

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/313010845>

Graphosoma lineatum (L., 1758) and G. italicum (O.F. Müller, 1766), two valid and distinct species, probably derived from the...

Article · January 2017

CITATIONS

0

READS

240

1 author:



[Roland Lupoli](#)

Paris Descartes, CPSC

45 PUBLICATIONS 93 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Graphosoma (Pentatomidae) [View project](#)

***Graphosoma lineatum* (L., 1758) et *G. italicum* (O.F. Müller, 1766), deux espèces valides et distinctes, probablement issues de la transgression zancléenne méditerranéenne (Hemiptera Pentatomidae)**

Roland LUPOLI

79 rue Jules-Ferry, F-94120 Fontenay-sous-Bois,
lupoli@free.fr

Résumé. – La comparaison des séquences du gène mitochondrial COI confirme que *Graphosoma italicum* est une espèce valide et distincte de *Graphosoma lineatum*. *G. lineatum* est une espèce plus éloignée génétiquement de *G. italicum* que de l'espèce asiatique bien caractérisée *Graphosoma rubrolineatum*. La répartition de *G. lineatum* est limitée à l'Afrique du Nord et à la Sicile. *G. italicum* est présent partout ailleurs en Europe jusqu'au Moyen-Orient. Deux nouvelles sous-espèces, caractérisées par la couleur de leurs pattes et leur répartition géographique, sont désignées : *G. italicum sardiniensis* n. ssp. est uniquement présente en Sardaigne et *G. lineatum siciliensis* n. ssp. est uniquement présente en Sicile et probablement à Malte. Une hypothèse pour expliquer la séparation de *G. lineatum* et *G. italicum* est proposée : elle serait liée à la transgression zancléenne qui a succédé la crise messinienne, isolant l'Afrique du Nord de l'Espagne depuis 5,3 millions d'années. La formation des sous-espèces serait associée à des invasions par des jonctions terrestres temporaires entre les îles méditerranéennes et les continents ayant eu lieu depuis, à la suite de baisses du niveau de la mer pendant des périodes glaciaires.

Summary. – Sequence comparison of mitochondrial gene COI confirms that *Graphosoma italicum* is a valid and distinct species from *Graphosoma lineatum*. *G. lineatum* is a more genetically distant species from *G. italicum* than the well characterized Asian species *Graphosoma rubrolineatum*. The distribution of *G. lineatum* is limited to North Africa and Sicily. *G. italicum* is present elsewhere in Europe to the Middle East. Two new subspecies, characterized by the color of their legs and their geographical distribution are designated: *G. italicum sardiniensis* n. ssp. is only present in Sardinia and *G. lineatum siciliensis* n. ssp. is present only in Sicily and probably Malta. A hypothesis to explain the separation of *G. lineatum* and *G. italicum* is proposed: it would be linked to the zanclean transgression that followed the Messinian crisis, isolating North Africa from Spain for 5.3 million years. The formation of subspecies would be associated with invasions by temporary land connections between the Mediterranean islands and continents that have occurred since then, following declines of sea level during some glacial periods.

Keywords. – Mitochondrial DNA, Cytochrome oxydase, COI, Barcoding, *Graphosoma italicum*, *lineatum*, *semipunctatum*, *rubrolineatum*, Messinian crisis, Mediterranean sea, sampling, Germany, France, Corsica, Spain, Morocco, Algeria, Italy, Sardinia, Sicily, Greece, Crete, Turkey, Lebanon, Armenia, Iran.

Introduction

Les Pentatomidae du genre *Graphosoma* Laporte de Castelnau, 1833 appartiennent à la sous-famille des Podopinae et se développent uniquement sur les graines d'Apiaceae plus communément appelées ombellifères [LUPOLI, 1994]. Les adultes de ces espèces ont des motifs de couleurs aposématiques caractéristiques constitués d'une alternance de lignes noires longitudinales sur leur face dorsale rouge-orangée (Figure 3). À l'inverse des adultes, les larves de ces espèces sont brunes et cryptiques pour rester cachées sur leur substrat [LUPOLI & DUSOULIER, 2015].

Le genre *Graphosoma* comprend dix espèces uniquement paléarctiques [PÉRICART, 2010]. À l'Ouest de la zone paléarctique, deux espèces morphologiquement proches ont été décrites : *Graphosoma lineatum* (L., 1758) puis *Graphosoma italicum* (O.F. Müller, 1766). La validité de *G. italicum* a été remise en question et son statut a été, et reste encore, controversé.

G. lineatum a été décrit par LINNÉ [1758] d'Afrique du Nord, que l'on nommait à cette époque « Mauritanie » et plus précisément d'Algérie. Le lectotype de cette espèce a été désigné et il est conservé à la Linnean Society of

London (LSL) [DUSOULIER & LUPOLI, 2015]. *G. italicum* a été décrit par MÜLLER [1766] d'Italie, dans les environs de Turin, et le type est considéré comme perdu [RIDER, 2006].

Plus d'un siècle après ces descriptions, PUTON [1881] considère que *G. italicum* est synonyme de *G. lineatum*. HORVÁTH [1909] dans sa révision du genre considère à nouveau *G. italicum* comme une espèce valide, ainsi que VIDAL [1950]. WAGNER [1956] reprend l'avis de Puton et met en synonymie *G. italicum* en montrant qu'il existe un gradient continu dans les caractères morphologiques, essentiellement la couleur des pattes, d'un taxon à l'autre en descendant vers le sud. STICHEL [1960] réhabilite ce taxon en lui attribuant le rang de sous-espèce *G. lineatum italicum* comme SERVADEI [1967]. La plupart des atlas et inventaires des Insectes et Punaïses d'Europe, considèrent qu'il n'existe que la seule espèce *G. lineatum* [PERRIER, 1935; KIS, 1984; SAUER, 1996]. Toutefois VILLIERS [1945] maintient *G. italicum* y compris dans ses rééditions. CHINERY après avoir nommé l'espèce *G. italicum* dans l'édition de son guide en 1986 [CHINERY, 1986] renomme le même dessin *G. lineatum* dans son édition de 2012 [CHINERY, 2012]. LERAUT [2003] emploie *G. italicum* dans son guide bien que l'exemplaire photographié provienne d'Afrique du Nord et possède les caractéristiques de *G. lineatum*. RIDER [2006] dans le *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region* considère que *G. italicum* est synonyme de *G. lineatum*. DUSOULIER & LUPOLI [2006] proposent de revenir à la position d'HORVÁTH [1909] car : « *G. italicum* ne se trouve pas en Afrique du Nord et *G. lineatum* ne se rencontre pas en Espagne. Par contre, elles sont sympatriques sur les Apiaceae dans le Sud de l'Italie où aucun spécimen ne présente de caractères intermédiaires; cela montre qu'il s'agit bien de deux espèces distinctes ». CARAPEZZA & JINDRA [2008] considèrent comme WAGNER [1956] que le taxon *italicum* est une simple variété de *G. lineatum* et inversent malencontreusement dans leur article les photos des deux formes. Dans sa faune ouest-paléarctique des Podopinae, PÉRICART [2010] conserve le statut de sous-espèces car il existe d'après lui des individus d'aspect intermédiaire entre les deux taxons. Dans le supplément (volume 6) de mise à jour

du *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region* de 2006 [AUKEMA *et al.*, 2013], les arguments de DUSOULIER & LUPOLI [2006] et de PÉRICART [2010] sont rejetés et ceux de WAGNER [1956] repris, pour ne considérer qu'une seule espèce valide : *G. lineatum*.

DUSOULIER & LUPOLI [2015] reviennent alors sur les arguments de WAGNER [1956]. Celui-ci compare dans son étude des exemplaires provenant d'Europe du Nord (Allemagne, Ukraine), du Sud de la France, du Sud de l'Italie (sans précision de localités), de Sicile et d'Afrique du Nord (Maroc, Tunisie). Aucun spécimen de Corse, Sardaigne, Espagne, Grèce, Turquie, Proche-Orient, n'a toutefois été examiné. DUSOULIER & LUPOLI [2015] n'ont pas pu confirmer l'existence d'une série de transition clinal de caractères morphologiques entre les deux taxons, en consultant plusieurs centaines de spécimens, ni de populations comprenant les deux taxons, et n'ont observé que des *G. italicum* du nord au sud de l'Espagne et de la Grèce, jusqu'à des latitudes retrouvées en Afrique du Nord ou en Sicile. Ils ont observé uniquement des *G. lineatum* en Afrique du Nord et en Sardaigne.

La comparaison de séquences d'un fragment d'ADN mitochondrial codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase (ADNmt COI) ou barcoding, est une méthode particulièrement efficace pour savoir si deux taxons morphologiquement proches appartiennent ou non à la même espèce, comme cela a été montré dans le genre *Carpocoris* Kolenati, 1846 [LUPOLI *et al.*, 2013].

J'ai donc entrepris un échantillonnage de *Graphosoma* dans plusieurs pays pour faire des analyses moléculaires, dans le but de savoir si le taxon *G. italicum* est valide, et le cas échéant comment se distribuent les deux taxons et pourquoi ? Dans un premier temps et avant d'analyser les résultats moléculaires, j'ai considéré « *G. lineatum* » (avec des guillemets) comme un taxon unique. J'ai également comparé les séquences obtenues aux séquences existantes connues de *G. lineatum*, et à celles de deux autres espèces de *Graphosoma* bien définies et parfaitement identifiables morphologiquement : *Graphosoma semipunctatum* (F., 1775) et *Graphosoma rubrolineatum* (Westwood, 1837).

Graphosoma lineatum (L., 1758) et *G. italicum* (O.F. Müller, 1766), deux espèces valides et distinctes, probablement issues de la transgression zancléenne méditerranéenne (Hemiptera Pentatomidae)

Matériels et méthodes

J'ai échantillonné dans plusieurs pays 34 spécimens de *Graphosoma* dont 29 « *G. lineatum* », numérotés de 6 à 35 (*Annexe A*), ainsi que quatre spécimens de *G. semipunctatum* (GS1 à GS4, *Annexe A*). Les prélèvements des échantillons ont été faits directement sur le terrain dans des tubes Eppendorf de 2 ml remplis d'éthanol à 95 %, ou sur des individus secs conservés en collection. Tous les spécimens ont été conservés.

L'extraction d'ADN total de chaque échantillon a été réalisée à partir d'une patte de chaque spécimen avec le kit Qiagen® *DNeasy Blood & Tissue* (référence 69504). L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) a été décrite par LUPOLI *et al.* [2013] : amorces LCO = TTTCACWAATCATAAAGATATTGG et HCO = TAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA (avec W = A ou T, et R = A ou G).

J'ai tenté d'extraire et d'amplifier d'autres échantillons secs conservés en collection sans succès. Au final, l'amplification a fonctionné pour moins d'un tiers de ces échantillons. L'éthanol dénature instantanément les enzymes de dégradation de l'ADN présentes dans l'insecte au moment de sa collecte et permet ainsi de mieux préserver son ADN. Selon la méthode de séchage initiale des insectes conservés à sec en collection, l'ADN sera plus ou moins dégradé, car c'est la présence prolongée d'eau qui permet aux enzymes d'agir. L'ADN dans un échantillon peut être stable pendant des milliers d'années, comme cela a été montré dans des ossements de l'Homme de Neandertal par exemple [PÄÄBO, 2015]. Ce sont donc les conditions initiales de fixation de l'ADN ou de conservation stérile et au sec après la mort de l'individu qui sont importantes pour maintenir l'intégrité de l'ADN de spécimens de collection. En modifiant les conditions d'extraction, pour des échantillons secs récalcitrants, avec le « Museum Extraction Protocol » de Qiagen, j'ai obtenu parfois en faible quantité des fragments d'ADN de tailles différentes avec des séquences incohérentes correspondant vraisemblablement à des contaminations bactériennes. Et même lorsque le fragment amplifié a la bonne taille, s'il n'est pas de bonne qualité, cela peut parfois interférer avec le séquençage et ne permettre

qu'une lecture partielle de la séquence comme cela a été le cas avec les échantillons 10, 29 et 34. THOMSEN *et al.* [2009] montrent qu'il est toujours possible d'amplifier des fragments à partir de spécimens d'insectes conservés en musée, mais ces fragments sont cassés et donc plus courts (entre 70 et 200 bases). La solution consisterait peut-être à amplifier par PCR de plus petits fragments d'ADNmt en créant des amorces intermédiaires. La technique de pyroséquençage permet justement de gérer des ADN fragmentés chevauchant que l'on réassocie ensuite informatiquement. Cela a permis de séquencer avec succès des génomes entiers à partir d'ADN anciens très fragmentés [PÄÄBO, 2015]. À l'avenir, cette technique sera utilisée en routine y compris pour des projets comme celui-ci, étant donné son faible coût relatif qui ne fait que baisser.

Les séquençages ont été accomplis dans cette étude selon la méthode de Sanger et dans un seul sens de lecture par la société de services GATC Biotech® (Constance, Allemagne). Le séquençage dans les deux sens de lecture selon cette méthode permet de corriger d'éventuelles erreurs de lecture du séquenceur surtout en début et fin de séquence. Toutefois, j'ai préféré dans cette étude préliminaire, pour des raisons de coût, privilégier le nombre d'échantillons séquencés, plutôt qu'un double séquençage de chaque échantillon. Les erreurs ont été minimisées en ne tenant pas compte des bases douteuses par l'analyse de chaque chromatogramme de séquençage. Cette même méthode (PCR et séquençage) que j'utilise en routine sur d'autres échantillons permet de lire généralement plus de 1 000 bases dans un seul sens avant d'observer des ambiguïtés de lecture. Les résultats obtenus (*Annexe A*) montrent d'ailleurs des individus possédant des séquences identiques à celles qui avaient été obtenues par d'autres chercheurs auparavant et ce, malgré toutes les conditions qui peuvent varier à toutes les étapes d'extraction, de purification et de séquençage, ce qui montre une certaine robustesse de cette méthode.

J'ai utilisé également onze séquences publiées dans la base de données GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> consultée le 12/07/2016) pour les comparer aux miennes,

dont sept séquences de « *G. lineatum* » provenant d'Allemagne [RAUPACH *et al.*, 2014] (n°s 1, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5, *Annexe A*), une de « *G. lineatum* » provenant d'Iran [KARAMIPOUR *et al.*, 2016] (n° 36, *Annexe A*), deux de *G. rubrolineatum* provenant de Corée du Sud [CHO *et al.*, 2013; JUNG *et al.*, 2011] (GRI et GR2, *Annexe A*), et également une de *Dolycoris baccarum* provenant d'Allemagne (n° d'accension GenBank® KMO22809) [RAUPACH *et al.*, 2014] pour servir de groupe externe (outgroup) au genre *Graphosoma* dans l'analyse. Au total, 45 séquences d'ADNmt COI ont donc été comparées dans cette étude, dont 38 spécimens de « *G. lineatum* ». Les 36 localisations ouest-paléarctiques de ces échantillons sont présentées en *Figure 1*.

J'ai choisi une séquence référence de 658 bases nucléiques (échantillon 1 = référence 1) (*Annexes A et B*) pour numérototer toutes les bases nucléiques (A = adénine, T = thymine, G = guanine, C = cytosine) de cet ADN et pouvoir comparer les séquences de tous les échantillons à chaque position, après alignement avec le logiciel ClustalW2™ (séquence en lettres minuscules, *Annexe B*). Les modifications de chaque séquence par rapport à la séquence de référence 1 ont été notées en *Annexe A* de la façon suivante : la première lettre correspond à la base nucléique de la séquence de référence

1, elle est suivie du numéro de sa position (1 à 658), lui-même suivi d'une lettre qui correspond à la nouvelle base nucléique dans la séquence comparée. Par exemple C340T indique une modification de C en T par rapport à la référence 1 dans cet échantillon à la position 340.

Une analyse phylogénique de l'ensemble des 45 séquences alignées a été réalisée avec le logiciel Mega 6.06™ selon la méthode Maximum Likelihood avec 1 000 réplifications de bootstrapping [LUPOLI *et al.*, 2013].

Résultats

Les spécimens de « *G. lineatum* » provenant d'Afrique du Nord (échantillons 13 et 14) et ceux provenant de Sardaigne (échantillons 15, 16, 17 et 18), ainsi que tous ceux que j'ai pu observer de ces deux régions, ont tous les pattes globalement rouges. Les autres ont tous les pattes globalement noires (*Figures 3a, 3e et 3f*) [LUPOLI & DUSOULIER, 2015]. Par pattes globalement rouges, je veux dire qu'en vue dorsale, on peut attribuer aux fémurs et aux tibias une teinte claire de couleur rouge-orangée au premier coup d'œil (*Figures 3b et 3d*) comme chez *G. semipunctatum* (*Figure 3c*). Des taches ou des spots noirs peuvent être présents sur les fémurs et tibias, mais ils n'impactent pas la

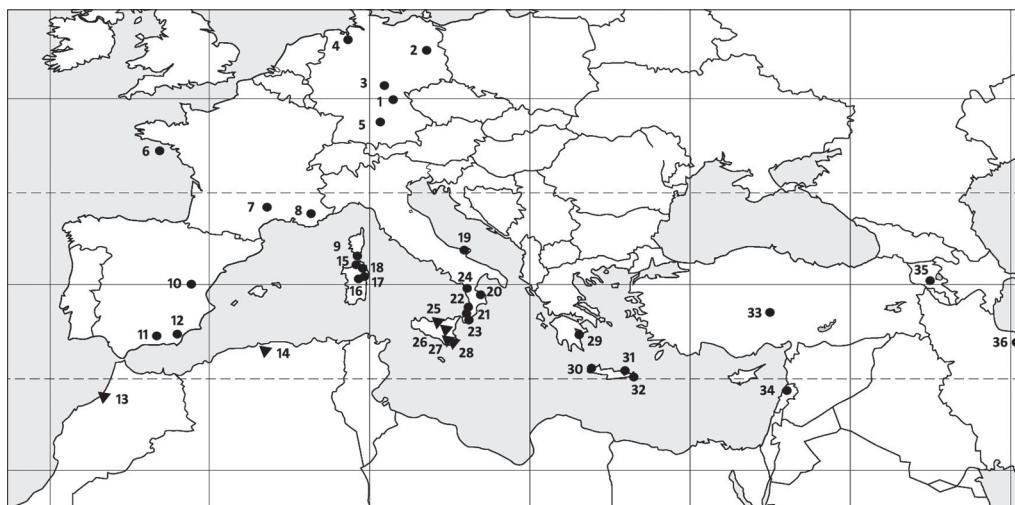


Figure 1. – Carte de la région ouest-paléarctique présentant les 36 prélèvements de « *Graphosoma lineatum* » réalisés pour séquencer le gène COI de leur ADN mitochondrial (*Annexe A*). Après analyse et comparaison des séquences, les cercles représentent finalement des *Graphosoma italicum* (sauf le point 36 qui est un *Graphosoma* indéterminé) et les triangles des *Graphosoma lineatum*.

Graphosoma lineatum (L., 1758) et *G. italicum* (O.F. Müller, 1766), deux espèces valides et distinctes, probablement issues de la transgression zancléenne méditerranéenne (Hemiptera Pentatomidae)

couleur claire globale rouge-orangée des pattes en vue dorsale. *Idem* pour ce que j'appelle des pattes globalement noires, avec des taches rouge sombre variables mais qui n'impactent pas la couleur globale noire ou sombre des pattes. La couleur globale des pattes permet donc de séparer deux clades de « *G. lineatum* », l'un provenant d'Afrique du Nord et de Sardaigne et l'autre provenant de toutes les autres régions de la zone ouest-paléarctique. De plus, les individus appartenant au premier clade possèdent une petite tache noire près de l'apex de la face inféro-latérale des jugas, alors que ceux du deuxième clade ont une bande noire au même endroit qui se prolonge presque jusqu'à la base du tubercule antennaire [LUPOLI & DUSOULIER, 2015]. Je n'ai pas trouvé d'autres caractères morphologiques permettant de séparer plus clairement ces deux clades, notamment au niveau des génitalia mâle et femelle.

La comparaison des 45 séquences d'ADNmt COI est présentée sous forme d'un arbre phylogénique en Figure 2. On observe que les spécimens des deux espèces bien caractérisées morphologiquement *G. semipunctatum* et *G. rubrolineatum* sont regroupés en clades. *G. semipunctatum* est l'espèce la plus éloignée des autres *Graphosoma* et elle s'est donc probablement différenciée depuis plus longtemps que les autres. Les spécimens de « *G. lineatum* » peuvent être séparés en trois clades différents notés A, B et C sur la Figure 2. Les spécimens du clade A sont plus proches de *G. semipunctatum* que de *G. rubrolineatum* et des spécimens du clade B. De plus, comme *G. rubrolineatum* s'intercale entre les clades A et B, cela montre aussi que ces deux clades A et B correspondent à deux espèces différentes.

Étant donné que *G. lineatum* a été décrit par LINNÉ [1758] à partir de deux spécimens à pattes globalement rouges, récoltés en Afrique du Nord [DUSOULIER & LUPOLI, 2015], on peut donc considérer que les spécimens du clade A sont bien de « véritables » *G. lineatum*.

MÜLLER [1766] a décrit *G. italicum* à partir d'au moins un spécimen provenant des environs de Turin en Italie. On peut donc considérer que les spécimens du clade B, les plus largement répartis dans toute l'Europe continentale, y compris

dans toute l'Italie continentale, correspondent à des *G. italicum* et non à des *G. lineatum*. Ces spécimens ont une répartition géographique étendue incluant les pays suivants : Espagne, France et Corse, Allemagne, Italie continentale et Sardaigne, Grèce et Crète, Turquie, Arménie, Liban. Les spécimens du clade B ont donc tous été nommés *G. italicum* en Figure 2. Le pourcentage de divergence entre *G. lineatum* et *G. italicum* est de l'ordre de 10 % (Tableau I) ce qui représente 47 bases nucléiques différentes alors qu'il existe environ 13 % de divergence entre *G. semipunctatum* et *G. italicum* avec 56 bases différentes (Tableau I et Annexe A).

G. rubrolineatum, une espèce uniquement présente en Asie de l'Est, semble plus proche de *G. italicum* (4,3 % de divergence) que le clade C représenté par un seul spécimen n° 36 provenant d'Iran (5,3 % de divergence). KARAMIPOUR *et al.* [2016] montrent la photo d'une vue dorsale de ce spécimen : il possède des pattes globalement noires et ressemble à *G. italicum*. Ce spécimen n'est donc ni un *G. lineatum*, ni un *G. rubrolineatum*, ni un *G. italicum*. Il serait intéressant à l'avenir d'échantillonner d'autres *Graphosoma* au Moyen-Orient pour retrouver ce type de séquence et analyser d'autres gènes pour savoir s'il s'agit d'une nouvelle espèce, ou d'un variant morphologique d'un autre *Graphosoma* déjà décrit, comme *G. melanoxanthum* par exemple.

Les spécimens de *G. lineatum* d'Afrique du Nord se distinguent de *G. italicum* à la fois par un critère morphologique et par un critère moléculaire. Il y a congruence entre les différences observées concernant la coloration des pattes et la séquence d'ADNmt COI. Cela n'est pas le cas en Sardaigne et en Sicile puisque les spécimens de *G. italicum* de Sardaigne ont les pattes globalement rouges, et les spécimens de *G. lineatum* de Sicile ont les pattes globalement noires.

On ne rencontre en Sardaigne que des individus de *G. italicum* à pattes globalement rouges, non seulement aux quatre endroits distants échantillonnés, mais aussi partout ailleurs sur cette île. On ne trouve donc pas d'individu à pattes globalement noires en Sardaigne, et on ne trouve pas d'individu

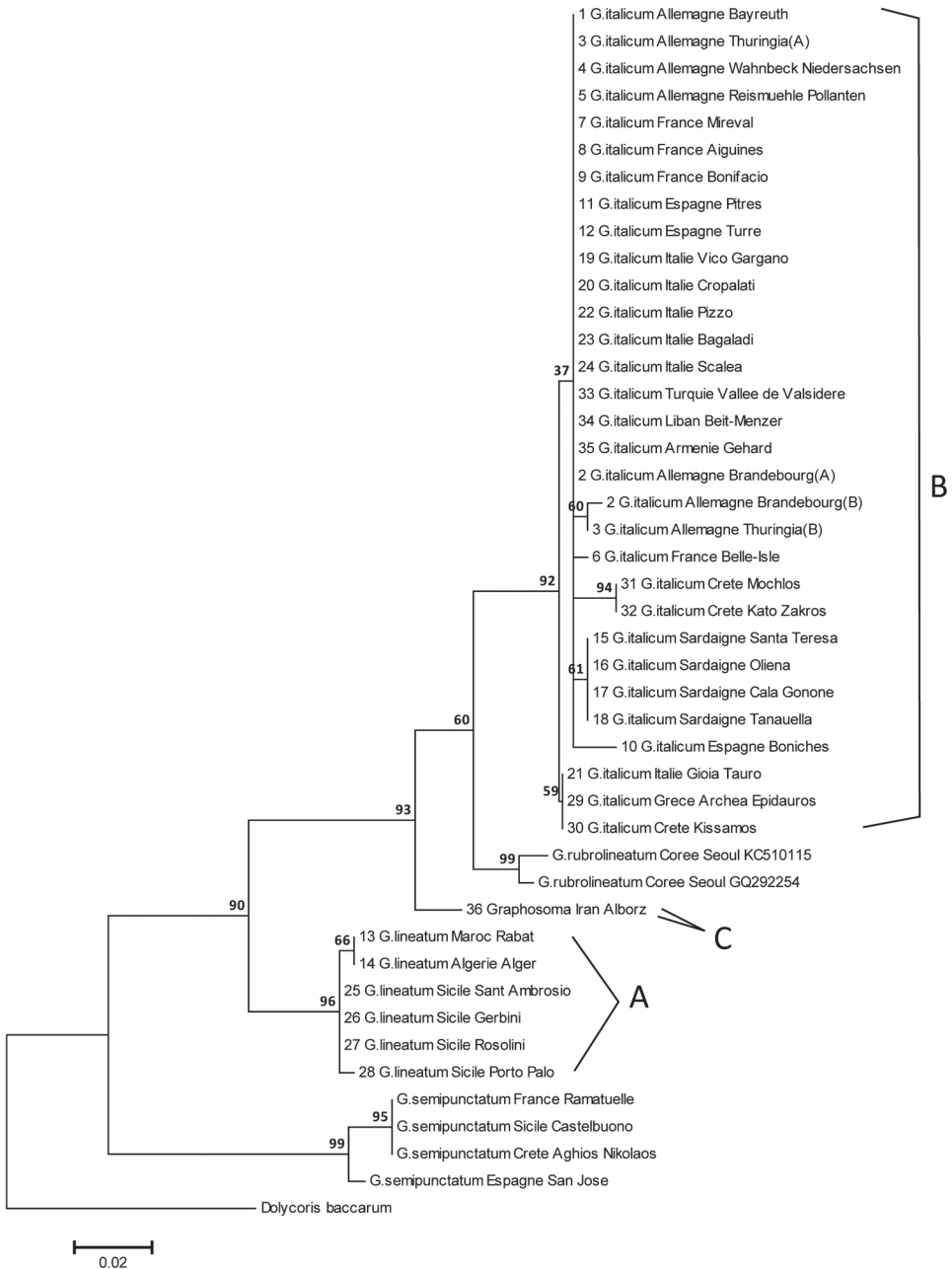


Figure 2. – Arbre phylogénique, obtenu par comparaison de 45 séquences du gène COI de l'ADN mitochondrial, réalisé, après alignement avec le logiciel ClustalW2™, avec le logiciel Mega 6.06™ selon la méthode Maximum Likelihood avec 1 000 réplifications de bootstrapping [LUPOLI *et al.*, 2013]. Les valeurs de bootstrap aux embranchements de l'arbre correspondent au pourcentage de fiabilité de la construction considérée. Les espèces déduites des comparaisons de séquences sont indiquées avec leurs numéros de prélèvements (Annexe A et Figure 1). Les trois groupes ou clades d'espèces A, B et C appartenant au groupe initialement appelé « *Graphosoma lineatum* » sont montré: il s'agit respectivement de *G. lineatum*, *G. italicum* et une espèce de *Graphosoma* nouvelle d'Iran à décrire ultérieurement.

Graphosoma lineatum (L., 1758) et *G. italicum* (O.F. Müller, 1766), deux espèces valides et distinctes, probablement issues de la transgression zancléeenne méditerranéenne (Hemiptera Pentatomidae)

à pattes globalement rouges en Corse. On peut considérer que ces populations sont géographiquement séparées, et qu'elles n'ont plus eu d'échanges génétiques récents. Je désigne donc les individus de *G. italicum* provenant de Sardaigne comme appartenant à la sous-espèce insulaire *sardiniensis* n. ssp. (Figure 3d) :

***Graphosoma italicum sardiniensis* n. ssp.**

Holotype ♀. Deux étiquettes imprimées, épinglées sous le spécimen : a) Italie (Sardaigne), Santa Teresa, 28-V-2008, Roland Lupoli leg. ; b) en dessous, étiquette rouge : « Holotype / *Graphosoma italicum sardiniensis* / Roland Lupoli, 2016 ». Déposé au Muséum national d'Histoire naturelle de Paris (MNHN).

Je désigne donc également le lectotype de *Graphosoma italicum italicum* (Figure 3a) :

Graphosoma italicum italicum

(O.F. Müller, 1766)

comb. nov.

Lectotype ♀. Deux étiquettes imprimées, épinglées sous le spécimen : a) France (Hérault), Saint-Martin-de-Londres (Frouzet) 21-V-1989 Roland Lupoli leg. ; b) en dessous, étiquette rouge : « Lectotype / *Graphosoma italicum italicum* / (O.F. Müller, 1766) désigné par

Roland Lupoli 2016 ». Déposé au MNHN.

De la même façon, les quatre spécimens échantillonnés à des endroits distants en Sicile sont tous des *G. lineatum* à pattes globalement noires. Il est probable que cela soit le cas sur toute l'île de Sicile, car les cinq échantillons de Calabre que j'ai analysés provenant d'endroits distants sont tous des *G. italicum italicum*. Je désigne donc les individus de *G. lineatum* provenant de Sicile comme appartenant à la sous-espèce insulaire *siciliensis* n. ssp. (Figure 3e) :

***Graphosoma lineatum siciliensis* n. ssp.**

Holotype ♂. Deux étiquettes imprimées, épinglées sous le spécimen : a) Italie (Sicile), Castelbuono 14-VI-2013, Roland Lupoli leg. ; b) en dessous, étiquette rouge : « Holotype / *Graphosoma lineatum siciliensis* / Roland Lupoli, 2016 ». Déposé au MNHN.

Il existe une forte ressemblance morphologique croisée entre *G. italicum sardiniensis* n. ssp. et *G. lineatum lineatum* et entre *G. italicum italicum* et *G. lineatum siciliensis* n. ssp. Cela concerne aussi la présence d'une bande noire sur la face inféro-latérale des jugas qui se retrouve aussi bien chez *G. italicum italicum* que chez *G. lineatum siciliensis* n. ssp. et la présence seulement d'une

	<i>G. italicum italicum</i>	<i>G. italicum</i> (Sardaigne)	<i>G. italicum</i> (Crète)	<i>Graphosoma</i> (Iran)	<i>G. lineatum</i> (Afrique du Nord)	<i>G. lineatum</i> (Sicile)	<i>Graphosoma rubrolineatum</i>	<i>Graphosoma semipunctatum</i>	<i>D. baccarum</i>
<i>G. italicum italicum</i>	0,3								
<i>G. italicum</i> (Sardaigne)	0,5	0,0							
<i>G. italicum</i> (Crète)	1,3	1,5	0,0						
<i>Graphosoma</i> (Iran)	5,3	5,0	5,4	0,0					
<i>G. lineatum</i> (Afrique du Nord)	9,8	9,5	10,9	8,1	0,0				
<i>G. lineatum</i> (Sicile)	10,1	10,0	11,2	7,8	0,5	0,2			
<i>Graphosoma rubrolineatum</i>	4,3	4,0	5,4	4,4	9,7	10,3	1,1		
<i>Graphosoma semipunctatum</i>	12,7	13,1	13,5	15,1	13,3	12,7	15,1	0,7	
<i>D. baccarum</i>	20,9	20,5	21,3	19,9	16,3	15,9	20,8	15,9	0,0

Tableau 1. – Pourcentages de divergence entre les *Graphosoma* échantillonnés dans le gène COI de l'ADN mitochondrial. Les divergences intragroupes sont montrées sur la diagonale du tableau. *Dolycoris baccarum* est utilisé comme outgroup.

petite tache noire à l'apex se retrouve chez *G. lineatum lineatum* et *G. italicum sardiniensis* n. ssp. [LUPOLI & DUSOULIER, 2015].

La variabilité intraspécifique de l'ADNmt COI observée dans toute l'Europe chez *G. italicum italicum* est du même ordre de grandeur (0,3 %) que la divergence observée entre *G. italicum italicum* et *G. italicum sardiniensis* n. ssp. (0,5 %) ce qui ne permet donc pas de distinguer ces deux sous-espèces à l'aide de ce critère (Tableau 1). Toutefois, si on regarde plus précisément l'origine de la variation engendrée, on constate que les quatre individus prélevés à des endroits distants en Sardaigne ont tous, les quatre mêmes modifications

en commun : C118T, C214T, A328G, G541A (Annexe A). On observe la même chose avec une divergence de 0,5 % observée entre *G. lineatum lineatum* et *G. lineatum siciliensis* n. ssp. : les quatre individus de Sicile ont la même séquence que ceux d'Afrique du Nord, avec en plus deux modifications qu'ils ont en commun : C505T et C616T (Annexe A).

Discussion

À la fin du Miocène, il y a 5,96 millions d'années, un événement géologique aboutit à la fermeture de la communication entre les eaux atlantiques et méditerranéennes. Cela provoque alors un

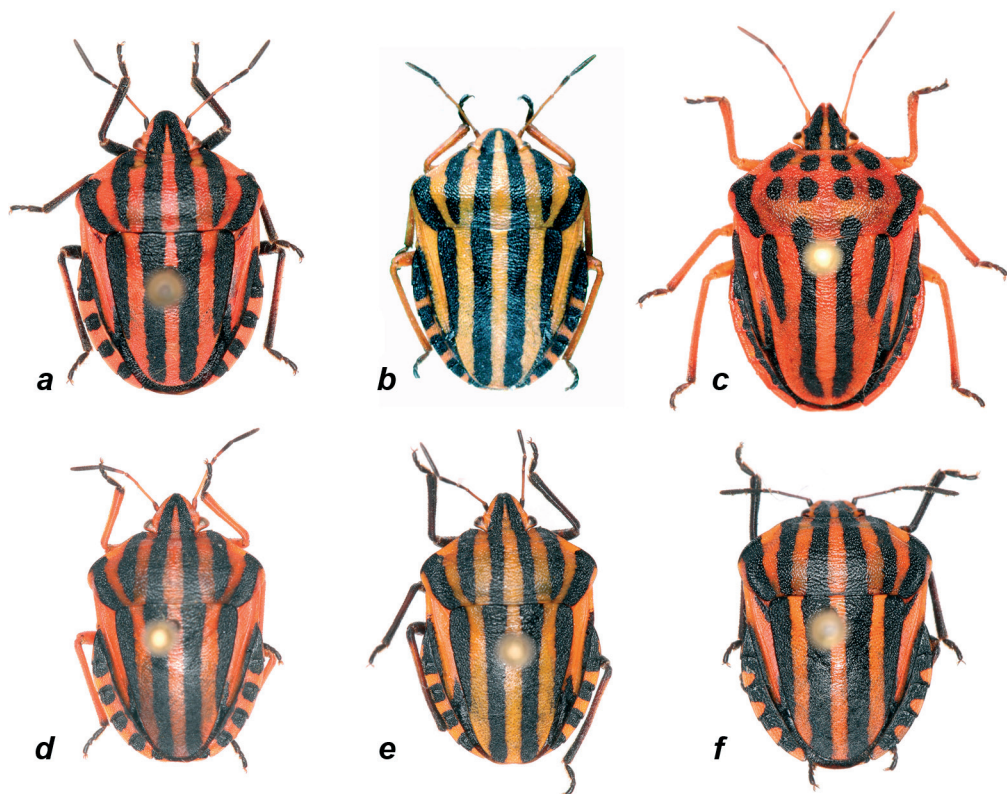


Figure 3. – a) *Graphosoma italicum italicum*. Lectotype ♀, France (Hérault), Saint-Martin-de-Londres (Frouzet), 21-V-1989, Roland Lupoli leg., collection MNHN. b) *Graphosoma lineatum lineatum*. ♀ Algérie, Alger, plage de Tipaza, 19-VI-1979, Jean-Michel Maldès leg., collection Roland Lupoli. c) *Graphosoma semipunctatum*. ♀ France (Var), Aiguines, 2-VIII-1984, Roland Lupoli leg., collection Roland Lupoli. d) *Graphosoma italicum sardiniensis* n. ssp. Holotype ♀, Italie (Sardaigne), Santa Teresa, 28-V-2008, Roland Lupoli leg., collection MNHN. e) *Graphosoma lineatum siciliensis* n. ssp. Holotype ♂, Italie (Sicile), Castelbuono, 14-VI-2013, Roland Lupoli leg., collection MNHN. f) *Graphosoma rubrolineatum*. ♀ Chine (Shaanxi prov.), env. Zhouzhi, Taibaishan National Park, 1 350 m, 30-V-1999, Sergei Murzin leg., collection Roland Lupoli.

Graphosoma lineatum (L., 1758) et *G. italicum* (O.F. Müller, 1766), deux espèces valides et distinctes, probablement issues de la transgression zancléenne méditerranéenne (Hemiptera Pentatomidae)

assèchement progressif pendant 630 000 ans d'une grande partie de la Méditerranée, avec un abaissement du niveau marin de 1 500 à 2 500 m, produisant des dépôts importants de sels, ce que l'on appelle la crise de salinité messinienne. Toutes les îles méditerranéennes actuelles ont alors été reliées aux continents. On peut donc imaginer qu'à cette époque un ancêtre commun de *G. lineatum* et *G. italicum* ait pu ainsi se disperser sur l'ensemble du pourtour méditerranéen et des îles. Il y a 5,33 millions d'années, la fermeture s'effondre au niveau du détroit de Gibraltar et la Méditerranée se remplit de nouveau très rapidement en quelques décennies seulement. C'est ce que l'on appelle la transgression zancléenne du Pliocène [GARCIA-CASTELLANOS *et al.*, 2009]. Depuis, l'Espagne et l'Afrique du Nord n'ont alors plus jamais été en contact terrestre. À partir de ce moment, les populations de *Graphosoma* d'Afrique du Nord ont été isolées des autres, l'espèce n'étant pas capable de vivre dans les zones désertiques côtières libyennes et égyptiennes. Les populations européennes, tout d'abord limitées aux régions les plus chaudes, ont alors évolué indépendamment et ont certainement dû être sélectionnées pour survivre aux glaciations successives, puis être capables de remonter plus au nord durant les périodes interglaciaires, sans toutefois s'implanter en Grande-Bretagne. Il est possible que l'apparition de la couleur des pattes globalement noires soit liée à cela, pour mieux capter la chaleur. Ces populations progressivement devenues des *G. italicum* ont alors envahi l'Europe, de l'Espagne à la Turquie, puis à l'Arménie et au Liban, bloquées elles aussi par les zones désertiques. Il est probable que *G. italicum* ait acquis de bonnes capacités de dissémination permettant d'assurer des échanges génétiques fréquents, puisque des populations éloignées ont le même ADNmt COI. Toutefois la barrière de 18 km du détroit de Gibraltar et les zones désertiques leur sont restées infranchissables pendant plus de cinq millions d'années ce qui a conduit à la mise en place de 47 bases différentes séparant aujourd'hui les deux espèces *G. lineatum* et *G. italicum*. Depuis cinq millions d'années, beaucoup de périodes glaciaires se sont succédées. La formation de glaciers aboutissant à chaque fois à une baisse globale du niveau de la mer, moins importante que pendant la crise

messinienne, mais atteignant parfois 120 m et peut-être plus. Compte tenu des profondeurs entre les îles et les continents, le bloc corso-sarde a été temporairement rattaché à l'Italie du Nord, les côtes de Sicile et de Tunisie se sont rapprochées, comme celles de Crète et de Grèce, pendant les périodes les plus froides (Figure 4).

Il est intéressant de constater que trois des quatre bases modifiées séparant *G. italicum italicum* de *G. italicum sardiniensis* n. ssp. : C118T, C214T, G541A sont des bases que l'on retrouve aussi chez *G. lineatum*, dont deux (C214T et G541A) uniquement chez *G. lineatum* et non chez *G. semipunctatum*. Cela semble indiquer que *G. italicum sardiniensis* n. ssp. est une sous-espèce relique plus primitive que *G. italicum italicum*. S'il s'agissait d'une adaptation à un climat plus sec, ces modifications devraient se retrouver chez les individus du Sud de l'Espagne ou du Liban, ce qui n'est pas le cas. Il est donc possible que l'invasion de *G. italicum italicum* en Sardaigne n'ait pas été suffisamment complète et homogène durant les dernières glaciations pour « s'imposer génétiquement » comme en Corse et dans le reste de l'Europe (Figure 4). Cette hypothèse est bien plus envisageable qu'un lien terrestre post-messinien entre l'Afrique du Nord et la Sardaigne qui est difficilement concevable compte tenu des profondeurs de plus de

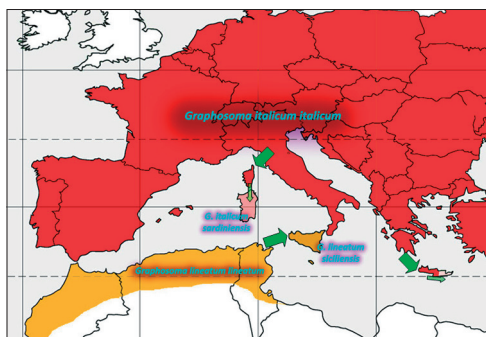


Figure 4. – Répartitions de *Graphosoma lineatum* (en orange clair et foncé) et *Graphosoma italicum* (en rouge et rose) et de leurs sous-espèces à l'ouest de la région paléarctique. Les flèches vertes montrent les passages hypothétiques qui auraient eu lieu pendant les périodes glaciaires post-messinienes. Les flèches larges correspondent à des invasions massives et les flèches fines à des invasions moins importantes.

1 000 m qui les séparent sur plus de 50 km. Une introduction d'origine humaine accidentelle est toujours possible, mais peu probable car de telles modifications nécessitent du temps et un flux d'individus important, incompatibles avec l'échelle humaine. Les *G. italicum sardiniensis* n. ssp. auraient conservé de leurs ancêtres les pattes globalement rouges et ces trois bases ancestrales, et les isolements de la Sardaigne pendant les périodes interglaciaires et peut-être un climat plus chaud, auraient permis le maintien de ces caractères sur l'île. Les Bouches de Bonifacio séparent la Corse de la Sardaigne distantes de 11 km. *G. italicum sardiniensis* n. ssp. est également présent au Sud de la Corse sur les îlots Lavezzi [LUPOLI & DUSOULIER, 2015] mais il est absent du reste de la Corse, et inversement *G. italicum italicum* est absent en Sardaigne. La profondeur de 100 m qui sépare les deux îles a donc dû permettre, lors des épisodes de glaciations successifs, des passages de *G. italicum* liés à la baisse du niveau de la mer, mais ces passages sans doute relativement courts et limités par un étroit couloir (Figure 4) n'ont pas permis la « dilution » complète du génome ancestral, de la même façon que chaque européen possède encore 2 % du génome de l'Homme de Neandertal [PÄÄBO, 2015].

Les individus 31 et 32 récoltés en Crète orientale possèdent huit bases différentes par rapport à *G. italicum italicum*, dont quatre en commun avec *G. lineatum* : T157C, C214T, C274A, C613T. Cela irait également dans le sens d'invasions partielles de *G. italicum italicum* depuis la Grèce continentale, et à un isolement par la mer de la partie est de la Crète (Figure 4). Cet isolement génétique, encore présent en Crète aujourd'hui, indiquerait que la jonction actuelle des différentes parties de l'île temporairement isolées est relativement récente, comme le suggère SFIKAS [1993] pour des distributions botaniques. Ces individus ne possèdent pas de différences morphologiques avec *G. italicum italicum*, mais une divergence de 1,3 % de leur ADNmt COI. D'autres investigations moléculaires et prélèvements supplémentaires seront nécessaires pour confirmer la répartition de ces individus en Crète.

Le lien ou le rapprochement terrestre est l'hypothèse que je privilégie pour expliquer la présence d'individus génétiquement proches

des *G. lineatum* d'Afrique du Nord, à quatre endroits distants en Sicile. Bien que le détroit de Sicile sépare de 145 km la Tunisie de la Sicile, les profondeurs y sont relativement faibles (environ 100 m) sur une grande partie de celui-ci, mais au nord de l'île de Pantelleria au large du Cap Bon, il reste un passage étroit dont la profondeur atteint 200 m. Il est possible que la présence de la faille de contact entre les plaques eurasiennne et africaine à cet endroit ait subi des mouvements tectoniques qui ont amplifié sa profondeur actuelle ou que des courants aient creusé les fonds. En effet, il a été montré que des espèces terrestres sont passées entre la Tunisie et la Sicile pendant les glaciations en raison de la baisse du niveau de la mer. L'exemple le plus connu concerne l'Éléphant nain *Elephas falconeri* présent au Pléistocène en Sicile et à Malte. STÖCK *et al.* [2008] ont mis en évidence une proximité génétique entre les Crapauds du genre *Bufo* présents en Tunisie et en Sicile, par comparaison de séquences d'ADN génomiques et mitochondriales. La nouvelle espèce endémique *Bufo siculus* de Sicile est génétiquement plus proche des *Bufo boulengeri* de Tunisie que des *Bufo balearicus* présents au Nord-Est de la Sicile, en Italie continentale, Sardaigne et Corse. Il est donc probable que le détroit ait été moins profond auparavant, ou que le niveau de l'eau soit descendu plus bas, au cours des différentes oscillations climatiques glaciaires post-messinien, pour que des Éléphants, des Crapauds ou des *Graphosoma* aient pu passer. J'émet donc l'hypothèse que des *G. lineatum* auraient envahi massivement la Sicile depuis la Tunisie pendant des périodes glaciaires et se seraient imposés sur des *G. italicum* métissés encore présents (Figure 4), sans toutefois s'imposer au delà du détroit de Messine qui ne fait pourtant que 3,2 km de large et 95 m de profondeur (il est amusant de constater que l'ancien nom de Messine est Zancle, nom à l'origine de l'étagé zancéen du Pliocène), car je n'ai trouvé que des *G. italicum italicum* en Italie continentale. Il est possible que les *G. lineatum siciliensis* n. ssp. aient hérité, suite à leur invasion, des pattes globalement noires par hybridations avec des *G. italicum*; ou bien des barrières génétiques suffisamment fortes se seraient mises en place, empêchant l'hybridation des deux espèces, et ce caractère aurait été acquis secondairement par

Graphosoma lineatum (L., 1758) et *G. italicum* (O.F. Müller, 1766), deux espèces valides et distinctes, probablement issues de la transgression zancléenne méditerranéenne (Hemiptera Pentatomidae)

dérive génétique depuis leur nouvel isolement de l'Afrique du Nord, de même que les modifications des deux bases observées : C505T et C616T. Il est très probable que *G. lineatum siciliensis* n. ssp. soit également la seule sous-espèce présente à Malte étant données les faibles profondeurs qui relient cette île à la Sicile.

Parmi les 21 ou 22 modifications observées entre *G. rubrolineatum* et *G. italicum*, 11 sont en commun avec *G. lineatum*. De la même façon, parmi les 17 modifications du *Graphosoma* d'Iran (n° 36), 9 sont en commun avec *G. lineatum*. Ces observations suggèrent que les deux espèces *G. rubrolineatum* et le *Graphosoma* d'Iran (n° 36) seraient issues d'un ancêtre commun à *G. lineatum* qui s'est peut-être hybridé avec *G. italicum* pendant ses migrations vers l'est avant de s'isoler génétiquement en Iran puis en Asie.

D'autres campagnes d'échantillonnages plus étendues et l'analyse d'autres gènes seront nécessaires pour mieux définir la taxonomie du genre *Graphosoma*, confirmer ces observations préliminaires, mais aussi comprendre les liens entre les espèces et leurs répartitions. D'autre part, cette étude montre que le genre *Graphosoma* est un bon modèle pour mieux comprendre l'histoire de la formation de la Méditerranée et de ses îles.

Remerciements. – Je remercie Jean-Claude Streito pour son aide dans le développement des techniques moléculaires, pour les essais préliminaires qu'il a réalisés, nos discussions et sa relecture critique du manuscrit. Je remercie également Pierre Nioche et l'unité INSERM U1124 de l'Université Paris Descartes pour son aide logistique et Sergei Murzin pour ses communications d'échantillons de *Graphosoma* orientaux. Je remercie également les Junta de Andalusia et de Castilla y Leon pour leurs autorisations de collecte.

Références bibliographiques

AUKEMA B., RIEGER C. & RABITSCH W. (ed.), 2013. – *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic region. Volume 6 : Supplement*. Amsterdam, The Netherlands Entomological Society, xxiv + 629 p.

CARAPEZZA A. & JINDRA Z., 2008. – *Graphosoma* (*Graphosomella* subgen. nov.) *inexpectatum* sp. nov. from Syria (Hemiptera Heteroptera Pentatomidae). *Il Naturalista Siciliano*, S. IV, 32 (3-4) : 471-478.

CHINERY M., 1986. – *Collins Guide to the Insects of Britain and Western Europe*. Jersey, Domino Books Ltd, 320 p.

CHINERY M., 2012. – *Insectes de France et d'Europe occidentale*. Paris, Flammarion, 320 p.

CHO S.Y., SUH K.I., KIM K.H. & BAE Y.J., 2013. – Study on the identification methods of food pest insects using DNA barcodes (résultats dans GenBank mais non publiés dans une revue).

DUSOULIER F. & LUPOLI R., 2006. – Synopsis des Pentatomoidea Leach, 1815 de France métropolitaine (Hemiptera, Heteroptera). *Nouvelle revue d'entomologie*, nouvelle série, 23 (1) : 11-44.

DUSOULIER F. & LUPOLI R., 2015. – Les Pentatomoidea de France (Hemiptera, Heteroptera) : clarifications taxinomiques et mises à jour nomenclaturales et biogéographiques. *L'Entomologiste*, 71 (6) : 353-366.

GARCIA-CASTELLANOS D., ESTRADA F., JIMENEZ-MUNT I., GORINI C., FERNANDEZ M., VERGES J. & DE VICENTE R., 2009. – Catastrophic flood of the Mediterranean after Messinian salinity crisis. *Nature*, 462 : 778-781.

HORVÁTH G., 1909. – Les *Graphosoma* d'Europe. *Annales historico-naturales Musei nationalis hungarici*, 7 : 143-150.

JUNG S., DUWAL R.K. & LEE S. 2011. – COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources*, 11 (2) : 266-270.

KARAMIPOUR N., MEHRABADI M. & FATHIPOUR Y., 2016. – Gammaproteobacteria as essential primary symbionts in the striped shield bug, *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae). *Nature Scientific Reports*, 6 : 33168 (1-12).

KIS B., 1984. – *Heteroptera. Partea generala și suprafamilia Pentatomoidea. Fauna Republicii Socialiste România, Insecta, vol. VIII, fasc. 8*. Bucuresti, Academia Republicii socialiste România, 216 p.

LERAUT P., 2003. – *Le guide entomologique*. Paris, Delachaux et Niestlé, 527 p.

LINNAEUS C., 1758. – *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata. Tomus I. Holmiae, Laurentii Salvii*, IV + 824 p.

- LUPOLI R., 1994. – Les punaises des ombellifères de France. *Insectes*, 93 (2) : 8-10.
- LUPOLI R., DUSOULIER F., CRUAUD A., CROS-ARTEIL, S. & STREITO J.-C., 2013. – Morphological, biogeographical and molecular evidence of *Carpocoris mediterraneus* as a valid species (Hemiptera: Pentatomidae). *Zootaxa*, 3609 (4) : 392-410.
- LUPOLI R. & DUSOULIER F., 2015. – *Les Punaises Pentatomoidea de France*. Fontenay-sous-Bois, Éditions Ancyrosoma, 429 p.
- MÜLLER O.F., 1766. – Manipulus insectorum Taurinensium. *Mélanges de Philosophie et de Mathématique de la société Royale de Turin*, 3 (1762-1765) : 185-198.
- PÄÄBO S., 2015. – *Néandertal – À la recherche des génomes perdus*. Paris, Éditions Les Liens qui Libèrent, 384 p.
- PÉRICART J., 2010. – *Hémiptères Pentatomoidea Euro-Méditerranéens. Volume 3 : systématique : troisième partie : sous-familles Podopinae et Asopinae. Faune de France 93*. Paris, Fédération française des sociétés de sciences naturelles, 291 p., 24 pl. coul.
- PERRIER R., 1935. – *La Faune de la France illustrée IV Hémiptères, Anoploures, Mallophages, Lépidoptères*. Paris, Delagrave, 244 p.
- PUTON A., 1881. – *Synopsis des Hémiptères-Hétéroptères de France. Deuxième volume. 4^e partie : famille des Pentatomides*. Paris, Deyrolle, 129 p.
- RAUPACH M.J., HENDRICH L., KÜCHLER S.M., DEISTER F., MORINIÈRE J. & GOSSNER M.M., 2014. – Building-up of a DNA barcode library for true bugs (insecta: hemiptera: heteroptera) of Germany reveals taxonomic uncertainties and surprises. *PLoS ONE*, 9 (9), e106940.
- RIDER D.A., 2006. – Family Pentatomidae Leach, 1815, 233-402. In AUKEMA B. & RIEGER C. (ed.), *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic region. Volume 5: Pentatomomorpha II*. Amsterdam, The Netherlands Entomological Society, 550 p.
- SAUER F., 1996. – *Wanzen und Zikaden nach Farbfotos erkannt*. Karlsfeld, Fauna Verlag, 182 p.
- SERVADEI A., 1967. – *Rhynchota (Heteroptera, Homoptera, Auchenorrhyncha). Catalogo topografico e sinonimico. Fauna d'Italia, vol. IX*. Bologna, Calderini, 851 p.
- SFIKAS G., 1993. – *Fleurs sauvages de Crète*. Athènes, Efstathiadis Group S.A., 311 p.
- STICHEL W., 1960. – *Illustrierte Bestimmungstabellen der Wanzen. II. Europa (Hemiptera-Heteroptera Europae)*. Berlin-Hermsdorf, Stichel, 838 p. [vol. 4 (1960) : 385-544].
- STÖCK M., SICILIA A., BELFIORE N.M., BUCKLEY D., LO BRUTTO S., LO VALVO M. & ARCUELO M., 2008. – Post-Messinian evolutionary relationships across the Sicilian channel: Mitochondrial and nuclear markers link a new green toad from Sicily to African relatives. *BMC Evolutionary Biology*, 8 : 56.
- THOMSEN P.F., ELIAS S., GILBERT M.T.P., HAILE J., MUNCH K., KUZMINA S., FROESE D.G., SHER A., HOLDAWAY R.N. & WILLERSLEV E. 2009. – Non-Destructive Sampling of Ancient Insect DNA. *PLoS ONE*, 4(4), e5048.
- VIDAL J.-P.-A., 1950. – Hémiptères de l'Afrique du Nord et des pays circum-méditerranéens. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles du Maroc*, 1949, 48 : 1-238.
- VILLIERS A., 1945. – *Atlas des Hémiptères de France - 1 - Hétéroptères Gymnocérates*. Paris, N. Boubée & C^{ie}, 83 p., 12 pl. coul.
- WAGNER E., 1956. – Zur Systematik der Gattung *Graphosoma* Lap. (Hem., Het. Pentatomidae). *Entomologische Berichten*, 16 : 110-116.

Manuscrit reçu le 23 octobre 2016,
accepté le 12 novembre 2016.

Annexe A. – Séquences d'ADNmt COI des *Graphosoma* analysés. Le numéro d'accension GenBank® (deux lettres suivies de six chiffres) est indiqué pour chaque séquence. Le nombre de nucléotides séquencés (n) est ensuite noté, suivi des modifications de nucléotides relevées par rapport à la séquence référence 1 et à la numérotation de 1 à 658 de l'Annexe B, après alignement par ClustalW2™.

« *Graphosoma lineatum* »

Allemagne :

1. Bayreuth, 8-VI-2011, KMO22779 [RAUPACH *et al.*, 2014], (n = 658) = référence 1 (séquence présentée en lettres minuscules en Annexe B).
- 2a. Brandebourg (spécimen a), 3-VI-2011, KMO22214 [RAUPACH *et al.*, 2014], (n = 658) : identique à la réf. 1.

Graphosoma lineatum (L., 1758) et *G. italicum* (O.F. Müller, 1766), deux espèces valides et distinctes, probablement issues de la transgression zancléenne méditerranéenne (Hemiptera Pentatomidae)

- 2b. Brandebourg (spécimen b), 3-VI-2011, KMO21891 [RAUPACH *et al.*, 2014], (n = 658) : C34OT, C514A, C613T.
- 3a. Thuringia (spécimen a), I-VIII-2010, KMO21728 [RAUPACH *et al.*, 2014], (n = 658) : T70C, T157C, C613T, C64IT.
- 3b. Thuringia (spécimen b), I-VIII-2010, KMO22702 [RAUPACH *et al.*, 2014], (n = 643) : C514A.
4. Wahnbeck Niedersachsen, 2I-V-2011, KMO2144I [RAUPACH *et al.*, 2014], (n = 658) : identique à la réf. 1.
5. Reismuehle Pollanten, 29-V-2011, KM22404 [RAUPACH *et al.*, 2014], (n = 658) : C613T.

France :

6. Kerdonis, Belle-Île (Morbihan), 12-VII-2015, KX960045 (éthanol) Roland Lupoli leg. (n = 660) : T157C, C505T, C613T, C64IT.
7. Mireval(Hérault), 17-VI-2009, KX960046 (sec), Roland Lupoli leg. (n = 610) : identique à la réf. 1.
8. Aiguines (Var), 14-VI-2010, KX960047 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 574) : identique à la réf. 1.
9. Bonifacio (Corse), 14-VI-2012, KX960048 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 634) : T637C.

Espagne :

10. Boniches (Castille), 18-VI-2015, KX960049 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 344) : T412C, C460T, C539T.
11. Pitres (Andalousie), 6-VIII-2012, KX960050 (sec), Roland Lupoli leg. (n = 658) : T133C.
12. Turre (Andalousie), 16-VI-2015, KX960051 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 630) : identique à la réf. 1.

Maroc :

13. Rabat, 3-VII-2007, KX960052 (sec), Jean-Claude Streito leg. (n = 633) : A46C, C55T, C67T, C94T, T103C, T106C, C118T, C121A, T136C, T154C, T157C, T198C, C214T, A223C, T250C, G253A, C263T, T266C, C274A, C284T, T313A, T337G, T343C, C346T, T352A, T358C, C376A, C400A, C406T, T407C, T418A, T427C, T445C, C460T, T493A, G499A, T508A, C514T, T517A, C526T, G541A, C557T, C568T, T578C, C604A, C613T, A643T (séquence présentée en *Annexe B*).

Algérie :

14. Alger, 19-VI-1979, KX960053 (sec), Jean-Michel Maldès leg. (n = 627) : A46C, C55T, C67T, C94T, T103C, T106C, C118T, C121A, T136C, T154C, T157C, T198C, C214T, A223C, T250C, G253A, C263T, T266C, C274A, C284T, T313A, T337G, T343C, C346T, T352A, T358C, C376A, C400A, C406T, T407C, T418A, T427C, T445C, C460T, T493A, G499A, T508A, C514T, T517A, C526T, G541A, C557T, C568T, T578C, C604A, C613T, A643T.

Sardaigne :

15. Santa Teresa, 15-VI-2012, KX960054 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 577) : C118T, C214T, G305A, A328G, G541A.
16. Oliena, 16-VI-2012, KX960055 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 579) : C118T, C214T, A328G, G541A.
17. Cala Gonone, 16-VI-2012, KX960056 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 579) : A109G, C118T, C214T, A328G, G541A.
18. Budoni Tanauella, 15-VI-2012, KX960057 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 643) : C118T, C214T, C27IT, A328G, G541A.

Italie continentale :

19. Vico (Pouilles), 9-VI-2013, KX960058 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 579) : identique à la réf. 1.
20. Cropolati (Calabre), 11-VI-2013, KX960059 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 634) : T325C, T637C.
21. Gioia Tauro (Calabre), 11-VI-2013, KX960060 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 658) : T157C.
22. Pizzo (Calabre), 11-VI-2013, KX960061 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 654) : T637C.
23. Bagaladi (Calabre), 12-VI-2013, KX960062 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 647) : identique à la réf. 1.
24. Scalea (Calabre), 15-VI-2013, KX960063 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 643) : T637C.

Sicile :

25. Sant Ambrogio, 14-VI-2013, KX960064 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 584) : A46C, C55T, C67T, C94T, T103C, T106C, C118T, C121A, T136C, T154C, T157C, T198C, C214T, A223C, T250C, G253A, C263T, T266C, C274A, C284T, T313A, T337G, T343C, C346T, T352A, T358C, C376A, C400A, C406T, T407C, T418A, T427C, T445C, C460T, T493A, G499A, C505T, T508A, C514T, T517A, C526T, G541A, C557T, C568T, T578C, C604A, C613T, C616T.
26. Gerbini, 13-VI-2013, KX960065 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 640) : A46C, C55T, C67T, C94T, T103C, T106C, C118T, C121A, T136C, T154C, T157C, T198C, C214T, A223C, T250C, G253A, C263T, T266C, C274A, C284T, T313A, T337G, T343C, C346T, T352A, T358C, C376A, C400A, C406T, T407C, T418A, T427C, T445C, C460T, T493A, G499A, C505T, T508A, C514T, T517A, C526T, G541A, C557T, C568T, T578C, C604A, C613T, C616T.
27. Rosolini, 13-VI-2013, KX960066 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 656) : A46C, C55T, C67T, C94T, T103C,

T106C, C118T, C121A, T136C, T154C, T157C, T198C, C214T, A223C, T250C, G253A, C263T, T266C, C274A, C284T, T313A, T337G, T343C, C346T, T352A, T358C, C376A, C400A, C406T, T407C, T418A, T427C, T445C, C460T, T493A, G499A, C505T, T508A, C514T, T517A, C526T, G541A, C557T, C568T, T578C, C604A, C613T, C616T.

28. Porto Palo, 13-VI-2013, KX960067 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 655) : A46C, C55T, C67T, C94T, T103C, T106C, C118T, C121A, T136C, T154C, T157C, T198C, C214T, A223C, T250C, G253A, C263T, T266C, C274A, C284T, T313A, T337G, T343C, C346T, T352A, T358C, C376A, C400A, C406T, T407C, T418A, T427C, T445C, C460T, T493A, G499A, C505T, T508A, C514T, T517A, C526T, C557T, C568T, T578C, C604A, C613T, C616T. (pas de G541A par rapport à 13 et 14).

Grèce :

29. Archea Epidauros, 13-VIII-2009, KX960068 (sec), Roland Lupoli leg. (n = 294) : G499A.
 30. Kissamos (Crète), 19-VIII-2015, KX960069 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 648) : G253A, G499A.
 31. Mochlos (Crète), 12-VIII-2015, KX960070 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 645) : A43G, T157C, C214T, C274A, C346A, A421C, T496C, C613T (pas de G253A, ni G499A par rapport à 29 et 30).
 32. Kato Zakros (Crète), 11-VIII-2015, KX960071 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 646) : A43G, T157C, C214T, C274A, C346A, A421C, T496C, C613T (pas de G253A, ni G499A par rapport à 29 et 30).

Turquie :

33. Göreme (Cappadoce), vallée de Valsidere, 20-VII-2012, KX960072 (sec), Marine Lupoli leg. (n = 657) : identique à la réf. 1.

Liban :

34. Beit-Menzer, VI-2007, KX960073 (sec), Kairouz leg. (n = 288) : identique à la réf. 1.

Arménie :

35. Geghard, 9-V-2014, KX960074 (sec), Sergei Murzin leg. (n = 588) : identique à la réf. 1.

Iran :

36. Alborz, 15-X-2014, KR778998 [KARAMIPOUR *et al.*, 2016] (n = 650) : A34G, T97C, T157C, C214T, C340T, T358C, C367T, T407C, T445C, C460T, A469G, T496C, G499A, C505T, C526T, G541A, T646C.

Graphosoma rubrolineatum

CORÉE DU SUD :

- GRI. Séoul, 23-I-2013, KC510115 [CHO *et al.*, 2013] (n = 658) : C67T, C121T, T133C, T136C, T157C, A160G, C271T, C284T, C340T, C346T, C347T, T407C, A409G, C460T, T463C, G499A, T523C, C526T, G541A, T562C, C613T.
 GR2. Séoul, 17-VI-2009, GQ292254 [JUNG *et al.*, 2011] (n = 600) : C67T, C121T, G125T, T136C, T157C, A160G, T162G, C271T, C284T, C340T, C346T, T407C, C460T, T463C, G499A, T523C, C526T, G541A, T562C, A580T, C613T, C616T (pas de T133C, ni de C347T, ni de A409V par rapport à Séoul du 23-I-2013).

Graphosoma semipunctatum

France :

- GSI. Ramatuelle (Var) 13-VI-2010, KX960075 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 578) : C55A, C67T, C94T, T106C, C118T, C121A, A127T, T133A, T136C, A145T, T154C, T157C, A163T, C193T, T197C, A223T, C235T, T250C, G253A, C263T, C271T, C274A, T287C, A307T, A319C, A328T, T343A, C346T, C347T, T352A, C367T, C376A, C394T, C400A, C406T, T412A, T415A, C428T, A436T, T472A, T478A, T493A, G499T, C500T, C505T, C514T, A520G, T533C, T548C, C557T, T562C, T565A, C568T, C598T, C604A, C613T (séquence présentée en *Annexe B*).

Sicile :

- GS2. Castelbuono, 14-VI-2013, KX960076 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 579) : identique à GSI.

ESPAGNE :

- GS3. San Jose (Andalousie), 1-VI-2005, KX960077 (sec), Roland Lupoli leg. (n = 579) : identique à GSI, mais avec en plus A127C, T442C, C460T, T496C, et en moins T287C, A328T, C428T.

Grèce :

- GS4. Aghios Nikolaos, Lato (Crète), 25-VIII-2015, KX960078 (éthanol), Roland Lupoli leg. (n = 645) : identique à GSI.

Graphosoma lineatum (L., 1758) et *G. italicum* (O.F. Müller, 1766), deux espèces valides et distinctes, probablement issues de la transgression zanzibienne méditerranéenne (Hemiptera Pentatomidae)

Annexe B. - Alignements des séquences du gène COI de l'ADN mitochondrial, à l'aide du logiciel ClustalW2[™], de « *Graphosoma lineatum* » provenant d'Allemagne (Bayreuth) = référence 1 et provenant du Maroc (Rabat) échantillon n° 13, ainsi que *Graphosoma semipunctatum* prélevé en France (Ramatuelle). La séquence de référence 1 inscrite en lettres minuscules est utilisée pour définir la numérotation des bases nucléiques de 1 à 658. L'alignement des trois séquences est montré par blocs de 60 bases nucléiques. Les étoiles désignent les bases consensuelles identiques dans les trois séquences. Les 47 bases différentes entre l'échantillon 13 et la référence 1 sont surlignées en grisé. Les tirets représentent les bases qui n'ont pas été identifiées par séquençage. A = Adénine, T = Thymine, G = Guanine, C = Cytosine.

	1	60
Graphosoma « lineatum » 13	-----ATCCGCTATAAGTTTAAT	
Graphosoma « lineatum » 1	aaacattatattttctatttggaatatgagcaggaatagtaggatcagctataagcttaat	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	-----ATAGTAGGATCAGCTATAAGATTAAAT	*** ***** *
	61	120
Graphosoma « lineatum » 13	TATTCGTTATTGAATTAGGACAACCAGGAAGATTATTGGAGACGACCAAATTTATAATGT	
Graphosoma « lineatum » 1	tattcgcattggaattaggacaaccaggaagattcattggagatgacaaattataacgt	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	TATTCGTTATTGAATTAGGACAACCAGGAAGATTATTGGAGATGACCAAATTTATAATGT	***** ***** *
	121	180
Graphosoma « lineatum » 13	AATAGTAACAGCTCAGCATTTCGTAATAATTTCTTCATAGTAATACCAATTATAATTGG	
Graphosoma « lineatum » 1	catagtaacagctcatgcatcgttaataatttttttatagtaataccaattataattgg	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	AATAGTTACAGCACACGCATTTCGTTATAATTTCTTCATAGTTATACCAATTATAATTGG	***** ***** *
	181	240
Graphosoma « lineatum » 13	AGGATTGGAAACTGACTAGTACCCTTAATAATTTGGAGCCCCGATATAGCATTCCCACG	
Graphosoma « lineatum » 1	aggatttggaaactgattagtagtacccttaataatcgagagcccgatagcattcccacg	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	AGGATTGGAAATTTGACTAGTACCCTTAATAATTCGAGAGCCCCGATATAGCATTTCACG	***** ***** *
	241	300
Graphosoma « lineatum » 13	AATAAATAACATAGATTTTGATTACACCCCATCATTAACATTATTAATAGTAAGAAG	
Graphosoma « lineatum » 1	aataaataatagagattttgactattacccccctcattaacactattaatagtaagaag	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	AATAAATAACATAAGATTTTGATTATTACCTCCATCATTAACACTAATAGTAAGAAG	***** ** ***** *
	301	360
Graphosoma « lineatum » 13	ATTAGCAGAAGCAGGAGCAGGAAGCTGGATGAACAGTGTACCCCTCTATCAAGAAACAT	
Graphosoma « lineatum » 1	attagcagaagctggagcaggaactggatgaacagtttaccctcccctatctagaatat	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	ATTAGCTGAAGCTGGAGCCGGAAGCTGGTGAACAGTTTACCACCTTTATCAAGAAATAT	***** ***** *
	361	420
Graphosoma « lineatum » 13	TTACACAGAGGAGCATCAGTAGATTAGCAATCTTTTCACTTCATCTAGCTGGTGTATC	
Graphosoma « lineatum » 1	ttcacacagaggagcctcagtagattagcaatcttttccctcacttagctggtgttct	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	TTACATAGAGGAGCATCAGTAGATTAGCAATTTTTCACCTCATTAGCAGGAGTTTC	***** ***** *
	421	480
Graphosoma « lineatum » 13	ATCAATCTAGGAGCAGTAAATTTCAATTTCAACAATTATTAATATACGACCTGCAGGTAT	
Graphosoma « lineatum » 1	atcaattctaggagcagtaaaattttatttcaacaattatcaatatagcagctgcaggtat	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	ATCAATTTTAGGAGCTGTAATTTTATTTCACAATTATCAATATACGACCAGCAGGAAT	***** ***** *
	481	540
Graphosoma « lineatum » 13	AACCTCTGAACGAAATCCACTATTTCGTATGATCTGTAGGAATTACTGCATTATTATTACT	
Graphosoma « lineatum » 1	aactcctgaacgtattccgctattcgtttgatccgttggaaattaccgcattattattact	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	AACCTCTGAACGAATTCCTTTATTGTTTGATCTGTGGGATTACCGATTACTATTACT	***** ***** *
	541	600
Graphosoma « lineatum » 13	ATTATCATTACCAGTATTAGCTGGTGCTATTACTATACATTAAACAGATCGAAACTTCAA	
Graphosoma « lineatum » 1	gttatcattaccagtagctggtgcccattactatattattaacagatcgaaacttcaa	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	GTTATCACTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAACTTTAA	***** ***** *
	601	658
Graphosoma « lineatum » 13	TACATCATTCTTTGACCCATCAGGAGGAGGAGACCTTATCTTTATCAACATCTTTTC	
Graphosoma « lineatum » 1	tacctattcttcgaccatcaggaggagagacctattctatatcaacatcttttc	
Graphosoma semipunctatum (Ramatuelle)	TACATCATTCTTT-----	*** *****