantes-hôtes.

Il semble plutôt que ce fort conservatisme taxonomique soit lié au rôle des composés secondaires toxiques des graines dans la diversification des bruches. Il est ainsi vraisemblable que de nombreux groupes de Bruchidae se diversifient sur des plantes contenant des composés secondaires similaires, à l'instar des espèces du clade africain qui est associé à des plantes appartenant aux sous-familles des Caesalpinioideae et Mimosoideae (modèle de spécialisation chimique). Cette compréhension du rôle des composés toxiques des graines dans les phénomènes de changements d'hôtes (et donc de spéciation) est importante, car elle peut permettre de prévoir quelles sont les espèces qui pourront potentiellement passer sur certaines plantes cultivées.

Sur un plan méthodologique, il est intéressant de mettre en avant les mérites des approches bayésiennes qui ont été utilisées en inférence phylogénétique. Dans le cadre de cette étude, la prise en compte de l'hétérogénéité de jeux de données multiples, au moyen d'analyses partitionnées, a constitué une avancée conséquente qui a permis d'obtenir des phylogénies robustes pour un nombre important d'espèces.

Bibliographie

- Anderson, R.S. 1995. An evolutionary perspective of diversity in Curculionoidea. *Memoirs of the Entomological Society of Washington* 14: 103-114.
- Anton, K.-W. 1994. The Bruchidae (Coleoptera) of Oman, with descriptions of a new genus and two new species. *Fauna of Saudi Arabia* 14: 105-112.
- Anton, K.-W. 1998a. Results of the Czechoslovak-Iranian entomological expeditions to Iran 1970, 1973 and 1977: Coleoptera Bruchidae. *Casopis Narodniho muzea Rada prirodovedna* 167: 73-90.
- Anton, K.-W. 1998b. Revision of the genus *Bruchidius*. Part I: the *B. seminarius* group (Coleoptera: Bruchidae). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Ser. A* 573: S1-S13.
- Anton, K.-W. 1999a. Notes on *Borowiecius* Anton, with the description of a new species (Coleoptera : Bruchidae : Bruchinae). *Genus* 10:65-72.
- Anton, K.-W. 1999b. *Caryopemon transversovittatus* n. sp. from Oriental Region (Coleoptera : Bruchidae : Pachymerinae). *Genus* 10: 395-398.
- Anton, K.-W. 1999c. *Bruchidius tenerifensis*, a new species of the *B. cisti* group from the Canary Islands (Coleoptera : Bruchidae : Bruchinae). *Genus* 10: 399-402.
- Anton, K.-W. 1999d. Revision of the genus *Sulcobruchus* Chujo 1937 and the description of *Parasulcobruchus* nov. Gen. (Coleoptera, Bruchidae, Bruchinae). *Linzer biologische Beiträge* 31: 629-650.
- Anton, K.-W. 2000. Five new species of the *Callosobruchus chinensis* group from the Oriental Region and Australia (Coleoptera : Bruchidae : Bruchinae). *Genus* 11: 13-28.
- Anton, K.-W. & Delobel, A. 2003. African species of the *Bruchidius centromaculatus* group with "eyed" female pygidium (Coleoptera: Bruchidae: Bruchinae). *Genus* 14: 159-190.
- Anton, K.-W. & Delobel, A. 2004. Description of five new species in the genus *Caryedon* Schoenherr, with a taxonomical note on *Caryedon angeri* (Semenov) (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae). *Genus* 15: 65-90.
- Archibald, S.B. & Mathewes, R.W. 2000. Early Eocene insects from Quilchena, British Columbia, and their paleoclimatic implications. *Canadian Journal of Zoology* 78: 1441-1462.
- Baker, R.H. & DeSalle, R. 1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of the Hawaiian drosophilids. *Systematic Biology* 46: 645-673.
- Baker, R.H., Yu, X. & DeSalle, R. 1998. Assessing the relative contribution of molecular and morphological characters in simultaneous analysis trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 427-436.

- Berenbaum, M. 1983. Coumarins and caterpillars: a case for coevolution. *Evolution* 37: 163-179.
- Becerra, J.X. 1997. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science* 276: 253-256.
- Berenbaum M., Favret, C. & Schuler, M.A. 1996. On defining "key innovation" in an adaptative radiation: cytochrome P450S and Papilionidae. *American Naturalist* 148: S139-S155.
- Bernays, E.A. 1998. Evolution of feeding behavior in insect herbivores. *Bioscience* 48: 35-44.
- Bernays, E.A. & Chapman, R.F. 1994. *Host-plant selection by Phytophagous insects*. Chapman and Hall, London.
- Bleiler, J.A., Rosenthal, G.A. & Janzen, D.H. 1988. Biochemical ecology of canavanine-eating seed predators. *Ecology* 69: 427-433.
- Bollback, J.P. 2002. Bayesian model adequacy and choice in phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1171-1180.
- Borowiec, L. 1984. Two new genera and species of seed-beetles from the Oriental Region (Coleoptera, Bruchidae, Bruchinae). *Polskie Pismo Entomologiczne* 54: 115-129.
- Borowiec, L. 1985a. New synonym and new distributional data of Palaearctic seed-beetles (Coleoptera, Bruchidae). *Polskie Pismo Entomologiczne* 55: 205-207.
- Borowiec, L. 1985b. The seminarius-group of Bruchidius Schilsky (Coleoptera, Bruchidae), with description of three new species. *Polskie Pismo Entomologiczne* 55: 767-779.
- Borowiec, L. 1986. The seed-beetle from Yugoslavia, Albania and Greece (Coleoptera, Bruchidae). *Polskie Pismo Entomologiczne* 56: 577-592.
- Borowiec, L. 1987a. The genera of seed-beetles (Coleoptera, Bruchidae). *Polskie Pismo Entomologiczne* 57: 3-207.
- Borowiec, L. 1987b. The seed-beetles (Coleoptera, Bruchidae) from the Middle East. *Polskie Pismo Entomologiczne* 57: 601-616.
- Borowiec, L. 1988. *Bruchidae-Strakowce (Insecta: Coleoptera)*. *Fauna Polski, tom 11*. PWN, Warszawa.
- Böving, A.G. & Craighead, F.C. 1931. An illustrated synopsis of the principal larval forms of the order Coleoptera. *Entomologica Americana* 11: 1-351.
- Bremer, K. 1988. The limits of amino-acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- Bridwell, J.C. 1929. A preliminary generic arrangement of the palm bruchids and allies with description of new species. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 31: 141-160.

- Bridwell, J.C. 1932. The subfamilies of the Bruchidae (Coleoptera) *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 34: 100-106.
- Bridwell, J.C. 1946. The genera of the family Bruchidae in America north of Mexico. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 36: 52-57.
- Broughton, R.E., Stanley, S.E. & Durrett, R.T. 2000. Quantification of homoplasy for nucleotide transitions and transversions and a reexamination of assumptions in weighted phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 49: 617-627.
- Bucheli, S., Landry, J.-F. & Wenzel, J. 2002. Larval case architecture and implications of host-plant associations for north american *Coleophora* (Lepidoptera; Coleophoridae). *Cladistics* 18: 71-93.
- Buckley, T.R., Simon, C., Flook, P.K. & Misof, B. 2000. Secondary structure and conserved motifs of the frequently sequenced domains IV and V of the insect mitochondrial large subunit rRNA gene. *Insect Molecular Biology* 9: 565-580.
- Bull, J.J., Huelsenbeck, J.P., Cunningham, C.W., Swofford, D.L. & Waddell, P.J. 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 384-397.
- Camin, J.H. & Sokal, R.R. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution* 19: 311-326.
- Caron, E., Ribeiro-Costa, C.S. & Linzmeier, A.M. 2004. The egg morphology of some species of *Sennius* Bridwell (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) based on scanning electron micrographs. *Zootaxa* 556: 1-10.
- Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F.A.H. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45: 1-54.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Edwards, A.W.F. 1967. Phylogenetic Analysis: Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.
- Center, T.D. & Johnson, C.D. 1974. Coevolution of some seed beetles (Coleoptera: Bruchidae) and their hosts. *Ecology* 55: 1096-1103.
- Choong-Gon, K., Hong-Zhang, Z., Imura, Y., Tominaga, O., Su, Z.-H. & Osawa, S. 2000. Pattern of morphological diversification in the *Leptocarabus* ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as deduced from mitochondrial ND5 gene and nuclear 28S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 17: 137-145.
- Coetzer, W. 2000. Oviposition preference of *Sulcobruchus subsuturalis* (Pic) (Coleoptera: Bruchidae), an introduced natural enemy of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston (Caesalpiniaceae) in South Africa. *African Entomology* 8: 293-297.
- Corpet, F. & Michot, B. 1994. RNAlign program: alignment of RNA sequences using both primary and secondary structures. *Computer Applications in BioSciences* 10: 389-399.
- Crowson, R.A. 1953. The classification of the families of British Coleoptera. *Entomologist's Monthly Magazine* 89: 181-198.

- Cummings, M.P., Handley, S.A., Myers, D.S., Reed, D.L., Rokas, A. & Winka, K. 2003. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. *Systematic Biology* 52: 477-487.
- Daly, H.V., Doyen, J.T. & Purcell III, A.H. 1998. *Introduction to Insect Biology and Diversity*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Darlu, P. & Tassy, P. 1993. *La reconstruction phylogénétique : concepts et méthodes*. Collection Biologie Théorique, Masson, Paris: 245 pp.
- De Luca, Y. 1967. Hôtes larvaires des bruchidés (Col.) sauf fabacées. *Bulletin Sciences Naturelles de l'ouest de la France* 64: 35-58.
- Delobel, A. & Anton, K.-W. 2003. Les *Bruchidius* consommateurs des graines de *Dichrostachys* et du genre allié *Alantsilodendron* en Afrique et à Madagascar (Coleoptera, Bruchidae). *Annales de la Société Entomologique Française* 108: 313-322.
- Delobel A. & Delobel, B. 2003. Les plantes hôtes des bruches de la faune de France, une analyse critique (Coleoptera Bruchidae). *Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon* 72: 199-221.
- Delobel, A. & Tran, M. 1993. *Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Faune tropicale XXXII*. Orstom/CTA, Paris.
- Delobel, A., Anton, K.-W. & Kergoat, G.J. 2004. New data on European *Astragalus*-feeding *Bruchidius*, with the description of a new species from Southern Italy (Coleoptera: Bruchidae: Bruchinae). *Genus* 15:173-185.
- Delobel, A., Tran, M. & Sembène, M. 2000. Influence du choix alimentaire sur la fécondité et le développement larvaire des *Caryedon* des Légumineuses (Coleoptera: Bruchidae) au Sénégal. *Annales de la Société Entomologique de France* 36: 61-73.
- Delsuc, F., Stanhope, M.J. & Douzery, E.J.P. 2003. Molecular systematics of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 261-275.
- De Queiroz, A., Donoghue, M.J. & Kim, J. 1995. Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Annual Review of Ecological Systematics* 26: 657-681.
- Dethier, V.G. 1954. Evolution of feeding preferences in phytophagous insects. *Evolution* 8: 33-54.
- Dethier, V.G., Barton Browne, L. & Smith, C.N. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *Journal of Economic Entomology* 53: 134-136.
- Dobler, S. & Farrell, B.D. 1999. Host use evolution in *Chrysochus* milkweed beetles: evidence from behaviour, population genetics and phylogeny. *Molecular Ecology* 8: 1297-1307.

- Dobler, S., Mardulyn, P., Pasteels, J.M. & Rowell-Rahier, M. 1996. Host-plant switches and the evolution of chemical defense and life history in the leaf beetle genus *Oreina*. *Evolution* 50: 2373-2386.
- Douady, C.J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W.F. & Douzery, E.J.P. 2003. Comparison of Bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Molecular Biology and Evolution* 20: 248-254.
- Downey, P.O. & Smith, J.M.B. 2000. Demography of the invasive shrub scotch broom (*Cytisus scorparius*) at Barrington Tops, New South Wales: insights for management. *Austral Ecology* 25: 477-485.
- Dussourd, D.E. 1995. Entrapment of aphids and whiteflies in lettuce latex. *Annals of the Entomological Society of America* 88: 163-172.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Erixon, P., Svennblad, B.S., Britton, T. & Oxelman, B. 2003. Reliability of bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics. *Systematic Biology* 52: 665-673.
- Fabre, J.-H. 1903. *Souvenirs entomologiques, 8ème Série*. Paris, 380 pp.
- Farrell, B.D. 1998. Inordinate fondness" explained: why are there so many beetles? *Science* 281: 555-559.
- Farrell, B.D. 2001. Evolutionary assembly of the milkweed fauna: cytochrome oxidase I and the age of *Tetraopes* beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 467-478.
- Farrell, B.D., Dussourd, D.E. & Mitter, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138: 881-900.
- Farrell, B.D. & Mitter, C. 1998. The timing of insect/plant diversification: might *Tetraopes* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Asclepias* (Asclepiadaceae) have co-evolved? *Biological Journal of the Linnean Society* 63: 553-577.
- Farris, J.S. 1970. Method for computing Wagner trees. *Systematic. Zoology* 19: 83-92.
- Farris, J.S. 1977. Phylogenetic analysis under Dollo's Law. *Systematic Zoology* 26: 77-88.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult. C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Farris, J.S. 1989a. The retention index and homoplasy excess. *Systematic Zoology* 38: 406-407.
- Farris, J.S. 1989b. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Felsenstein, J. 1968. *Statistical inference and estimation of phylogenies*. Ph.D. Dissertation, University of Chicago, Chicago.

- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual Review of Genetics* 22: 521-565.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland. Massachusset.
- Fitch, W.M. 1971. Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Futuyma, D.J. & Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 207-233
- Garin, C.F., Juan, C. & Petitpierre, E. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny and the evolution of host-plant use in Palearctic *Chrysolina* (Coleoptera, Chrysomelidae) leaf beetles. *Journal of Molecular Evolution* 48: 435-444.
- Gaston, K.J., Reavy, D. & Valladares, G.R. 1992. Intimacy and fidelity: Internal and external feeding by the British microlepidoptera. *Ecological Entomology* 17: 86-88.
- Geyer, C.J. 1991. Markov chain Monte Carlo maximum likelihood. In : *Computing science and statistics: Proceedings of the 23rd symposium on the interface* (ed. Keramidas, E.M.), pp. 156-163. Interface Foundation, Fairfax Station, Virginia.
- Gomez-Zurita, J., Juan, C. & Petitpierre, E. 2000. The evolutionary history of the genus *Timarcha* (Coleoptera Chrysomelidae) inferred from mitochondrial COII gene and partial 16S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 304-317.
- Grant, T. & Kluge, A.G. 2003. Data exploration in phylogenetic inference: scientific, heuristic, or neither. *Cladistics* 19: 379-418.
- Green, P.J. 1995. Reversible jump Markov chain Monte Carlo computation and Bayesian model determination. *Biometrika* 57: 97-109.
- Grimaldi, D. 1999. The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 373-406.
- Gu, X., Fu, Y.-X. & Li, W.-H. 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Molecular Biology and Evolution* 12: 546-557.
- Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.

- Hall, B.G. 2001. *Phylogenetic trees made easy: A how-to manual for molecular biologists*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- Hastings, W.K. 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57: 97-109.
- Hebert, P.D.N., Cyminska, A., Ball, S.L. & DeWaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 313-322.
- Hebert, P.D.N., Ratsingham, S., & DeWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: S1-S4.
- Hennig, W. 1950. *Grundzüge einer Theorie der Phylogenetischen Systematik*. Deutscher Zentralverlag, Berlin.
- Hennig W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hillis, D.M. & Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a methods for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 182-192.
- Hillis, D.M., Huelsenbeck, J.P. & Cunningham, C.W. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* 264: 671-677.
- Hoffmann, A. 1945. Coléoptères Bruchidae et Anthribidae. In: *Faune de France - 44* (ed. Lechevalier, P.), pp. 1-184. Paris.
- Holder, M. & Lewis, P.O. 2003. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. *Nature Genetics* 4: 275-284.
- Huang, J., McAuslane, H.J. & Nuessly, G.S. 2003. Resistance in lettuce to *Diabrotica balteata* (Coleoptera: Chrysomelidae): the role of latex and inducible defense. *Environmental Entomology* 32: 9-16.
- Huelsenbeck, J.P., Bull J.J. & Cunningham, C.W., 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 152-157.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Huelsenbeck, J.P., Larget, B., Miller, R.E. & Ronquist, F. 2002. Potential applications and pitfalls of bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology* 51: 673-688.
- Huignard, J., Dupont, P. & Tran, B. 1990. Coevolutionary relations between bruchids and their host plants. The influence on the physiology of the insects. In: *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution* (eds. Fuji, K., Gatehouse, A.M.R., Johnson, C.D., Mitchel, R. & Yoshida, T.), pp. 171-179. Kluwer Academics Publishers.

- Hunter, J.R. 1994. Reconsidering the functions of latex. *Trees* 9: 1-5.
- Iablokoff-Khnzorian, S.M. 1966. Considérations sur l'édéage des Chrysomelidae et son importance phylogénique. *L'Entomologiste* 22: 115-137.
- Jaenike, J. 1990. Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 243-273.
- Janz, N. & Nylin, S. 1998. Butterflies and plants: a phylogenetic study. *Evolution* 52: 486-502.
- Janz, N., Nyblom, K. & Nylin, S. 2001. Evolutionary dynamics of host-plant specialization: a case study of the tribe Nymphalini. *Evolution* 55: 783-796.
- Janzen, D.H. 1969. Seed-eaters versus seed size, number, toxicity, and dispersal. *Evolution* 23: 1-27.
- Janzen, D.H. 1977. How southern cowpea weevil larvae (Bruchidae: *Callosobruchus maculatus*) die on non-host seeds. *Ecology* 58: 921-927.
- Janzen, D.H. 1981. The defense of legumes against herbivores. In: *Advances in Legume Systematics* (eds. Polhill, R.M. & Raven, P.H.), pp. 951-977. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- Janzen, D.H., Juster, H.B. & Bell, E.A. 1977. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Phytochemistry* 16: 223-227.
- Jarzembowski, E.A. 2001. Review of early insects and palaeocommunities. *Annales de la Société Entomologique de France* 37: 11-19.
- Jermey, T. 1984. Insect-host plant relationships. *American Naturalist* 124: 609-630.
- Jermey, T. & Szentesi, A. 2003. Evolutionary aspects of host plant specialisation - a study on bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *OIKOS* 101: 196-204.
- Johnson C.D. 1981. Seed beetle host specificity and the systematics of the Leguminosae. In: *Advances in Legume Systematics* (eds. Polhill, R.M. & Raven, P.H.), pp. 995-1027. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- Johnson C.D. 1988 The possible beginning of adaptation to a new host by bruchid beetles in Venezuela. *Biotropica* 20: 80-81.
- Johnson, C.D. 1989. Adaptive radiation of Acanthoscelides in seeds: examples of legume-bruchid interactions. In: *Advances in Legume Biology* (eds. Stirton, I.C.H. & Zarucchi, J.L.), pp. 747-779. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.
- Johnson, C.D. 1990a. Coevolution of Bruchidae and their hosts: evidence, conjecture, and conclusions. In: *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution* (eds. Fuji, K., Gatehouse, A.M.R., Johnson, C.D., Mitchel, R. & Yoshida, T.), pp. 181-188. Kluwer Academic Publishers.

- Johnson C.D. 1994. The enigma of the relationships between seeds, seed beetles, elephants, cattle and other organisms. *Aridus* 6: 1-4.
- Johnson, C.D. & Romero, J. 2004. *Neobruchidius*, new genus from Latin America, with one new species, *N. lovie* (Coleoptera: Bruchidae). *Zootaxa* (sous presse).
- Johnson, C.D., Romero, J. & Raimúndez-Urrutia, E. 2001. Ecology of *Amblycerus crassipunctatus* Ribeiro-Costa (Coleoptera: Bruchidae) in seeds of Humiriaceae, a new host family for bruchids, with an ecological comparison to other species of *Amblycerus*. *Coleopterists Bulletin* 55: 37-48.
- Johnson C.D & Siemens D.H. 1991 Expanded oviposition range by a seed beetle in proximity to a normal host. *Environmental Entomology* 20: 1577-1582.
- Johnson, C.D. & Siemens, D.H. 1997. Distribution, oviposition guilds, behavior and new host records from Latin America for *Algarobius* Bridwell, *Scutobruchus* Kingsolver and *Pseudopachymerina spinipes* (Erichson) (Coleoptera: Bruchidae) *Coleopterists Bulletin* 51: 37-42.
- Johnson, C.D. & Slobodchikoff, C.N. 1979. Coevolution of *Cassia* (Leguminosae) and its seed beetle predators (Bruchidae). *Environmental Entomology* 8: 1059-1064.
- Johnson, C.D., Southgate, B.J. & Delobel, A. 2004. A revision of the Caryedontini (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae) of Africa and the Middle East. *Memoirs of the American Entomological Society* 44: 1-120.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. & Thornton, J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in BioSciences* 8: 275-282.
- Jordal, B.H., Normark, B.B. & Farrell, B.D. 2000. Evolutionary radiation of an inbreeding haplodiploid beetle lineage (Curculionidae, Scolytinae). *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 483-499.
- Jordal, B.H., Normark, B.B., Farrell, B.D. & Kirkendall, L.R. 2002. Extraordinary haplotype diversity in haplodiploid inbreeders: phylogenetics and evolution of the bark beetle genus *Coccotrypes*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 171-188.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2002. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, 2nd. ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusset.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism* (ed. Munro, H.N.), pp. 21-132. Academic Press, New York.
- Kelley, S.T. & Farrell, B.D. 1998. Is specialization a dead end? The phylogeny of host use in *Dendroctonus* bark beetles (Scolytidae). *Evolution* 52: 1731-1743.
- Kergoat, G.J., Delobel, A. & Silvain, J.-F. 2004. Phylogeny and host-specificity of European seed beetles (Coleoptera, Bruchidae), new insights from molecular and ecological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 855-865.

- Kergoat, G.J. & Silvain, J.-F. 2004. Le genre *Bruchidius* (Coleoptera: Bruchidae) est-il monophylétique? Apports des méthodes de parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne. *Biosystema* 22:113-125.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kingsolver, J.M. 1965. A new fossil bruchid genus and its relationships to modern genera (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae). *Coleopterists Bulletin* 19: 25-30.
- Kingsolver, J.M. 1970. A study of male genitalia in Bruchidae. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 72: 370-386.
- Kingsolver, J.M. 1995. On the family Bruchidae. *Chrysomela Newsletter*. 30:3.
- Kingsolver, J.M. & G.S. Pfaffenberger. 1980. Systematic relationship of the genus *Rhaebus* (Coleoptera: Bruchidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 82: 293-311.
- Klass, K.D., Zompro, O., Kristensen, N.P. & Adis, J. 2002. Mantophasmodea : a new insect order with extant members in Afrotropics. *Science* 296: 1456-1459.
- Kluge, A.G. & Farris, J.S. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18: 1-32.
- Kluge, A.G. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationship among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Systematic Biology*, 38 : 7-25.
- Kosakovsky Pond, S.L. & Muse, S.V. 2003. HyPhy : Hypothesis testing using phylogenies. University of California San Diego and North Carolina State University.
- Kraatz, G. 1879. *Rhaebus gebleri* Fischer, oder eine neue *Rhaebus*-art in Europa einheimisch? *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 23: 276-278.
- Kristensen, N.P. 1981. Phylogeny of insect orders. *Annual Review of Entomology* 26: 135-157.
- Kristensen, N.P. 1991. Phylogeny of extant Hexapods. In: *The insects of Australia, a textbook for students and research workers, 2nd ed.* (ed. Nauman, I.D.), pp. 125-140. CSIRO-Melbourne University Press.
- Labandeira, C.C., Beall, B.S. & Hueber, F.M. 1988. Early insect diversification: evidence from a Lower Devonian bristletail from Quebec. *Science* 242: 913-916.
- Labandeira, C.C., Dilcher, D.L., Davies, D.R. & Wagner, D.L. 1994. Ninety-seven millions years of angiosperm-insect association: Paleobiological insights into the meaning of coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 12278-12282.

- Labandeira, C.C. & Eble, G. J. 200-. The fossil record of insect diversity and disparity. In: *Gondwana Alive: Biodiversity and the Evolving Biosphere* (eds. Anderson, J., Thackeray, F., Van Wyk, B. & De Wit, M.), Witwatersrand University Press. sous presse.
- Labandeira, C.C., Johnson, K.R. & Wilf, P. 2002. Impact of the terminal Cretaceous event on plant-insect associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2061-2066.
- Labandeira, C.C. & Phillips, T.L. 1996. A carboniferous insect gall: insight into early ecologic history of the Holometabola. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8470-8474.
- Lacordaire, J.T. 1845. Monographie des Coléoptères subpentamères de la famille des Phytophages. I. *Mémoires de la Société Royale des Sciences de Liège* 3: 1-740.
- Lambkin, C.L., Lee, M.S.Y., Winterton, S.L. & Yeates, D.K. 2002. Partitioned Bremer support and multiple trees. *Cladistics* 18: 436-444.
- Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C. & Serio, G. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution* 20: 86-93.
- Lawrence, J.F. 1982. Coleoptera. In: *Synopsis and classification of living organisms, vol. 2* (ed. Parker, S.P.), pp. 482-553. MacGraw-Hill, New York.
- Li, S. 1996. *Phylogenetic tree construction using Markov chain Monte Carlo*. Ph.D. Dissertation, Ohio State University, Columbus.
- Lingafelter, A. & Pakaluk, J. 1997. Comments on the Bruchinae and Chrysomelidae. *Chrysomela Newsletter* 33: 3-4.
- LeConte, J.L. & Horn, G.H. 1883. Classification of the Coleoptera of North America. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 26: 1-567.
- Lukjanovich, F.K. & Ter-Minasian, M.E. 1957. Zhuki-zernovski (Bruchidae). *Fauna SSSR, Zhestkokrylye* 24: 1-209.
- Maddison, D.R. & Maddison, W.P. 2002. MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusset.
- Mann, J.S. & Crowson, R.A. 1981. The systematic position of *Orsodacne* Latr. and *Syneta* Lac. (Coleoptera, Chrysomelidae), in relation to characters of larvae, internal anatomy, and tarsal vestiture. *Journal of Natural History* 15: 727-749.
- Mardulyn, P., Milinkovitch, M.C. & Pasteels, J.M. 1997. Phylogenetic analyses of DNA and allozyme data suggest that *Gonioctena* leaf beetles (Coleoptera; Chrysomelidae) experienced convergent evolution in their history of host-plant family shift. *Systematic Biology* 46: 722-747.
- Marvaldi, A.E., Sequeira, A.S., O'Brien, C.W. & Farrell, B.D. 2002. Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionoidea): Do niche shifts accompany diversification? *Systematic Biology* 51: 761-785.

- Mau, B. 1996. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. Ph.D. Dissertation, University of Wisconsin, Madison.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller, A.H. & Teller, E. 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics* 21: 1087-1091.
- Mickevich, M.F. & Farris, J.S. 1981. The implications of congruence in *Menidia*. *Systematic Zoology* 30: 351-370.
- Miller, J.S. 1987. Host plant association in the Papilionidae: Parallel cladogenesis or colonization? *Cladistics* 3: 105-120.
- Minin, V., Abdo, Z., Joyce, P. & Sullivan, J. 2003. Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation. *Systematic Biology* 52: 674-683.
- Mitter, C., Farrell, B.D. & Wiegmann, B. 1988. The phylogenetic study of adaptive zones: has phytophagy promoted insect diversification? *American Naturalist* 132: 107-128.
- Miyamoto, M.M. & Fitch, W.M. 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Systematic Biology* 44: 64-76.
- Monteiro, A. & Pierce, N.E. 2001. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and Ef-1 α gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 264-281.
- Murphy, W.J., Eizirik, E., O'Brien, S.J., Madsen, O., Scally, M., Douady, C.J., Teeling, E., Ryder, O.A., Stanhope, M.J., De Jong, W.W. and Springer, M.S. 2001. Resolution of the early placental mammal radiation using bayesian phylogenetics. *Science* 294: 2348-2351.
- Navajas, M., Lagnel, J. Gutierrez, J & Boursot, P. 1998. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS-2 sequences in the spider mite *Tetranychs urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80: 742-752.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Nilsson, J.A. & C.D. Johnson. 1991. *Protocaryopemon* Borowiec 1987, a synonym of *Caryopemon* Jekel 1855, and *P. archetypus* Borowiec 1987, a synonym of *C. giganteus* Pic 1909 (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae). *Coleopterists Bulletin* 45: 349.
- Nosil, P. 2002. Transition rates between specialization and generalization in phytophagous insects. *Evolution* 56: 1701-1706.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. & Nieves-Aldrey, J.L., 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53: 47-67.
- Oliveira, A.S., Pereira, R.A., Lima, L.M., Morais, A.H.A., Melo, F.R., Franco, O.L., Bloch Jr, C., Grossi-de-Sa, M.F., and Sales, M.P. 2002. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the Algaroba tree (*Prosopis juliflora* D.C.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72: 122-132.

- Page, R.D.M. 2000. Comparative analysis of secondary structure of insect mitochondrial small subunit ribosomal RNA using maximum weighted matching. *Nucleic Acids Research* 28: 3839-3845.
- Pfaffenberger, G.S., De Argentier, S.M. & Teran, A.L. 1984. Morphological descriptions and biological and phylogenetic discussions of the first and final instar of four species of *Megacerus* larvae (Coleoptera: Bruchidae). *Coleopterists Bulletin* 38: 1-26.
- Poinar, G.O. 1999. A fossil palm bruchid, *Caryobruchus dominicanus* sp. n. (Pachymerini: Bruchidae) in Dominican amber. *Entomologica scandinavica* 30: 219-224.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50: 580-601.
- Powell, J.A., Mitter, C. & Farrell, B.D. 1999. Evolution of larval food preferences in Lepidoptera. In: *Lepidoptera: Moths and Butterflies. 1. Handbook of Zoology, Vol. IV, Part 35* (ed. Kristensen, N.P.), pp. 403–422. New York.
- Prokopy, R.J. 1968. Visual responses of apple maggot flies, *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae): orchard studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 11: 403-422.
- Prokopy, R.J., Collier, R.H. & Finch, S. 1983. Leaf color used by cabbage root flies to distinguish among host plants. *Science* 221: 190-192.
- Rannala, B. & Yang, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees : A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304-311.
- Reid, C. 1996. More on the family Bruchidae. *Chrysomela Newsletter* 31: 3.
- Rohner, C. & Ward, D. 1999. Large mammalian herbivores and the conservation of arid *Acacia* stands in the Middle East. *Conservation Biology* 13: 1162-1171.
- Romero, J. & C.D. Johnson. 2000. Revision of the Genus *Zabrotes* Horn of Mexico (Coleoptera: Bruchidae: Amblycerinae). *Transactions of the American Entomological Society* 126: 221-274.
- Romero, J. & Johnson, C.D. 2001. *Margaritabruchus cherylae*, new genus and new Species of New World Bruchidae (Coleoptera). *Coleopterists Bulletin* 55: 405-409.
- Romero, J. & Johnson, C.D. 2002. Five new species of *Meibomeus* Bridwell from the New World with new host records for them and six named species (Coleoptera: Bruchidae). *Coleopterists Bulletin* 55: 182-202.
- Romero, J. & Johnson, C.D. 2003a. Revision of the genus *Neltumius* Bridwell (Coleoptera: Bruchidae). *Coleopterists Bulletin* 57: 219-236.
- Romero, J. & Johnson, C.D. 2003b. *Meganeltumius juani*, New Genus, New Species (Coleoptera: Bruchidae) *Coleopterists Bulletin* 57: 237-242.

- Rosenthal, G.A., Dahlman, D.L. & Janzen, D.H. 1976. A novel means for dealing with L-canavanine, a toxic metabolite. *Science* 192: 256-258.
- Rosenthal, G.A., Dahlman, D.L. & Janzen, D.H. 1977. Degradation and detoxification of canavanine by a specialized seed predator. *Science* 196: 658-660.
- Rosenthal, G.A. 1990. Biochemical adaptations by the bruchid beetle, *Caryedes brasiliensis*. In: *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution* (eds. Fuji, K., Gatehouse, A.M.R., Johnson, C.D., Mitchel, R. & Yoshida, T.), pp. 161-169. Kluwer Academics Publishers.
- Rubinoff, D. & Sperling, F.A.H. 2002. Evolution of ecological traits and wing morphology in *Hemileuca* (Saturniidae) based on a two gene phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 70-86.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The Neighbor-joining Method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Schadt, E.E., Sinsheimer, J.S. & Lange, K. 2002. Applications of codon and rate variation models in molecular phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1550-1562.
- Scheffer, S.J. & Wiegmann, B.M. 2000. Molecular phylogenetics of the holly leafminers, (Diptera: Agromyzidae: Phytomyza): species limits, speciation, and dietary specialization. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 244-255.
- Schilsky, J. 1905. Bruchidae. In: *Die Käfer Europas* (eds. Küster, H.C. & Kraatz, G.). Nürnberg.
- Schluter, D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Schmitt, M. 1998. Again, bruchid classification. *Chrysomela Newsletter* 36: 3-4.
- Silvain, J.-F. & Delobel, A. 1998. Phylogeny of west african *Caryedon* (Coleoptera : Bruchidae) : congruence between molecular and morphological Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 533-541.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651-702.
- Simpson, G.G. 1953. *The major features of evolution*. Columbia University Press, New York, New York.
- Sorenson, M.D., 1999. TreeRot.v2. Boston University, Boston.
- Sota, T. & Vogler, A.P. 2001. Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the carabid beetles *Ohomopterus*. *Systematic Biology* 50: 39-59.
- Southgate B.J. 1979. Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology* 24: 449-473.

- Southwood, T.R.E. 1973. The insect/plant relationship – an evolutionary perspective. *Symposium of the Royal Entomological Society London* 6: 3-30.
- Spinola, M. 1843. Dei Prioniti e dei Coleotteri ad essi piu affini osservazioni. *Memorie della Reale Accademia delle Scienze de Torino* 1: 387-418.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA and the barcode of life. *BioScience* 53: 796-797.
- Strong, D.R., Lawton, J.H. & Southwood T.R.E. 1984. *Insects on plants: community patterns and mechanisms*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusset.
- Swofford, D.L. & Olsen, G.J. 1990. Phylogeny reconstruction. In: *Molecular Systematics* (eds. Hillis, D.M. & Moritz, C.), pp. 411-501. Sinauer Associates, Sunderland. Massachusset.
- Swofford, D.L. 1995. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusset.
- Swofford, D.L. 2002. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods). Version 4.0b10* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusset.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. & Hillis, D.M. 1996. Phylogenetic inference. In: *Molecular systematics* (eds Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K.), pp. 407–514. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusset.
- Termonia, A., Hsiao, T.H., Pasteels, J.M. & Milinkovitch, M. 2001. Feeding specialization and host-derived chemical defense in chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3909-3914.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thompson, J.N. 1994. *The Coevolutionary process*. Chicago University Press, Chicago.
- Tuda, M. & Morimoto, K. 2004. A new species *Megabruchidius sophorae* (Coleoptera, Bruchidae) feeding on seeds of *Styphnolobium* (Fabaceae) new to Bruchidae. *Zoological Science* 21: 105-110.
- Van Tonder, S.J. 1985. Annotated records of southern african Bruchidae (Coleoptera) associated with acacias, with a description of a new species. *Phytophylactica* 17: 143-148.
- Verma, K.K. & Saxena, R. 1996. The status of Bruchidae as a family. *Chrysomela Newsletter* 32: 3.
- Udayagiri S. & Wadhi, S.R. 1989. Catalog of Bruchidae. *Memoirs of the American Entomological Institute* 45: 1-301.

- Visser, J.H. 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 31: 121-144.
- Wahlberg, N. 2001. The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in Melitaeine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution* 55: 522-537.
- Ward, L. & Spalding, D.F. 1993. Phytophagous British insects and mites and their food plant families: total numbers and polyphagy. *Biological Journal of the Linnean Society* 49: 257-276.
- Wheeler, W.C., Gatesy, J. & DeSalle, R. 1995. Elision: a method for accommodating multiple molecular sequence alignments with alignment-ambiguous sites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 1-9.
- Whelan, S., Lio, P. & Goldman, N. 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends in Genetics* 17: 262-272.
- Wickham, H.F. 1914. New Miocene Coleoptera from Florissant. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 58: 423-494.
- Wiegmann, B.M., Mitter, C., Regier, J.C., Friedlander, T.P., Wagner, D.M. & Nielsen, E.S. 2000. Nuclear genes resolve mesozoic-aged divergences in the Insect order Lepidoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 242-259.
- Wiens, J.J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* 47: 568-581.
- Wilcox, T.P., Zwickl, D.J., Heath, T.A. & Hillis, D.M. 2002. Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 361-371.
- Wilf, P., Labandeira, C.C., Kress, W.J., Staines, C.L., Windsor, D.M., Allen, A.L. & Johnson, K.R. 2000. Timing the radiations of leaf beetles: hispines on gingers from latest Cretaceous to recent. *Science* 289: 291-294.
- Wilf, P., Labandeira, C.C., Johnson, K.R., Coley, P.D. & Cutter, A.D. 2001. Insect herbivory, plant defense, and early Cenozoic climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6221-6226.
- Wink, M. & Mohamed, G.I.A. 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 897-917.
- Yang, Z. 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *Journal of Molecular Evolution* 39: 105-111.
- Yang, Z. & Yoder, A.D. 2003. Comparison of likelihood and Bayesian methods for estimating divergence times using multiple gene loci and calibration points, with application to a radiation of cute-looking mouse lemur species. *Systematic Biology* 52: 705-716.

Zacher, F. 1952a. Die Nährpflanzen der Samenkäfer. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 33: 210-217.

Zacher, F. 1952b. Die Nährpflanzen der Samenkäfer. List 1: Verzeichnis der von den einzelnen Bruchiden-Arten befallenen Nährpflanzen. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 33: 460-482.

Zalucki, M.P. & Malcolm, S.B. 1999. Plant latex and first-instar monarch larval growth and survival on three North American milkweed species. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1827-1842.

Zharkikh, A. & Li, W.-H. 1992. Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences. I. Four taxa with a molecular clock. *Journal of Molecular Evolution* 9: 1119-1147.

Table des illustrations

Figures

Figure 1.1. 8

Hypothèse phylogénétique pour les Hexapodes (figurant les différents ordres connus) basée sur une analyse cladistique de caractères morphologiques (modifiée d'après Kristensen, 1991). Quelque uns des clades majeurs d'Hexapodes sont indiqués par des flèches (Insecta, Dicondylia, Pterygota, Neoptera et Paleoptera). Les principaux ordres d'insectes comprenant des phytophages (d'après Bernays & Chapman, 1994) sont indiqués par des ronds.

Figure 1.2. 9

Estimation du nombre d'espèces de phytophages (d'après Bernays & Chapman, 1994) et du nombre d'espèce total (d'après Daly *et al.*, 1998) des 8 ordres d'insectes qui regroupent la majorité des insectes phytophages.

Figure 1.3. 13

Ce cladogramme (modifié d'après Labandeira, 1994) met en correspondance une hypothèse phylogénétique pour les Lépidoptères avec une échelle des temps géologiques (qui situe également la radiation des Angiospermes). Deux synapomorphies importantes sont figurées sur ce cladogrammes ainsi que les occurrences fossiles pour les Lépidoptères (des ronds blancs figurent des occurrences fossiles reconnues, des ronds grisés des occurrences incertaines, et des ronds rouges des occurrences proposées par l'auteur).

Figure 1.4. 14

Ce cladogramme (modifié d'après Mitter *et al.*, 1988 et Schluter, 2000) illustre l'approche comparative qui a été utilisée par la méthode des contrastes (ici chez des Hémiptères). On observe que les groupes frères (ici des familles) non phytophages présentent une diversité spécifique bien moindre que les groupes strictement phytophages.

Figure 1.5. 15

Schéma (modifié d'après Farrell, 1998) qui illustre l'accroissement du nombre de genres de Coléoptères Phytophaga à travers les âges géologiques.

Figure 1.6. 17

Schéma qui illustre la coévolution au sens d'Ehrlich & Raven. Les insectes se diversifient parallèlement aux plantes (A). Une lignée de plante arrive à échapper à la pression des phytophages en développant des nouvelles défenses, et elle se diversifie en conséquence (B). Une lignée d'insecte développe des mécanismes de contournement (C) qui lui permettent de se diversifier sur les plantes qui étaient anciennement protégées (D). Ces interactions réciproques se répètent à l'infini lors de l'évolution des deux groupes.

Figure 1.7. 19

Schéma qui illustre la cospéciation entre des insectes phytophages appartenant au genre *Phyllobrotica* (Coleoptera, Chrysomelidae) et leurs plantes-hôtes appartenant au genre *Scutellaria* (modifié d'après Farrell & Mitter, 1990). On observe que la phylogénie des insectes (à gauche) est presque congruente avec celle des plantes (représentée à droite).

Figure 1.8. 20

Schéma qui illustre le modèle de spécialisation chimique. Deux composés secondaires toxiques distincts (figurés en couleur) sont représentés sur la phylogénie des plantes. On observe que les insectes phytophages se diversifient en fonction de la chémotaxonomie des plantes et non de leurs relations de parenté.

Figure 1.9. 22

Schéma du modèle prédictif d'évolution du choix des plantes hôtes et du degré de spécialisation chez les insectes phytophages (modifié d'après Bucheli *et al.*, 2002).

Figure 1.10. 24

Vue dorsale (à gauche) et vue de profil (à droite) de *Bruchidius incarnatus* (Coleoptera, Bruchidae, Bruchinae). On remarque en particulier la position opisthognathe de la tête, la vestiture dense sur tout le corps et sur les pattes, ainsi que la forme du fémur de la patte 3 qui est très renforcé. Le schéma en médaillon (d'après Daly *et al.*, 1998) précise la position du 4ème tarsomère.

Figure 1.11. 26

Schéma de génitalia femelles (en haut) et mâles (en bas), caractéristiques de la famille des Bruchidae. (modifié d'après Delobel, non publié). Elles correspondent à des génitalia d'un type dérivé, si l'on se réfère à Borowiec (1987a).

Figure 2.1. 56

Schéma illustrant les notions de distances métriques additives (A), et de distances ultramétriques (B)

Figure 2.2. 57

Schéma illustrant la méthode de NJ (modifié d'après Darlu & Tassy, 1993). Les distances figurées ne sont pas ultramétriques, et ainsi d_{ax} peut être très différent de d_{bx} . N correspond au nombre total d'UE.

Figure 2.3. 58

Schéma illustrant une homoplasie consécutive à une convergence (à gauche), et une homoplasie consécutive à une réversion (à droite). Dans les deux cas A, C et D partagent le même état de caractère dérivé alors même qu'ils ne sont pas les trois taxons les plus proches phylogénétiquement.

Figure 2.4. 61

Schéma illustrant différents modèles d'évolution de séquences du plus simple (en haut) au plus complexe (en bas). Les références complètes de ces modèles sont les suivantes : modèle JC (Jukes & Cantor, 1969) ; modèle FEL (Felsenstein, 1985) ; modèle K2P (Kimura, 1980) ; HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) ; GTR, GTR + Γ , GTR + Γ + I (Lanave *et al.*, 1984 ; Yang, 1994 ; Gu *et al.*, 1995).

Figure 2.5.	62
Schéma illustrant le calcul de la vraisemblance L d'un arbre donné (d'après Swofford et al., 1996). (A) Jeu de données hypothétique de 4 taxons et N caractères. (B) Arbre non enraciné des quatre taxons du jeu de données. (C) Le même arbre enraciné aléatoirement, avec les états de caractère d'un site donné j . (D) La vraisemblance pour un site donné j est la somme des probabilités de toutes les reconstructions possibles des états ancestraux (pour un modèle d'évolution donné). (E) La vraisemblance globale de l'arbre (L) est le produit des vraisemblances de chaque site. (F) Le score de vraisemblance est généralement estimé en sommant les logarithmes des vraisemblances de chaque site.	
Figure 2.6.	65
Graphique illustrant l'évolution des scores de vraisemblances des arbres en fonction du nombre de générations lors d'une analyse en inférence bayésienne.	
Figure 2.7.	71
Figure illustrant la procédure de rééchantillonnage utilisé pour le « bootstrap » non paramétrique (d'après Felsenstein, 2004).	
Figure 2.8.	72
Figure illustrant la procédure de rééchantillonnage utilisé pour le « bootstrap » paramétrique (d'après Felsenstein, 2004).	
Figure 3.1.	97
Arbre le plus parcimonieux issu de l'analyse cladistique non pondérée d'un jeu de données moléculaires combinées (12S, Cyt b, COI, 28S-D2). Des clichés issus de montages (entre lame et lamelle) des urosternites mâles de chaque espèce du genre <i>Bruchus</i> sont figurés en médaillon sur la droite.	
Figure 3.2.	98
Figure illustrant le protocole suivi pour l'extraction de l'ADN total (à gauche). A droite est figuré un cliché de gel de contrôle d'extraction (gel d'agarose).	
Figure 3.3.	101
Figure illustrant le protocole suivi pour la purification des produits des PCR (à gauche). A droite est figuré un cliché de gel de contrôle de purification (gel d'agarose).	
Figure 3.4.	103
Figure illustrant la stratégie d'analyse qui a été généralement suivie en inférence phylogénétique.	
Figure 3.5.	104
Capture d'écran illustrant le mode fenêtré de PAUP* version macintosh.	
Figure 3.6.	163
Figure (modifiée d'après Kergoat & Silvain, 2004) qui correspond à la topologie obtenue par une analyse partitionnée en inférence bayésienne. Les espèces n'appartenant pas au genre <i>Bruchidius</i> sont encadrées,	

ce qui souligne la paraphylie du genre *Bruchidius*, mais aussi celle du genre *Tuberculobruchus*. On peut aussi observer la position de *Paleoacanthoscelides gilvus* (Bruchinae, Acanthoscelidini) en groupe frère des espèces du genre *Bruchus* (Bruchinae, Bruchini).

Figure 3.7. 165

Figure (modifiée d'après Wink & Mohamed, 2003 et Kergoat *et al.*, 2004) illustrant l'incongruence entre les phylogénies des plantes (à gauche) et des insectes (à droite).

Figure 3.8. 166

Figure illustrant : (A) l'incongruence entre les phylogénies des insectes (à gauche) et des plantes (à droite) ; (B) l'optimisation des caractères « plantes-hôtes » et « composés secondaires toxiques ».

Tableaux

Tableau 1.1. 25

Caractères de morphologie externe (modifié d'après Borowiec, 1987a).

Tableau 1.2. 29

Classification et estimation du nombre d'espèces pour la famille des Bruchidae.

Tableau 1.3. 33

Mécanismes de contournement des défenses des plantes dans la famille des Bruchidae (d'après Center & Johnson, 1974)

Tableau 1.4. 36

Combinaisons d'états de caractères pour le genre *Bruchidius* (d'après Borowiec, 1987a)

Tableau 1.5. 38

Plantes-hôtes d'espèces européennes du genre *Bruchidius* (d'après Delobel & Delobel, 2003 ; Jermy & Sventesi, 2003 ; Delobel, com. pers.)

Tableau 3.1. 90

Echantillon taxonomique.

Tableau 3.2. 96

Codage de caractères des génitalias mâles et femelles chez les Bruchidae.

Tableau 3.3. 100

Séquences des principales amorces utilisées.



Bruchidius auratopubens



Bruchidius aurivillii



Bruchidius biguttatus



Bruchidius cadei



Bruchidius campylacanthae



Bruchidius caninus



Bruchidius centromaculatus



Bruchidius chloroticus



Bruchidius cinerascens



Bruchidius dialii



Bruchidius dichrostachydis



Bruchidius dilaticornis



Bruchidius dispar



Bruchidius elnairiensis



Bruchidius foveolatus



Bruchidius fulvus



Bruchidius grandemaculatus



Bruchidius incarnatus



Bruchidius lineatopygus



Bruchidius lividimanus



Bruchidius marginalis



Bruchidius nanus



Bruchidius picipes



Bruchidius poecilus



Bruchidius pusillus



Bruchidius pygidiopictus



Bruchidius pygmaeus



Bruchidius quadrisignatus



Bruchidius quinqueguttatus



Bruchidius raddianae



Bruchidius rubicundus



Bruchidius pr. saudicus



Bruchidius securiger

1 mm



*Bruchidius
seminarius*



*Bruchidius
sericatus*



*Bruchidius
submaculatus*



*Bruchidius
uberatus*



*Bruchidius
unicolor*



*Bruchidius
varius*



*Bruchidius
villosus*



*Bruchidius
sp. KE01*



*Bruchidius
sp. KE02*



*Bruchidius
sp. KE03*



*Bruchidius
sp. KE04*



*Bruchidius
sp. KE05*



*Bruchidius
sp. KE06*



*Bruchidius
sp. KE07*



*Bruchidius
sp. KE08*



*Bruchidius
sp. KE09*



*Bruchidius
sp. KE10*



*Bruchidius
sp. KE11*



*Bruchidius
sp. KE12*



*Bruchidius
sp. KE13*



*Bruchidius
sp. KE14*



*Bruchidius
sp. KE15*



*Bruchidius
sp. SE01*



*Bruchidius
sp. SE02*



*Bruchidius
sp. SE03*



*Bruchidius
sp. KE16*

1 mm



*Acanthoscelides
macrophthalmus*



*Acanthoscelides
obtectus*



*Algarobius
prosopis*



*Bruchus
affinis*



*Bruchus
brachialis*



*Bruchus
loti*



*Bruchus
luteicornis*



*Bruchus
occidentalis*



*Bruchus
pisorum*



*Bruchus
rufimanus*



*Bruchus
rufipes*



*Callosobruchus
chinensis*



*Callosobruchus
maculatus*



*Callosobruchus
phaseoli*



*Callosobruchus
subinnotatus*



*Conicobruchus
strangulatus*



*Decellebruchus
atrolineatus*



*Gibbobruchus
sp.*

1 mm



Megabruchidius tonkineus



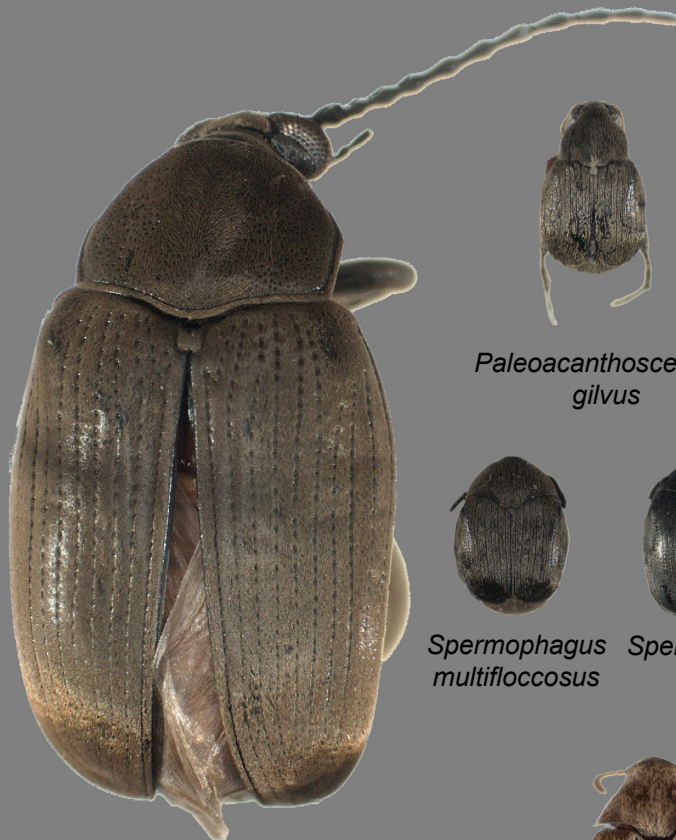
Pseudopachymerina spinipes



Tuberculobruchus babaulti



Tuberculobruchus natalensis



Pachymerus cardo



Tuberculobruchus silaceus



Tuberculobruchus sinaitus



Paleoacanthoscelides gilvus



Sperophagus multifloccosus



Sperophagus sp.



Penthobruchus germaini



Tuberculobruchus albizziarum



Tuberculobruchus subuniformis

1 mm

Résumé

Les insectes phytophages représentent à eux seuls près de 25 % de la biodiversité terrestre. De nombreuses études établissent un lien entre la diversification des insectes phytophages et la diversification des plantes terrestres, et plus particulièrement celle des Angiospermes. En effet, il apparaît que la majorité des insectes phytophages ne consomment qu'une fraction des plantes hôtes disponibles dans leur environnement, une tendance à la spécialisation qui a probablement favorisé leur diversification. Il est cependant très difficile d'explicitier avec précision les mécanismes évolutifs qui sont à l'origine de la diversité actuelle, et des associations et interactions entre plantes et insectes phytophages. Ce sujet est abondamment débattu actuellement, et de nombreuses hypothèses explicatives souvent redondantes ou complémentaires, ont été formulées.

La présente étude porte sur des insectes phytophages de la famille des Bruchidae (Coleoptera, Chrysomeloidea). Ces insectes présentent une spécificité d'hôte marquée qui renforce leur utilité dans des études sur les relations plantes-insectes. Ils sont en effet oligophages ou monophages, et leurs larves se développent exclusivement dans des graines (majoritairement des Fabaceae). Les bruches constituent un modèle biologique pertinent car il est possible de déterminer avec précision la nature de leurs plantes-hôtes. En effet, la collecte des graines de plantes-hôtes potentielles sur le terrain et le suivi de l'émergence des adultes permet d'identifier avec précision les associations plantes-insectes. Cette étude a porté sur près d'une centaine d'espèces de Bruchidae, appartenant majoritairement au genre *Bruchidius* (inféodé à l'Ancien Monde). Afin de reconstruire la phylogénie des espèces de notre échantillon, on a obtenu des données de séquences de nucléotides pour plusieurs marqueurs moléculaires mitochondriaux et nucléaires. Le traitement de ces données a été effectué à l'aide de différentes méthodes d'inférence phylogénétique (parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne), ce qui a permis de mettre en exergue les avantages et les désavantages de chaque méthode. La prise en compte conjointe des hypothèses phylogénétiques ainsi obtenues et des données écologiques et biogéographiques disponibles (par exemple la nature des composés secondaires des graines pour les espèces africaines) a permis de tester différentes hypothèses explicatives correspondant aux principaux patrons d'interactions évolutives connus entre plantes et insectes phytophages.

Nos résultats mettent en évidence un conservatisme taxonomique marqué dans les associations plantes-insectes chez les Bruchidae (la plupart des espèces apparentées phylogénétiquement sont associées à des plantes-hôtes appartenant à la même tribu botanique). Néanmoins, il n'y a pas congruence entre les phylogénies des bruches et les phylogénies de leurs plantes-hôtes. Pour les espèces africaines étudiées, la nature des composés secondaires des graines apparaît comme le facteur majeur qui explique la diversification des espèces qui se sont spécialisées sur les sous-familles des Caesalpinioideae et Mimosoideae (Fabaceae). Cela correspond au modèle de spécialisation chimique, où les insectes vont se diversifier sur des plantes contenant des composés secondaires similaires. Nos résultats indiquent également que la radiation évolutive qu'a connu dans l'Ancien Monde le genre *Bruchidius* est très comparable à celle du genre *Acanthoscelides*, qui occupe les mêmes niches écologiques dans le Nouveau Monde. Cette étude a permis non seulement de préciser les facteurs à l'origine de la diversification de ces insectes phytophages, mais aussi de clarifier la systématique de la famille des Bruchidae et de mettre en évidence la paraphylie de nombreux groupes. Elle confirme l'intérêt des Coléoptères Bruchidae, et des *Bruchidius* en particulier, comme modèle d'étude de l'évolution des relations plantes-insectes.