

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

**PAR  
MYLÈNE ST-ONGE**

**ÉTUDE ÉCOLOGIQUE ET MOLÉCULAIRE DES MERMITHIDES  
PARASITES DE MOUCHES NOIRES (DIPTERA : SIMULIIDAE) DU QUÉBEC**

**SEPTEMBRE 2007**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## AVANT PROPOS

### CONFORMITÉ DU MANUSCRIT

Conformément aux articles D45-46-47 du règlement des études de cycles supérieurs de l'université du Québec à Trois-Rivières, il est possible de présenter les résultats obtenus dans le cadre du programme de 2<sup>e</sup> cycle en sciences de l'environnement sous forme d'articles scientifiques.

Le chapitre 1 du présent document expose un résumé substantiel incluant une introduction détaillée du sujet dans laquelle est présentée la problématique ainsi que les objectifs et la méthodologie du travail de même que les résultats obtenus, les conclusions et une liste de références.

Le chapitre 2 présente le premier article scientifique traitant de la partie écologique du travail et a pour titre « Mermithids (Nematoda : Mermithidae) parasitizing different blackfly (Diptera : Simuliidae) populations in Quebec and environmental parameters related to their presence or absence in the studied brooks ». Les auteurs sont Mylène St-Onge et Guy Charpentier. Le document a été soumis au *The Canadian Entomologist* pour fin de publication. Les instructions relatives à la publication d'articles dans ce journal sont présentées en annexe.

Le chapitre 3 présente le deuxième article scientifique traitant cette fois de la partie moléculaire de l'étude réalisée et a pour titre « A Molecular Revision of the Taxonomic Status of Northeast America Mermithids Parasitizing Blackflies ». Les auteurs sont Mylène St-Onge, Bernard LaRue et Guy Charpentier. Le document sera soumis au *Journal of Invertebrate Pathology* pour fin de publication. Les instructions relatives à la publication d'articles dans ce journal sont présentées en annexe.

Pour faciliter la lecture, les lignes des deux articles ne sont pas numérotées et les figures sont regroupées avec leurs légendes contrairement aux recommandations aux auteurs.

## REMERCIEMENTS

L'aboutissement d'un tel travail n'aurait pu avoir lieu sans la participation de certaines personnes et organismes que je tiens à mentionner.

Je tiens à remercier dans un premier temps mon directeur de recherche, le docteur Guy Charpentier qui a su me guider dans la réalisation de mes travaux. Je remercie également mon co-directeur le docteur Bernard LaRue pour son aide et son enseignement dans le domaine moléculaire dans lequel je n'avais aucun acquis.

Des remerciements sont également adressés à Madame Hélène Colas-Charpentier pour la traduction de mon premier article ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire comprenant Christine Gaudreau, Lise Meilleur et Carole Charbonneau.

Pour l'aide financière apportée, je tiens à remercier la Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

Finalement pour le soutien moral et les encouragements qu'ils m'ont manifestés tout au long de mes études universitaires, je remercie les membres de ma famille.

## TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS .....	II
CONFORMITÉ DU MANUSCRIT .....	II
REMERCEMENTS .....	III
TABLE DES MATIÈRES .....	IV
LISTE DES TABLEAUX .....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	IX
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION .....	2
<i>Problématique</i> .....	2
<i>Hypothèses et objectifs</i> .....	8
MÉTHODOLOGIE.....	10
<i>Collecte et préparation des mermithides</i> .....	10
<i>Identification</i> .....	10
<i>Facteurs environnementaux influençant la distribution des mermithides</i> .....	12
RÉSULTATS .....	13
<i>Écologie</i> .....	13
<i>Moléculaire</i> .....	15
CONCLUSION .....	20
BIBLIOGRAPHIE .....	22
CHAPITRE 2.....	25
TITLE.....	26
SUMMARY.....	27
RÉSUMÉ.....	27
INTRODUCTION .....	28
MATERIAL AND METHODS.....	30

<i>Study area</i>	30
<i>Mermithid and blackfly conservation and identification</i>	30
<i>Environmental data measurement</i>	31
<i>Statistical analysis</i>	31
<b>RESULTS</b> .....	<b>32</b>
<i>Season-related mermithid occurrence</i>	32
<i>Environmental parameters</i>	32
<i>Mermithid to blackfly assignation</i>	33
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>34</b>
<b>ACKNOWLEDGMENT:</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>37</b>
<b>TABLES</b> .....	<b>41</b>
<b>FIGURE</b> .....	<b>47</b>
<b>CHAPITRE 3</b> .....	<b>48</b>
<b>TITLE</b> .....	<b>49</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>50</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>51</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>52</b>
<b>METHODS</b> .....	<b>54</b>
<i>Sample collection</i>	54
<i>DNA purification</i>	54
<i>PCR assays, characterization of amplification products and DNA sequencing</i>	54
<i>Sequence alignment and phylogenetic trees</i>	55
<b>RESULTS</b> .....	<b>56</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>61</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	<b>63</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>64</b>
<b>TABLES</b> .....	<b>68</b>
<b>FIGURES</b> .....	<b>70</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>76</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## Chapitre 1

<b>Tableau 1</b> : Variation saisonnière de la présence des mermithides. ....	13
<b>Tableau 2</b> : Présence (+) ou absence (-) de chacune des espèces de mermithides parmi les mouches noires recueillies. ....	14
<b>Tableau 3</b> : Détermination des cas de superparasitisme chez les mouches noires; identification et nombre de mermithides trouvés. ....	15

## Chapitre 2

<b>Table 1</b> : Geographical location of investigated areas. ....	42
<b>Table 2</b> : Seasonal variations in mermithid presence. ....	43
<b>Table 3</b> : Environmental parameter values measured in the 21 sites, including mermithid presence (+) or absence (-). ....	44
<b>Table 4</b> : Presence (+) or absence (-) of each mermithid species in the collected blackfly species. ....	46
<b>Table 5</b> : Determination of superparasitized blackfly species; number and identification of mermithids found. ....	47

## Chapitre 3

<b>Table 1</b> : Sequences, targets and annealing temperatures of PCR primers. ....	69
<b>Table 2</b> : Difference matrix of <i>M. fluminalis</i> sequences.....	70

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 1

- Figure 1 :** Cycle de vie des mermithides. ....4
- Figure 2 :** Structure générale de l'unité nucléaire de transcription des gènes d'ARN ribosomal chez les eucaryotes. ....11
- Figure 3 :** (1) Schéma illustrant le principe du PCR discriminant, avec une amorce commune et 4 amorces spécifiques, A, B, C et D. (2) Gel fictif démontrant le résultat d'un tel PCR. ....12
- Figure 4 :** Identification par PCR de *I. wisconsinensis* (Iw) et de *M. fluminalis* (Mf) à l'aide des amorces 18S et COI. ....16
- Figure 5 :** Combinaison synthétique de l'ADN des quatre espèces de mermithides amplifié avec l'amorce 18S. ....17
- Figure 6 :** Arbre phylogénétique basé sur le 18S de quelques mermithides dont 6 espèces de mermithides parasites de mouches noires, avec *Trichinella spiralis* comme standard externe. ....19

### Chapitre 2

- Figure 1:** Mermithid presence (P) or absence (A) according to depth distribution of sampled sites. ....48

### Chapitre 3

- Figure 1:** Reading frame of partial COI gene sequences from reference specimens. Iw, *I. wisconsinensis*; Gv, *G. viridis*; Mc, *M. camdenensis*. MfW, MfS and MfN are the winter, summer and new molecular species of '*M. fluminalis*'. ....71
- Figure 2:** Alignment of partial 18S sequences from reference specimens. Species identified as for Figure 1. ....72



- Figure 3:** (A) Size characterization of the products from discriminatory PCR assays of COI and 18S. (B) Cross-reaction of Iw DNA with the Mf primer when the 3 other specific primers are omitted (Mf as positive control). .....74
- Figure 4:** Simultaneous identification of species in a COI PCR assay. The 7 leftward wells: co-amplified synthetic DNA mixtures from previously identified individuals. 'Real' refers to a true case of multiple parasitism, with Iw and Mf being harbored by a blackfly larva from the *S. venustum/verecundum* complex. ....75
- Figure 5:** Phylogenetic tree of mermithids, with host category indicated at right. ....76

## **SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS**

ADNr: ADN ribosomal

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

TBE : tampon d'électrophorèse Tris-borate-EDTA

TE : tampon Tris-EDTA

**CHAPITRE 1**  
**RÉSUMÉ FRANÇAIS**

## INTRODUCTION

### Problématique

Il existe environ 1550 espèces de mouches noires dont la répartition est presque mondiale. Il s'agit de diptères de la famille des Simuliidae dont les stades immatures sont aquatiques. Les œufs, les larves et les nymphes se trouvent dans les cours d'eau tandis que les adultes sont terrestres. Les morsures des femelles de plusieurs espèces en font des vecteurs de maladies autant chez les humains que chez les animaux. Parmi ces maladies, l'onchocercose, une maladie causée par un parasite entraînant la cécité, en est un exemple chez l'humain. Des réactions allergiques et la fièvre de la mouche noire sont aussi des problèmes entraînés par leurs morsures. Chez les animaux, les mouches noires transmettent la leucocytozoonose, une maladie mortelle pour les dindes, les canards et les poulets. Les mouches noires adultes entraînent aussi des pertes économiques en milieu agricole et touristique.

Toutefois, les mouches noires n'ont pas qu'un rôle nuisible. Les adultes sont aussi des pollinisateurs alors que les larves sont une composante majeure de la faune macro-invertébrée des ruisseaux et rivières et contribuent au recyclage de la matière organique. En effet, elles capturent avec leurs plumeaux céphaliques de 32 à 55 % du seston et en digèrent 17 à 25 % (Morin *et al.*, 1988).

Le contrôle des populations de mouches noires s'effectue durant leurs stades larvaires, car elles sont alors regroupées dans les cours d'eau et donc plus facilement accessibles. Toutefois, en utilisant un produit biologique pour les contrôler, cela entraîne leur mort au stade où elles jouent un rôle important et positif. Les ennemis naturels des mouches noires les tuent pour la plupart aussi au stade larvaire mais à la fin de leur développement, laissant les mouches jouer leur rôle de filtreurs.

On retrouve chez les mouches noires une vaste gamme de pathogènes tel que des virus, des protozoaires de type microsporidies, des champignons et des mermithides.

Ces derniers sont responsables pour quelques uns des plus haut taux d'infection de tous les parasites de mouches noires. Ce sont des nématodes parasites d'invertébrés qui, malgré le fait qu'ils soient les plus importants parasites de mouches noires, sont assez peu étudiés. On les retrouve autant en milieu terrestre qu'en milieu aquatique. La plupart de leurs hôtes sont des insectes, mais les araignées, les crustacés, les mollusques, les vers de terre et les sangsues peuvent aussi être parasités par des mermithides. Dans la plupart des cas, l'hôte meurt peu de temps après que le mermithide ait complété son développement (Poinar, 1979).

Le cycle de vie des mermithides peut devenir très complexe lorsqu'il implique plus d'un hôte, mais pour la plupart, un seul insecte ou invertébré est impliqué dans celui-ci (Poinar, 1979). Le stade parasitaire du mermithide est nécessaire à l'accumulation de réserves pour la phase libre qui ne s'alimente pas. Les nutriments sont absorbés à travers la cuticule du ver en provenance du sang de l'hémocèle de l'hôte où le mermithide s'est logé, puis accumulés dans un organe spécial d'entreposage, le trophosome (Crosskey, 1990).

Un stade juvénile infectant émerge d'un œuf et cherche activement un hôte potentiel. Une fois le contact effectué, le nématode pénètre dans l'insecte avec l'aide d'un stylet et de sécrétion enzymatique (Poinar, 1979). Voir figure 1.

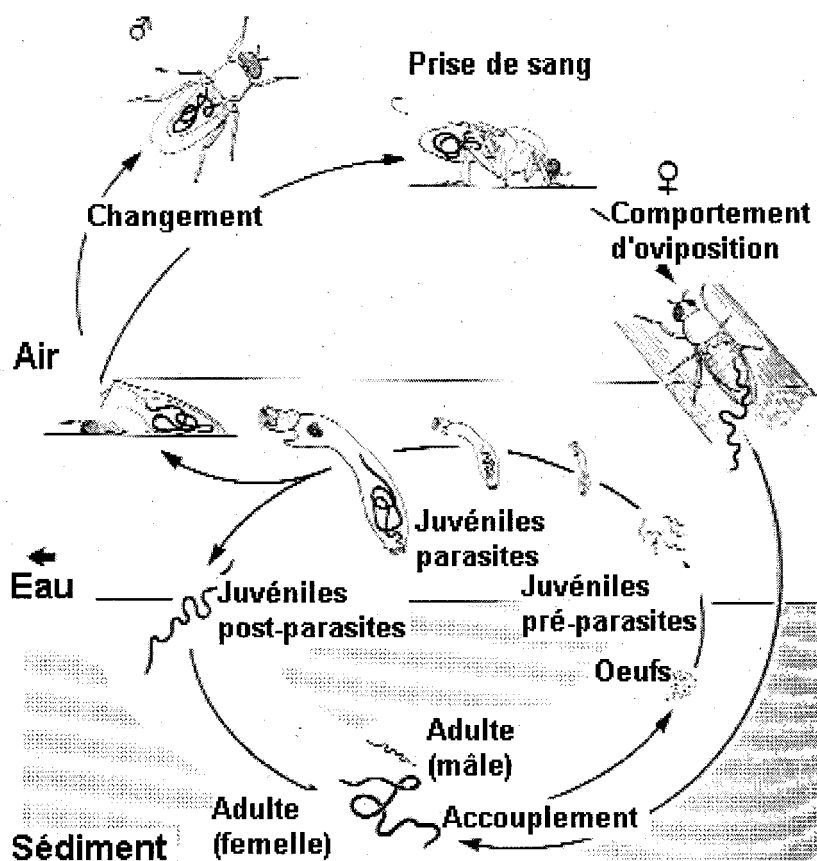


Figure 1 : Cycle de vie des mermithides. Tiré de Crosskey, 1990

Une fois dans son hôte, le nématode initie son développement. Après avoir complété sa période de croissance comme parasite juvénile, le mermithide quitte son hôte. Une fois dans l'environnement, le juvénile post-parasite mue en stade adulte, s'accouple, sauf s'il est hermaphrodite ou parthénogénétique et les femelles pondent leurs œufs (Poinar, 1979). Dans les habitats plus nordiques, les mermithides passent de six à onze mois en phase libre, c'est-à-dire non associés à un hôte (Colbo, 1990).

On retrouve approximativement 35 à 40 espèces de mermithides (Molloy, 1981) reconnues pour parasiter au moins 64 espèces de mouches noires dans le monde (Poinar, 1979). Ces mermithides ne sont pas connus pour parasiter d'autre forme de faune dans les rivières (Molloy, 1981). Toutefois, Curran (1982) a réussi à infecter en laboratoire des larves de moustique avec un mermithide de mouche noire.

Dans les régions néarctiques, il n'y a que quatre espèces reconnues de mermithides parasites de mouches noires, c'est-à-dire *Mesomermis fluminalis*, *Mesomermis camdenensis*, *Isomermis wisconsinensis* et *Gastromermis viridis*. Bien que Mokry et Finney (1977) aient identifié certains de leurs parasites de mouches noires comme étant des *Hydromermis sp.*, reconnus pour parasiter des chironomides, leur identification se basait sur des individus juvéniles et à partir des critères de l'article de Nickle, 1972, qui contient la description de différentes familles et espèces mais sans figures et sans clé réelle. De plus, aucune autre mention d'*Hydromermis sp.* parasitant des mouches noires dans les régions néarctiques n'a été faite depuis.

Le parasitisme des mermithides cause chez les larves de mouches noires de sérieux troubles morphologiques et physiologiques. Ces troubles peuvent se voir par la distorsion de leur abdomen et la décoloration de leur tégument. Puisque les mermithides se logent dans l'hémocèle des larves, ils sont directement exposés à la circulation des hormones et peuvent de ce fait, affecter la balance hormonale de l'insecte normalement contrôlée par son système endocrine (Gordon *et al.*, 1978). Il a été supposé toutefois que l'incapacité de certaines larves de passer au stade de nymphe soit associée à une déficience en nutriments plutôt qu'à une manipulation hormonale de la mouche noire par le parasite. En effet, la composition de l'hémolymphe des larves de mouches noires parasitées diffère de celle des larves non parasitées. Le mermithide entraîne une diminution des protéines et du taux de glucose autant chez *Prosimulium mixtum/fuscum* que chez *Simulium venustum*. De son côté, le niveau de composés aminés de *Prosimulium mixtum/fuscum* est réduit mais, chez *Simulium venustum*, il peut être réduit, augmenté ou inchangé par la présence d'un parasite (Gordon *et al.*, 1978). Les mouches parasitées qui complètent leur développement jusqu'au stade adulte sont généralement stériles dû à un développement incomplet de leurs gonades (Molloy, 1981).

Les mermithides participent par leur présence dans un cours d'eau à la régulation naturelle des mouches noires. Différentes avenues de contrôle par les mermithides ont été tentées entre autre avec *Mesomermis fluminalis* où environ 1,5 million de vers pré-parasites ont été relâchés dans une petite rivière, à la suite de quoi on a retrouvé des taux

d'infection de 71,4% d'un jeune stade de *Simulium venustum* collecté en proche aval du point de traitement (Molloy et Jamnback, 1977). Toutefois, le coût de production qui était de 300\$ par million de pré-parasites a prohibé l'utilisation de *M. fluminalis* comme agent de biocontrôle. Le coût élevé de cette production était associé à celui de la main d'œuvre et donc ne pourra être réduit avec le temps.

Pour ce qui est des autres espèces de mermithides parasites de mouches noires que l'on peut retrouver dans les régions néarctiques c'est-à-dire *Gastromermis viridis* et *Isomermis wisconsinensis*, leur faible éventail d'hôtes restreint leur utilité en tant qu'agent de biocontrôle (Poinar, 1981).

D'autres mermithides tel que *Romanomermis culicivorax*, un parasite de moustique, ne posent pas problème au niveau de la production de masse puisque l'on pouvait obtenir par la procédure établie par Petersen et Willis (1972) une production de nématode de stade infectant au coût d'environ 7 à 10 cents par million d'individus, d'où l'intérêt des tentatives d'infection des mouches noires par *R. culicivorax*. Pour la mouche noire *Simulium damnosum*, vecteur de l'onchocercose l'expérience a été tentée avec succès, *R. culicivorax* se trouvant dans 45 larves sur 103 et s'avérant létal pour la larve parasitée (Hansen et Hansen, 1976). Les tests en nature se sont toutefois avérés moins encourageants puisque *R. culicivorax* est un nageur de surface, ce qui réduit ses chances d'entrer en contact avec une larve de mouche noire. Cela ne peut donc se produire qu'à de grandes concentrations de pré-parasites dans de très petites quantités d'eau. Un contrôle des mouches noires par *R. culicivorax* ne semble être une possibilité ni réaliste, ni économique (Finney et Mokry, 1980).

Malgré son manque de succès pour le contrôle biologique des mouches noires, *R. culicivorax* s'avère tout à fait efficace au niveau de son hôte naturel, le moustique. Après le traitement des habitats des larves de moustiques autour de El Valle en Colombie avec des œufs et des adultes de *R. culicivorax*, un déclin dans la population de larves du vecteur de la malaria *Anopheles albimanus* a été enregistré, contrairement à aucun changement dans les étangs près de Nuqui, une localité témoin non traitée (Rojas



*et al.*, 1987). Par contre, la population de *R. culicivorax* a cessé de se reproduire au bout d'environ deux ans. Sans expliquer les raisons de l'arrêt de la reproduction de la population de *R. culicivorax*, les conditions environnementales des habitats de moustique ont un impact sur la survie et le pouvoir d'infection de *R. culicivorax* (Finney, 1981).

Tout comme *R. culicivorax*, les mermithides parasites de mouches noires ne se retrouvent pas nécessairement dans chacun des habitats de celles-ci. Certains facteurs environnementaux jouent sur l'implantation du parasite dans la population de mouches noires. De ces facteurs environnementaux, certains favorisent directement la population de mermithides tandis que d'autres tels que la nourriture influencent la susceptibilité des mouches noires à se faire parasiter (McCreadie et Adler, 1999). En plus des conditions du milieu, la distribution des nématodes est corrélée avec la saison et l'abondance des hôtes (McCreadie et Adler, 1999).

Les cours d'eau où il y a présence d'une infection du complexe *Simulium tuberosum* par les mermithides sont des sites plus larges, plus acides, dont le niveau d'oxygène dissous dans l'eau est plus élevé, dont la conductivité est plus basse et où le couvert de la canopée est moindre (McCreadie et Adler, 1999). Ces caractéristiques associées à la présence d'une population infectante de mermithides au sein d'une population de mouches noires peuvent certainement varier lors de l'échantillonnage de sites où d'autres espèces que *S. tuberosum* seraient présentes.

Présentement, la taxinomie des mermithides n'est pas élaborée et est principalement basée sur la forme des organes génitaux au stade adulte et sur celle du stylet au niveau du stade juvénile parasitaire. Tout spécimen abîmé lors de la récolte ou de l'identification elle-même peut aussi entraîner un nombre important d'individus non classifiés. Nous suspectons également des complexes d'espèces relativement au nombre élevé de variétés de mouches noires parasitées par une seule espèce actuellement reconnue de mermithide. Ainsi, la présence de deux états physiologiques chez *M. fluminalis* rapportés par Bailey *et al.* (1977) entre les individus d'été parasitant le genre

*Simulium* et ceux d'hiver parasitant le genre *Prosimulium* soulève la question de savoir s'il s'agit d'une espèce unique ou de deux espèces. En effet, il apparaît que les parasites de *Simulium* se développent environ deux fois plus vite à 10 °C que ceux de *Prosimulium*. Les parasites de *Simulium* sont mieux adaptés à des températures élevées (20 °C), mais moins à des températures plus basse (5 °C) que les parasites de *Prosimulium*.

Une méthode d'identification par typage moléculaire serait donc un atout pour la taxinomie des mermithides puisqu'il serait possible d'identifier tous les stades du parasite ainsi que tous les individus abîmés, puisque seulement une fraction du mermithide est nécessaire pour cette technique. Il nous sera donc aussi possible de clarifier si la différence physiologique chez *M. fluminalis* se retrouve aussi au niveau moléculaire. Si une telle différence était très nettement supérieure chez les individus de saisons différentes, comparativement à ceux d'une même saison, cela indiquerait que nous sommes en présence de deux espèces distinctes et non pas d'une seule espèce avec deux variantes physiologiques.

### **Hypothèses et objectifs**

Notre étude se divisant en deux parties, soient une écologique et l'autre moléculaire, nous avons formulé des hypothèses pour chacune d'elles. Premièrement, nous estimons que plus nous aurons un grand nombre d'espèces de mouches noires, plus nous retrouverons d'espèces parasitées. Aussi, une plus grande variété de sites d'échantillonnages nous permettra de retrouver plus d'espèces de mermithides. Les variables environnementales pouvant a priori jouer un rôle sur la présence de mermithides devraient être le pH, la conductivité, la quantité de matière en suspension, la vitesse du courant ainsi que la largeur et la profondeur des cours d'eau.

En fonction des hypothèses émises, nous avons comme objectifs de connaître les espèces de mouches noires qui sont infectées, d'y associer les mermithides infectants et de connaître les conditions des milieux où l'on retrouve des mermithides.

Le premier objectif consiste à identifier toutes les espèces de mouches noires pour chacun des sites échantillonnés et de déterminer si elles sont parasitées. Dans les cas de parasitisme, les mermithides sont aussi identifiés. Cette approche nous permet par conséquent de connaître les espèces de mouches noires pour lesquelles les mermithides exercent un contrôle biologique. Nous serons aussi en mesure de répertorier les cas de superparasitisme ou de multiparasitisme au sein des diverses populations de mouches noires. Le second objectif consiste à enregistrer toutes les variables environnementales susceptibles d'être discriminantes dans la distribution des mermithides soit en favorisant leur présence ou en influençant la susceptibilité d'infection des mouches noires. Cette partie de la recherche se retrouve dans le chapitre suivant en tant que premier article.

Nous croyons que des outils moléculaires nous permettraient l'identification de toutes les espèces de mermithides retrouvés et ce quel qu'en soit le stade ou l'état permettant ainsi d'établir la succession saisonnière de ces dernières. De plus il nous serait possible de détecter et de différencier la présence de complexes d'espèces qui jusqu'à présent n'ont pas été reconnus apportant plus de précision à la question de spécificité entre mermithides et mouches noires. En fonction de ces hypothèses, l'objectif de cette partie est l'établissement d'une clé d'identification moléculaire des mermithides.

Cet objectif repose sur la conception d'un outil d'identification simple et rapide à partir d'amplicons capable de discriminer les quatre espèces de mermithides que l'on retrouve au Québec et fait l'objet du deuxième article présenté au troisième chapitre de ce présent mémoire.

## MÉTHODOLOGIE

### Collecte et préparation des mermithides

L'obtention des mermithides s'est effectuée par la récolte de larves de mouches noires en 2003 ainsi qu'en 2005 et 2006. Les endroits visités se situent en Mauricie, en Estrie, en Gaspésie, au Centre du Québec, au Bas-St-Laurent et dans Charlevoix.

Les larves de mouches noires des sites de la Mauricie ont été ramenées vivantes au laboratoire et une partie a été placée dans des aquariums où les mermithides ont été récoltés tandis qu'une autre partie a été disséquée pour y vérifier la présence ou l'absence de mermithides. Les larves des autres régions ont été placées dans l'alcool éthylique à 95% directement sur place et rapportées au laboratoire pour une dissection ultérieure.

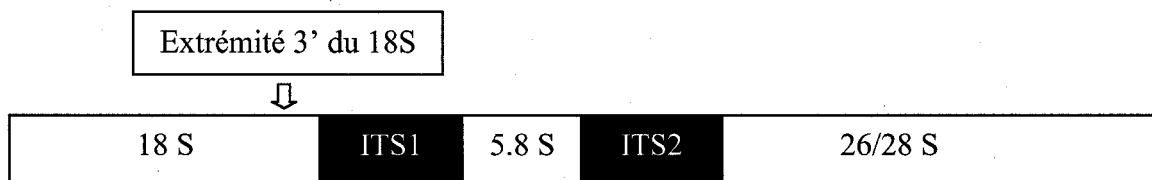
Les larves de mouches noires, tout comme les mermithides, ont été conservées dans l'alcool éthylique à 95 % et à une température de 4°C afin d'en conserver l'ADN pour une identification moléculaire future.

### Identification

Les larves de mouches noires ont été identifiées morphologiquement sous binoculaire à l'aide des clés de Wood *et al.*, (1963) et de Adler *et al.* (2004). Les mermithides ont pour leur part été identifiés sous microscope à 100 et 400 X à l'aide des descriptions des espèces dans Poinar (1979) et de la morphologie des nématodes décrite et dessinée dans Phelps et DeFoliart (1964), dans Molloy (1979) et dans Welch (1962).

Pour l'identification moléculaire, l'ADN des mermithides a tout d'abord été extrait par broyage du mermithide et nettoyé sur résine Wizard (Promega). Pour faciliter l'amplification de l'ADN et la détection du produit résultant, nous avons sélectionné 2 types de cibles présentes en multiples copies par cellule, ce qui devrait améliorer

substantiellement leur détection. La première cible PCR visée étant un segment du gène mitochondrial de la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI), nous avons débuté avec des amorces conçues pour cestodes par Hu *et al.* (2005), mais peu efficaces chez les mermithides, et obtenu cependant assez d'information de séquence pour créer de nouvelles amorces internes s'hybridant parfaitement sur ADN de mermithides. La seconde cible consistait en la région 3' terminale du gène nucléaire de l'ARN ribosomal 18S (18S) (Fig.2), à l'intérieur de laquelle il existe 2 assez longs segments dont la séquence est presque intégralement conservée entre *C. elegans* et la drosophile, donc logiquement aussi présents chez les mermithides. Ces 2 cibles diffèrent assez fortement en ce qui concerne leur conservatisme évolutif global : le 18S, très peu variable, sert surtout à établir les relations phylogéniques profondes tandis que le gène COI, rapidement et extensivement modifié par les mutations silencieuses de 3<sup>e</sup> position de codon, s'avère surtout utile pour les phylogénies d'espèces fortement apparentées et même dans le cadre de la génétique des populations. Les premiers produits d'amplification ont été séquencés, ce qui nous a servi pour l'élaboration d'amorces capables de discriminer entre les quatre espèces de mermithides. Aussi bien pour COI que pour 18S, nous avons conçu à partir des séquences alignées et pour chacune des quatre espèces une amorce spécifique dont la base de l'extrémité 3' lui est unique. Chaque groupe de quatre amorces spécifiques sera utilisé lors d'une seule et même réaction d'amplification conjointement avec une amorce commune ancrée sur l'autre extrémité de la région ciblée soit en 5' pour COI et l'inverse pour le 18S soit 3', tout en veillant à suffisamment distancer les unes des autres les quatre amorces spécifiques pour que les produits d'amplification aient des tailles pouvant être distinguées sur gel de polyacrylamide (Fig.3).

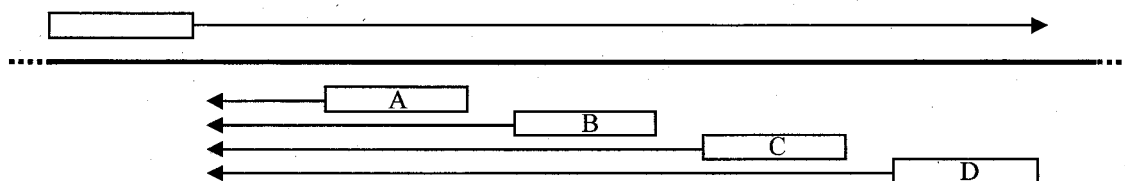


**Figure 2 :** Structure générale de l'unité nucléaire de transcription des gènes d'ARN ribosomal chez les eucaryotes. Le produit primaire de transcription subit ensuite une maturation au cours de laquelle les espaceurs intergéniques ITS1 et ITS2 sont éliminés.

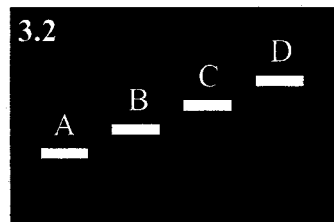
\* Le schéma n'est pas à l'échelle.

## 3.1

Amorce commune



**Figure 3 :** (1) Schéma illustrant le principe du PCR discriminant, avec une amorce commune et 4 amorces spécifiques, A, B, C et D. (2) Gel de polyacrylamide fictif démontrant le résultat d'un tel PCR.



### Facteurs environnementaux influençant la distribution des mermithides

Pour l'obtention des données de caractérisation des milieux en terme de présence et d'absence de mermithides, nous avons mesuré tout d'abord la vitesse du courant, la conductivité, le pH, la largeur ainsi que la profondeur des cours d'eau où il y avait présence de mouches noires. Nous avons finalement pris des échantillons d'eau dans le but d'en mesurer la quantité de matière en suspension en filtrant un litre sur filtre de 0,45 µm préalablement pesé et en faisant la différence de poids de ces mêmes filtres après séchage. L'identification à l'espèce des larves de mouches noires de chaque site a été effectuée. Par la connaissance des larves parasitées, il nous a été possible d'en prendre note dans l'analyse des conditions environnementales de distribution des mermithides.

Enfin, nous avons compilé toutes ces données et procédé à une régression logistique pas à pas « forward » afin de déterminer les variables ayant un effet significatif sur la prédiction de la présence ou de l'absence de mermithides.

## RÉSULTATS

Étant donné que les résultats obtenus au cours de cette recherche font l'objet de deux articles, présentés respectivement aux chapitres 2 et 3 du présent mémoire, je ne citerai, dans cette section, que les grandes lignes des résultats obtenus tant pour la partie écologique que pour la partie moléculaire de l'étude. Également, je ferai mention des résultats complémentaires n'ayant pas été rapportés dans les articles.

### Écologie

Notre étude nous a permis de constater la présence au Québec des quatre espèces de mermithides néarctiques reconnues pour parasiter les mouches noires, soient *Mesomermis fluminalis*, *Mesomermis camdenensis*, *Isomermis wisconsinensis* et *Gastromermis viridis*. *G. viridis* et *I. wisconsinensis* sont des espèces de printemps et d'été dans leur stade parasitaire tandis que l'on retrouve les *Mesomermis sp.* à la fois en été et en hiver (Tableau 1). Malgré qu'*Hydromermis sp.* continue d'apparaître dans la littérature comme un parasite de mouches noires, on se réfère toujours pour cela à Mokry et Finney (1977). Parce qu'aucune autre découverte de ce type de parasitisme n'ait été publiée depuis, cela laisse croire à une mauvaise identification du parasite d'autant plus qu'il se serait agi de juvéniles.

**Tableau 1:** Variation saisonnière de la présence des mermithides

Mermithides	Occurrence (%)		Phase	
	Été	Hiver	Été	Hiver
<i>Mesomermis sp.</i>	31	97	Par. et libre	Parasitant
<i>I. wisconsinensis</i>	63	3	Parasitant	Libre
<i>G. viridis</i>	6	0	Par. et libre	-

**Note:** Les pourcentages ont été établis à partir de 137 mermithides échantillonnés l'hiver et de 89 l'été

Nous avons identifié 13 espèces et complexes d'espèces de mouches noires à l'intérieur des 28 sites de notre étude. Les plus fréquemment parasitées étaient du genre *Prosimulium* sp tandis que les *Mesomermis* sp. parasitent le plus grand nombre de mouches noires démontrant donc le moins de spécificité dans le choix d'un hôte. *S. decorum* et *S. venustum/verecundum* sont tous deux victimes de toutes les espèces de mermithides (Tableau 2).

**Tableau 2:** Présence (+) ou absence (-) de chacune des espèces de mermithides parmi les mouches noires recueillies

	<i>Prosimulium</i> sp.†	<i>S. venustum/verecundum</i>	<i>S. vittatum</i>	<i>S. decorum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>C. dacotensis</i>	<i>C. mutata</i>
<i>Mesomermis</i> sp. *	+	+	-	+	+	+	+
<i>I. wisconsinensis</i>	+	+	-	+	-	-	-
<i>G. viridis</i>	-	+	-	+	-	+	-
Non identifiable	-	-	+	+	+	-	-

**Note:** Dans le cadre de cette étude, les espèces de mouches noires suivantes n'ont pas été retrouvées parasitées: *S. annulus*, *S. corbis*, *S. euryadminiculum*, *S. longistylatum*, *S. pugetense* et *S. quebecense*.

\* Les deux espèces de *Mesomermis* ont été regroupées puisque 62% des spécimens de ce genre n'ont pu être différenciés à l'espèce.

† Les espèces furent identifiées comme *P. fontanum*, *P. fuscum* et *P. mixtum* variant en proportion selon les sites.

Au cours de notre étude, des cas d'hyperparasitisme impliquant jusqu'à huit individus à l'intérieur d'une même larve ont pu être observés. Bien que le nombre de cas de superparasitisme soit plus élevé chez *Prosimulium* sp., le nombre de parasites par larve de mouches noires est plus important chez *S. tuberosum*. Ce grand nombre de parasites par larve de *S. tuberosum* a aussi été retrouvé par Colbo et Porter (1980). Il a été aussi intéressant de constater qu'une même larve de mouche noire puisse être parasitée par



deux différentes espèces de mermithides d'où du multiparasitisme (Tableau 3), ce qui est à notre connaissance une première dans le cas des mermithides parasites de mouches noires.

**Tableau 3:** Détermination des cas de superparasitisme chez les mouches noires; identification et nombre de mermithides trouvés.

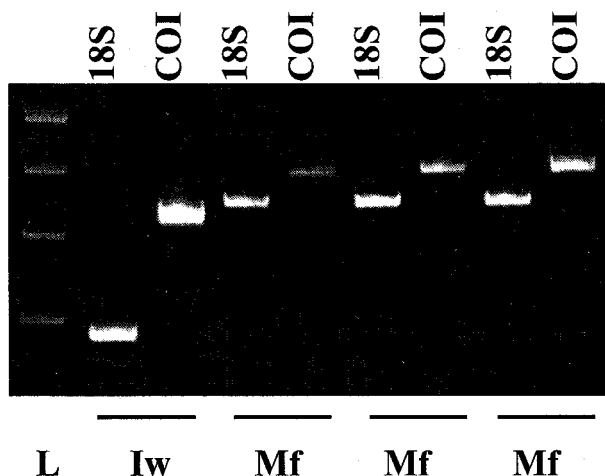
	Nombre de mouches noires superparasitées	Nombre de mermithides par larve	Espèces de mermithides
<i>Prosimulium sp.</i>	7	5 x 2 2 x 3	Tous des <i>Mesomermis sp.</i>
<i>S. decorum</i>	1	2	1 <i>Mesomermis sp.</i> + 1 <i>I. wisconsinensis</i>
<i>S. tuberosum</i>	3	1 x 8 1 x 3 1 x 4	8 <i>Mesomermis sp.</i> 2 <i>Mesomermis sp.</i> + 1 ? 4 ?
<i>S. venustum / verecundum</i>	1	2	1 <i>I. wisconsinensis</i> + 1 <i>Mesomermis fluminalis</i>

Bien que plusieurs variables environnementales soient indiquées dans la littérature (McCreadie et Adler, 1999) comme jouant un rôle dans la présence de mermithides parasites tel le pH et la conductivité, seule la profondeur s'est pour notre part avérée significative dans la présence ou l'absence de mermithides dans nos sites de recherche. En effet, on retrouve des mermithides dans les sites peu profonds, mais ayant des pH variant de plus de 3 unités, alors que la conductivité observée sur tous nos sites était trop faible pour constituer une contrainte à l'établissement d'une population de mermithides. Aucune autre variable ne s'est avérée significative.

### Moléculaire

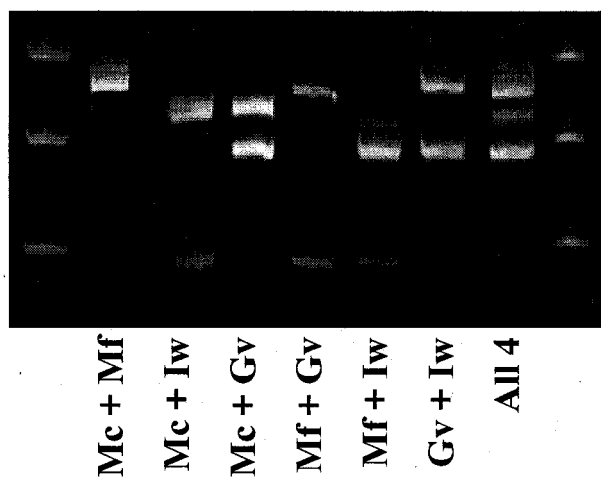
L'identification moléculaire des mermithides à l'aide du typage s'est avérée un succès puisqu'il nous a été possible, autant avec les amorces du COI que des amorces du 18S, de différencier les quatre espèces. Nous avons conservé les deux séries d'amorces car, au niveau de la résolution électrophorétique, il peut être difficile de différencier *I. wisconsinensis* et *M. camdenensis* avec seulement les amorces de COI si les deux

individus ne sont pas côte à côte. Il en est de même pour le 18S avec *M. fluminalis* et *M. camdenensis*. Il est possible de se fier à l'identification moléculaire pour les individus non identifiables morphologiquement puisque qu'une vingtaine d'individus dont l'identification morphologique était certaine ont été testée et il en est résulté une parfaite concordance, tel que démontré par l'exemple de la Figure 4.



**Figure 4** : Identification par PCR de *I. wisconsinensis* (Iw) et de *M. fluminalis* (Mf) à l'aide des amorces 18S et COI. L : « ladder » 100 pb.

À partir de combinaisons synthétiques d'ADN des espèces prises deux à deux ou d'un mélange des quatre, nous avons pu constater qu'il nous serait possible dans les cas de multiparasitisme d'identifier la présence de plus d'une espèce (Fig. 5). Cette découverte a été mise en application lorsque nous nous sommes retrouvés face à un cas de multiparasitisme où l'un des deux mermithides était trop abîmé pour être identifié morphologiquement. Nous avons extrait leurs ADN ensemble et il en est résulté qu'il s'agissait de *I. wisconsinensis* et de *M. fluminalis*, diagnostic confirmé par le typage du 18S et du COI.

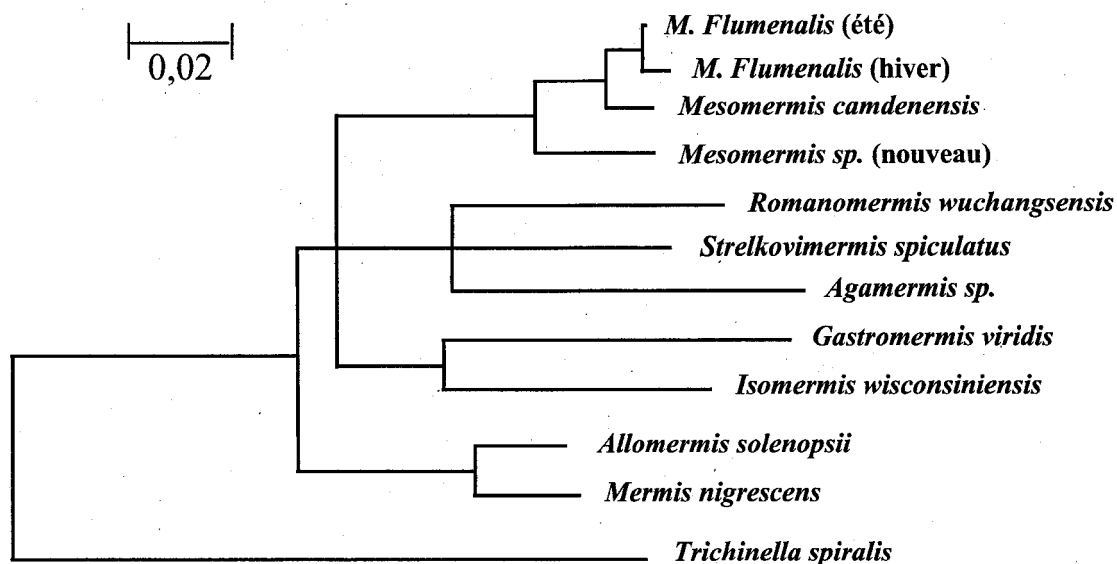


**Figure 5 :** Combinaisons synthétiques de l'ADN des quatre espèces de mermithides amplifiées avec l'amorce 18S.

Afin de répondre à la question de savoir si *M. flumensis* est une seule espèce avec deux variantes physiologiques ou deux espèces morphologiquement jumelles, nous avons séquencé six individus d'été et six d'hiver. Nous avons constaté que les mermithides morphologiquement identifiés comme étant *M. flumensis* représentaient en fait non pas une ou deux, mais trois espèces. En effet, en plus de découvrir que les individus de *M. flumensis* récoltés l'hiver divergeaient moléculairement de ceux récoltés l'été, il s'ajoute au sein des individus d'été un autre groupe de deux séquences nettement différentes des deux précédentes. La question de ce qui définit une espèce sur le plan moléculaire se pose. Si nous devons établir un critère traçant la frontière entre deux espèces, il est impératif de tenir compte du marqueur utilisé et de la variabilité à l'intérieur de chaque espèce présumée comparée à celle entre deux groupes. Si l'on observe les individus d'hiver versus d'été de *M. flumensis*, ils comptent deux différences par rapport au 18S et une cinquantaine par rapport au COI. Nous sommes donc en présence de deux échelles évolutives différentes. L'ADNr est une séquence fortement conservatrice et excelle dans le classement des niveaux supérieurs et moyens tels embranchement, ordres et familles, mais on peut se demander si cet outil possède la pouvoir discriminant nécessaire pour distinguer de proches parents. En 2002, Floyd *et al.* ont fixé à 0,5% de différence la frontière entre deux unités taxinomiques moléculaires opérationnelles chez des nématodes de sol pour une comparaison d'une longueur

minimale de 450 pb d'ADNr 18S. Selon nous, ce critère ne peut servir de règle universelle puisque certaines régions du 18S sont nettement plus variables que d'autres et qu'une seule base différente de plus ou de moins suffirait ici à faire basculer la décision « une ou deux espèces » d'un côté ou de l'autre. Même en considérant des séquences plus longues, il faut aussi prendre en considération la vitesse d'évolution des gènes ciblés. Parmi bien d'autres, Holterman *et al.* (2006) rappelle que les nématodes évoluent à différentes vitesses et qu'un nombre critique de différences nucléotidiques ne peut être fixé de façon générale. À l'opposé, COI est un marqueur à évolution très rapide pouvant être utilisé entre autre pour l'étude de la génétique des populations, les variations intraspécifiques dues la plupart du temps à des mutations silencieuses pouvant facilement atteindre plus de 1%. Ici, la différenciation des espèces atteint des divergences de plus de 15%. C'est pourquoi une approche combinant différents marqueurs fournirait sans doute l'image la plus complète, puisque capable de sonder des durées et niveaux taxinomiques distincts.

Bien que ce soit en séquençant des individus préalablement identifiés comme étant des *M. fluminalis* que nous avons découvert la nouvelle espèce, la question à savoir s'il s'agit bien d'un *Mesomermis* se pose. Nous avons répondu en produisant un arbre phylogénétique (Fig. 6) de nos mermithides parasites de mouches noires ainsi que de quelques autres parasites d'arthropodes dont une partie de la séquence du 18S a été trouvée sur Genbank. Les quatre *Mesomermis* y forment un groupe bien distinct, alors que *G. viridis* et *I. wisconsinensis* ne se regroupent pas plus avec les *Mesomermis* qu'avec une autre famille de mermithide. Les quatre principales branches de l'arbre fragmentaire présenté ici ont divergé tôt et approximativement au même moment.



**Figure 6 :** Arbre phylogénétique du 18S de quelques mermithides dont 6 espèces parasites de mouches noires. *Trichinella spiralis* sert ici de standard externe.

On retrouve de plus en plus de données de séquences de mermithides dans les banques telles Genbank; cependant l'information reste très souvent partielle. Certains spécimens associés aux séquences n'ont pour seule identification que le fait de faire partie de la famille des mermithides. Pour d'autres séquences, bien que l'individu soit identifié au genre, elles ne sont associées à aucune publication nous permettant d'avoir plus d'information telle l'origine de ces mermithides ou leur hôte. Nous devons nous méfier de cette taxinomie peut-être erronée dans certains cas, puisque des spécimens identifiés par des sources distinctes comme étant de la même espèce peuvent avoir des séquences différentes pour le même fragment d'ADN. Nous constatons donc un manque de collaboration entre taxinomistes traditionnels et biologistes moléculaires. Autant d'un côté la taxinomie traditionnelle entraîne un grand nombre de mermithides non identifiés, autant de l'autre, le séquençage ne permet pas l'identification, ne nous indiquant que les différences entre individus. Il est nécessaire pour permettre l'identification à partir du séquençage ou d'autres outils moléculaires de se baser sur des individus au préalable correctement identifiés par la morphologie pour ensuite créer une clé d'identification moléculaire capable de reconnaître les individus que la taxinomie traditionnelle ne peut classer à l'espèce.

## CONCLUSIONS

Bien que nous sachions suite à notre étude quelles espèces de mouches noires sont parasitées ainsi que les espèces de mermithides les infectant, nous ne pouvons conclure de façon certaine sur la question de la spécificité du parasitisme des mermithides. On retrouve un grand nombre d'espèces de mouches noires parasitées par la même espèce de mermithide et dans certain cas deux espèces de mermithides à l'intérieur de la même larve de mouche noire. Toutefois, la découverte de nouvelles espèces tend à démontrer que le grand nombre d'espèces de mouches noires parasitées par une même espèce de mermithide pourrait en fait refléter une déficience au niveau de l'identification. Par exemple, nous pouvons déduire que les espèces de mouches noires d'hiver sont parasitées par la variété d'hiver de *M. fluminalis* et vice versa, ce qui réduit le nombre d'hôtes pour une seule espèce de mermithide. Cela nous amène à conclure que les mermithides, dans leur choix d'hôte, n'ont peut-être pas de spécificité au sens strict, mais plutôt une préférence dictée en partie par leur adaptation à une plage donnée de températures.

Suite à nos résultats, nous pouvons conclure que chaque environnement favorable pour les mouches noires ne l'est pas forcément pour les mermithides. En effet, nous retrouvons des larves de mouches noires dans des cours d'eau pouvant aller jusqu'à quelques mètres de profondeur, mais de telles conditions entraîneraient la dérive des mermithides et les empêcheraient d'atteindre leurs hôtes.

Nous avons atteint notre objectif de création d'une clé moléculaire capable de différencier les quatre espèces de mermithides Néarctiques et il resterait à y inclure les deux nouvelles espèces découvertes au cours de notre étude. Ce nouvel outil permettra la réalisation de travaux plus avancés sur la succession saisonnière des mermithides grâce à la capacité d'identifier à l'espèce tous les stades du parasite ainsi que sur l'association des mermithides et de leurs hôtes et par le fait même apporter des précisions sur la question de la spécificité. Nous avons aussi pu constater que la similarité des hôtes parasités n'impliquait pas nécessairement le même type de similarité

pour les mermithides responsables de ce parasitisme; par exemple, deux parasites de mouches noires peuvent être moléculairement plus éloignés qu'un parasite d'araignée et un de criquet. L'ancêtre des mermithides parasites de mouches noires était probablement hébergé par un autre type d'hôte. Le passage d'un hôte à l'autre serait probablement fréquent en termes d'évolution et c'est sans doute pourquoi il est possible pour le parasite de moustique *R. culicivorax* d'infecter, en laboratoire, des mouches noires (Hansen et Hansen, 1976).

## BIBLIOGRAPHIE

- Adler, P. H., Currie, D.C., Wood, D.M. (2004) "The blackflies (Simuliidae) of North America", ROM publication in science. New York. 941 pp.
- Bailey C. H., Gordon R., Mills C. (1977) "Laboratory culture of the free-living stages of *Neomesomermis fluminalis*, a mermithid nematode parasite of Newfoundland blackflies (Diptera: Simuliidae)", *Canadian Journal of Zoology*, 55: 391-397
- Colbo M. H., (1990) "Persistence of Mermithidae (Nematode) infections in black fly (Diptera: Simuliidae) populations", *Journal of the American mosquito control association*, 6: 203-206
- Colbo, M. H., et Porter G. N. (1980) "Distribution and specificity of Mermithidae (Nematoda) infecting Simuliidae (Diptera) in Newfoundland", *Canadian Journal of Zoology*. 58:1483-1490
- Crosskey R. W. (1990) "The Natural History of Blackflies", John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 711 pp.
- Curran, J. (1982) "Infectivity and Development of Blackfly (Simuliidae) Mermithid in Mosquitoes", *Journal of Invertebrate Pathology*, 39: 401-402
- Finney J. R. (1981) "Potential of Nematodes for Pest Control In: Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980", Burges H. D. ed., Academic Press New York, pp.603-620
- Finney J. R., Mokry J. E. (1980) "*Romanomermis culicivorax* and Simuliids", *Journal of Invertebrate Pathology*, 35: 211-213
- Floyd R., Abebe E., Papert A., Blaxter M. (2002) "Molecular barcodes for soil nematode identification", *Molecular Ecology*, 11: 839-850
- Gordon R., Condon W. J., Edgar W. J. (1978) "Effects of mermithid parasitism on the haemolymph composition of the larval blackflies *Prosimulium mixtum/fuscum* and *Simulium venustum*", *Parasitology*, 77: 367-374
- Hansen E. L., Hansen J. W. (1976) "Parasitism of *Simulium damnosum* by *Romanomermis culicivorax*", *I.R.C.S. Med. Sci.*, 4: 508
- Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J. (2006) "Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades", *Molecular Biology and Evolution*, 23: 1792-1800
- Hu M., Gasser R. B., Chilton N. B., Beveridge I. (2005) "Genetic variation in the



mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 within three species of Progamotaenia (Cestoda: Anoplocephalidae) from macropodid marsupials", *Parasitology*, 130: 117-129

McCreadie J. W., Adler P. H. (1999) "Parasites of larval black flies (Diptera: Simuliidae) and environmental factors associated with their distributions", *Invertebrate Biology*, 118: 310-318

Mokry J. E., Finney J. (1977) "Notes on mermithid parasitism of Newfoundland blackflies, with the first record of *Neomesomermis flumenalis* from adult hosts", *Canadian Journal of Zoology*, 55: 1370-1372

Molloy D. G. (1981) "Mermithid parasitism of black flies (Diptera: Simuliidae)", *Journal of Nematology*, 13: 250-256

Molloy D. G. (1979) "Description and Bionomics of *Mesomermis camdenensis* n. sp. (Mermithidae), a Parasite of Black Flies (Simuliidae)", *Journal of Nematology*, 11: 321-327

Molloy D. G., Jamnback H. (1977) "A black fly control field trial using mermithid parasites and its cost implications", *Mosquito News*, 37: 104-108

Morin A., Back C., Chalifour A., Boisvert J., Peters R. H. (1988) "Effect of black fly ingestion and assimilation on seston transport in a Quebec lake outlet", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 705-714

Nickle W. R. (1972) "A Contribution to our Knowledge of the Mermithidae (Nematoda)", *Journal of Nematology*, 4: 113-146

Petersen J. J., Willis W. (1972) "Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes", *Mosquito News*, 32: 226-230

Phelps R. J., DeFoliart G. R. (1964) "Nematode parasitism of simuliidae", Wisconsin University, Madison, Research division, Research Bulletin # 245, 78 pp.

Poinar G. O. Jr. (1981) "Mermithid nematodes of blackflies: In: *Blackflies: the Future for Biological Methods in Integrated Control*", Laird M. ed., Academic Press New York, pp. 159-170

Poinar G. O. Jr. (1979) "Nematode for biological control of insects", CRC Press inc., Boca Raton, 277 pp.

Rojas W., Northup J., Gallo O., Montoya A. E., Montoya F., Restrepo M., Nimnich G., Arango M., Echavarría M. (1987) "Reduction of malaria prevalence after introduction of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) in larval *Anopheles* habitats in Colombia", *Bulletin of the World Health Organization*, 65: 331-337

Welch H. E. (1962) "New Species of *Gastromermis*, *Isomermis*, and *Mesomermis*

(Nematoda: Mermithidae) from Black Fly Larvae”, *Annals of the Entomological Society of America*, 55: 535-542

Wood, D.M., Peterson, B.V., Davies, D.M. and Gyorkos, H. (1963) “The Black flies (Diptera: Simuliidae) of Ontario. Part II. Larval identification, with description and illustration” *Proc. Entomol. Soc. Ont.* 93: 99-129.

**CHAPITRE 2**  
**PREMIER ARTICLE**

Mermithids (Nematoda: Mermithidae) parasitizing different blackfly (Diptera: Simuliidae) populations in Quebec and environmental parameters related to their presence or absence in the studied brooks.

St-Onge, Mylène and Charpentier, Guy

St-Onge, M. Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500 Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7, [mylene.st-onge@uqtr.ca](mailto:mylene.st-onge@uqtr.ca)

Charpentier, G. Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500 Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7, [guy.charpentier@uqtr.ca](mailto:guy.charpentier@uqtr.ca)

Corresponding author: Charpentier, G. Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500 Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7, Tel. 819-376-5011 (3370) Fax. 819-376-5084, [guy.charpentier@uqtr.ca](mailto:guy.charpentier@uqtr.ca)

**Summary:** *Isomermis wisconsinensis*, *Gastromermis viridis*, *Mesomermis fluminalis* and *Mesomermis camdenensis* have either of them been found in 14 out of 28 studied sites. Their hosts were the following blackfly species: *Cnephia dacotensis*, *Prosimulium* sp., *Simulium decorum*, *Simulium tuberosum*, *Simulium venustum/verecundum*, and *Simulium vittatum*. Superparasitism was observed in several simuliid larvae and, occasionally, with two different mermithid species. The prevalence of different mermithid species varies according to seasons: *Mesomermis* genus is more abundant during winter, whereas *Isomermis* and *Gastromermis* are found in higher number during summer. The study of environmental parameters related to mermithid presence or absence shows that only stream depth makes a difference.

**Résumé :** *Isomermis wisconsinensis*, *Gastromermis viridis*, *Mesomermis fluminalis* et *Mesomermis camdenensis* ont l'un ou l'autre été retrouvés dans 14 sites des 28 étudiés parasitant les espèces de mouches noires suivantes : *Cnephia dacotensis*, *Prosimulium* sp., *Simulium decorum*, *Simulium tuberosum*, *Simulium venustum/verecundum* et *Simulium vittatum*. Du superparasitisme a été observé chez plusieurs larves de simulies avec dans certains cas deux espèces de mermithides différents. L'abondance des différentes espèces de mermithides varie selon les saisons, le genre *Mesomermis* étant le plus abondant en hiver tandis qu'*Isomermis* et *Gastromermis* le sont en été. Lors de la caractérisation du type de milieu associé à la présence de mermithides, nous avons trouvé que la seule variable entraînant une différenciation de ces milieux est la profondeur des cours d'eau.

## Introduction

Blackflies may be parasitized by a wide range of pathogens such as viruses (cytoplasmic polyhedrosis virus, iridescent virus, densovirus), protozoa (principally microsporidia), fungi such as Entomophthorales, and mermithids (Adler *et al.*, 2004; Charpentier *et al.*, 1986; Nadeau *et al.*, 1996). Among these pathogens, mermithids show the highest infection rate in blackflies (Adler *et al.*, 2004). As such, they could be an interesting biological agent for blackfly control. Blackfly biological control experiment with *Mesomermis fluminalis* resulted in an infection rate of 71,4 % (Molloy and Jamnback, 1977). However, the mermithid mass production is difficult, and its high cost limits the use for blackfly control. In Ukraine, *Gastromermis spp.* and *Isomermis rossica* were introduced in mermithid-free sites. *Gastromermis spp.* settled in three out of six sites where they were introduced, but *Isomermis rossica* could not settle in any site where they were introduced (Likhovoz, 1978 cited in Kim and Merritt, 1987). Other mermithids, such as *Romanomermis culicivorax*, were used for mosquito biological control. Their production cost was not prohibitive, but they stopped reproducing after two years, thus inducing mermithid population decrease (Rojas *et al.*, 1987). A laboratory assay with *R. culicivorax* infecting blackflies gave interesting results (Hansen and Hansen, 1976). Field experiments, however, were unsuccessful as regards to blackfly infection (Finney and Mokry, 1980). Blackflies were also tentatively infected by normally non-parasitic nematodes for blackflies. *Neoplectana carpocapsae* induced a 75 % infection rate for *Simulium vittatum* 7<sup>th</sup> instar but 0 % infection for early-instar larvae (Gaugler and Molloy, 1981). A close watch over the blackfly larvae would then be necessary for the use of this nematode for blackfly biological control. The purpose of

this study is to investigate, in a determined area which blackfly species are naturally parasitized and which are the parasitizing mermithid species.

Once the mermithid assignation to blackfly species is well known, the study aims at inducing mermithid survival and host infection that are requested for an effective biological control. Environmental conditions may set a limit as regards mermithid distribution. It is known, for instance, that host infection does not occur with *R. culicivorax* when site conductivity is higher than 1900  $\mu\Omega$  (Finney and Mokry, 1980). McCreddie and Adler (1999), too, observed that parasitic infection of *Simulium tuberosum* type A occurs only in wide streams, when acidity and oxygen level are high, when conductivity is low and canopy is thin. These data, however, concerning only *S. tuberosum*, cannot be generalized to all blackfly species. The present study will, then, try to determine environmental parameters related to mermithids presence or absence whichever blackfly species is parasitized.

## **Material and methods**

### **Study area**

For the present study, sampling was performed from winter 2005 to winter 2006 in 28 sites located in Mauricie, Centre du Québec, Estrie, Gaspésie, and Bas St-Laurent (Québec, Canada) (table 1). The sites were chosen according to stream accessibility.

### **Mermithid and blackfly conservation and identification**

Blackflies collected in Mauricie were brought to the laboratory and placed in fish tanks inside an environmental chamber with a temperature of 5°C during winter and reaching until 25°C during summer. Light was set with a photoperiod of 16h light: 8h dark. Mermithids were then taken off water after emergence, identified and placed in 95 % ethanol (Commercial Alcohols Inc., Brampton, Canada) for conservation. Blackfly larvae selected for their whiter color and their increased abdomens were dissected in order to extract mermithids which were identified and fixed as above. Blackfly larvae collected from all other sites were immediately fixed in ethanol. All fixed blackfly larvae were dissected later and mermithids extracted in the parasitic cases. Free mermithids were obtained from the sand collected with plastic bags in the stream bottom with known mermithid settlements. In the laboratory, bags were emptied in wide trays from which mermithids were removed. Mermithids were identified with a microscope according to the species description by Poinar (1979) and the morphology description and drawings by Phelps and DeFoliart (1964), Molloy (1979) and Welch (1962). Blackfly larvae were identified with a binocular according to the keys of Wood *et al.* (1963) and Adler *et al.* (2004).



### **Environmental data measurement**

Environmental measures recorded on each site were stream speed with a current meter (Kahl Scientific Equipment, El Cajon, USA), water conductivity with a conductivity meter (Myron, Encinitas, USA), and pH with a Accumet Basic pH meter (Fisher, Nepean, Canada); stream width and depth were also measured. For measuring weight of suspended matter, a 1L sample of water was taken from each site and, in the laboratory, was filtered on a 0,45 µm nitrocellulose filter (Millipore, Bedford, USA) with a filtration system (Gelman Science, Ann Arbor, USA), and dried in dust free open air. The difference in filter weight before and after filtration and drying gives the suspended matter weight. Samples from Gaspesia were fixed with 7,5 % formaldehyde (Sigma-Aldrich inc., St-Louis, USA) in order to stop microbial growth and put on ice until filtration.

### **Statistical analysis**

A database was set up including all environmental parameters, all the blackfly species found in each site, finally a mermithid related parameter reflecting the mermithid presence or absence. Preliminary data analysis showed no covariance between parameters, thus allowing the use of these parameters directly for a multivariable analysis with the SYSTAT 10 software. A logistical regression could be set up as the depending parameter was binary and our independent parameters were quantitative and binary.

## **Results**

### **Season-related mermithid occurrence**

The present study allowed observing the four known Nearctic mermithid species, the presence of which in their parasitic state is season related; *Mesomermis fluminalis*, *M. camdenensis*, *Isomermis wisconsinensis* and *Gastromermis viridis* (Table2). *M. fluminalis* can be found in summer and in winter while *I. wisconsinensis* and *G. viridis* are spring and summer species. The two species belonging to *Mesomermis* genus are grouped together because 62% of these could not be distinguished. Actually, they were juvenile instars, since 93% were collected from parasitized blackflies, or immediately after emerging. Among the seldom found free-living mermithids 62% were adults. Free-living mermithids were found, through sand sampling along the stream, in only one site, the lake Souris outlet (Table1).

### **Environmental parameters**

pH values are highly different among the studied sites where mermithids and blackflies could be found: more than 3 unit differences (Table 3). Site dimensions and current velocity are not widely different. For blackfly presence, minimal current velocity is required. As a matter of fact, in order to facilitate sampling, for the present study, streams were chosen according to an easy foot-access. High velocity streams, then, were not sampled. Differences in suspended matter amounts are related to differences in site types and composition. Samples could be collected in a lake outlet, a fall or a stream, the bottom of which may be rocky, made of organic matter, sand or silt. Values presented in table 3 were all measured between mid-may and mid-june, while blackflies are in great numbers in order to establish comparisons out of seasonal influence. The

logistical regression analysis result shows that stream depth is the only significant parameter influencing mermithid presence or absence (Figure 1).

### **Mermithid to blackfly assignation**

The assignation of various mermithid to blackfly species are shown in table 4. In the 28 sites of the present study, 13 blackfly species or complexes have been identified. Blackfly more frequently parasitized belong to *Prosimulium* genus, the species of which, *P. fontanum*, *P. fuscum*, and *P. mixtum*, are present in different amounts depending on the studied site. Two blackfly species hosted by the three mermithid genera, two by two mermithid genuses, three by probably one mermithid genus, and the other blackfly species were parasite free.

Superparasitism was also observed (Table 5). The frequency of which was one superparasitized larva for 19,5 single-parasitized larvae. The average number of mermithids per larva is then 1,09 for all the parasitized blackfly larvae. Interestingly, there is one multiparasitized simuliid larva containing two easily identified different mermithid species (Table 5).

## Discussion

As the most important blackfly parasites, mermithids participate in their natural control. The present study investigates the conditions required for this control. There are season related differences in parasitic phases: the North area mermithids, for instance live host-free during six to eleven months a year (Colbo, 1990). *Mesomermis sp.* can be found during both summer and winter, since it can parasitize *Prosimulium sp.*, a winter-developing host larva, and also *Simulium* species, summer-developing host larvae. In fact, *Mesomermis sp.* consists of two physiological strains (Bailey *et al.*, 1977). Whereas *G. viridis* and *I. wisconsinensis* are described as spring and summer parasites (Ezenwa, 1974).

In the present study, sampling sites where mermithids have been found show highly variable pH values. Oppositely, for McCreadie and Adler (1999), mermithids are mostly found in low-pH sites. Mermithids are probably adapted to various pH values as their host. Finney and Mokry (1980) showed that another mermithid from mosquitoes, *Romanomermis culicivorax* cannot survive in pools where water conductivity is higher than 3 000  $\mu\Omega$ . Then, that does not constitute a valuable parameter to discriminate potential blackfly mermithid sites and mermithid free sites since, in the present investigation, conductivity values are always lower than 3 000  $\mu\Omega$ .

Mermithids are only found in shallow sites. This is probably due to the fact that they are unable to go upstream (Colbo, 1990). In shallow waters, they can reach their host and the sandy bottom without exceedingly drifting. The main part of the infecting preparasites within streams is by the juvenile postparasites populations that maintain

themselves by going in more quite regions in the substratum of the stream beds (Gordon, 1984)

It is impossible to ascertain that some sites are mermithid-free, but for such sites more than one hundred blackfly larvae have been tested parasite-free before declaring the absence of mermithid.

This investigation about mermithid to blackfly species assignation as host showed that the most frequently occurring blackfly species, *Prosimulium sp.* and *S. venustum/verecundum*, are also the most frequently parasitized. According to the present study the host parasite relationship is non-specific which is controversial. Harkrider (1988), too, showed that many blackfly species are host for the same mermithid species and Adler *et al.* (2004) set a list of the numerous blackfly species which can be host for each of the mermithid species studied here. On the other side, Colbo (1990) suggests that there is host specificity. But, Curran (1982) successfully infected mosquitoes larvae with a blackfly mermithid. Moreover, Finney (1981) suggested that the stream composition of the simuliid population largely determine which species become infected. In our study, the most frequently parasitized were the blackfly species the most occurring. Solving this problem would require more working on identification characters which should include the use of molecular tools, both for mermithids but in some cases for their host too (Gordon, 1984).

In our investigation, the average number of mermithids per blackfly larva, 1,09, is lower than expected according to previous observations. For Colbo and Porter (1980), the

average number of mermithids per blackfly larva rose to 2,2. This variation is the result from the difference of the most frequent blackfly species. Colbo and Porter most frequent species was *S. tuberosum* which had high number of parasites raising the average number of their study. In our case it is also *S. tuberosum* that had the higher number of parasites, but this blackfly species was not so frequent in our study. When superparasitism occurs, mermithid identification is more difficult since the worms are smaller and at higher risk to get damaged during larval extraction.

Blackfly biological control with mermithids seems possible as concerns *C. dacotensis*, *C. mutata*, *Prosimulium sp.*, *S. tuberosum*, *S. venustum/verecundum* and *S. vittatum*, in shallow sites, as far as mermithids can be produced at low cost by means of mass production of the mermithids parasitizing the above species. This should include mermithid production on blackfly cell cultures in a similar way to *R. culicivorax* production on mosquito cell cultures. The appropriate conditions for increasing mermithid parasitism and survival in the field should be well known.

**Acknowledgment:** This work was supported in part by financial help from the Université du Québec à Trois-Rivières (M. St-Onge).

## References

- Adler, P. H., Currie, D.C., and Wood, D.M. 2004. *The blackflies (Simuliidae) of North America*. ROM publication in science. New York.
- Bailey, C. H., Gordon, R., and Mills, C. 1977. *Laboratory culture of the free-living stages of Neomesomermis fluminalis, a mermithid nematode parasite of Newfoundland blackflies (Diptera: Simuliidae)*. Canadian Journal of Zoology. **55**: 391-397
- Charpentier, G., Back, C., Garzon, S., and Strykowski H. 1986. *Observations on a new intranuclear virus-like particle infecting larvae of a black fly Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae)*. Diseases of Aquatic Organisms. **1**: 147-150
- Colbo, M. H., and Porter G. N. 1980. *Distribution and specificity of Mermithidae (Nematoda) infecting Simuliidae (Diptera) in Newfoundland*. Canadian Journal of Zoology. **58**:1483-1490
- Colbo, M. H. 1990. *Persistence of Mermithidae (Nematode) infections in black fly (Diptera: Simuliidae) populations*. Journal of the American Mosquito Control Association. **6**: 203-206
- Curran, J., 1982. *Infectivity and Development of Blackfly (Simuliidae) Mermithid in Mosquitoes*. Journal of Invertebrate Pathology. **39**: 401-402

Ezenwa, A. O. 1974. *Ecology of Simuliidae, Mermithidae, and Microsporida in Newfoundland freshwaters*. Canadian Journal of Zoology. **52**: 557-565

Finney, J. R., and Mokry, J. E. 1980. *Romanomermis culicivorax and Simuliids*. Journal of Invertebrate Pathology. **35**: 211-213

Finney J. R. 1981. *Potential of Nematodes for Pest Control*. In Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980. Edited by H. D Burges. ed., Academic Press New York p.603-620

Gaugler, R., and Molloy, D. 1981. *Instar Susceptibility of Simulium vittatum (Diptera : Simuliidae) to the Entomogenous Nematode Neoaplectana carpocasae*. Journal of Nematology. **13**: 1-5

Gordon, R. 1984. *Nematode Parasites of Blackflies*. In Plant and Insect nematodes. Edited by W. R. Nickle, Marcel Dekker Inc. New York and Basel p. 821-847

Hansen, E. L., and Hansen, J. W. 1976. *Parasitism of Simulium damnosum by Romanomermis culicivorax*. I.R.C.S. Medical Science. **4**: 508

Harkrider, J. R. 1988. *A field study of larval black flies (Diptera: Simuliidae) by Neomesomermis fluminalis (Nematoda: Mermithidae) in southern California*. Environ. Entomol. **17**: 391-397



Kim, K. C., and Merritt. R. W. 1988. *Black flies Ecology, Population Management, and Annotated World List*. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania. 528 p.

McCreadie, J. W., and Adler, P. H. 1999. *Parasites of larval black flies (Diptera: Simuliidae) and environmental factors associated with their distributions*. *Invertebrate Biology*. **118**: 310-318

Molloy, D. G., and Jamnback, H. 1977. *A black fly control field trial using mermithid parasites and its cost implications*. *Mosquito News*. **37**: 104-108

Molloy, D. G. 1979. *Description and Bionomics of Mesomermis camdenensis n. sp. (Mermithidae), a Parasite of Black Flies (Simuliidae)*. *Journal of Nematology*. **11**: 321-327

Nadeau, M. P., Dunphy, G. B., and Boisvert, J. L. 1996. *Development of Erynia conica (Zygomycetes: Entomophthorales) on the Cuticle of the Adult Black Flies Simulium rostratum and Simulium decorum (Diptera: Simuliidae)*, *Journal of Invertebrate Pathology*. **68**: 50-58

Phelps, R. J., and DeFoliart G. R. 1964. *Nematode parasitism of simuliidae*, Wisconsin University, Madison, Research division, Research Bulletin # 245, 78 pp.

Poinar, G. O. Jr. 1979. *Nematode for biological control of insects*. CRC Press inc. Boca

Raton.

Rojas, W., Northup, J., Gallo, O., Montoya, A. E., Montoya, F., Restrepo, M., Nimnich, G., Arango, M., and Echavarría, M. 1987. *Reduction of malaria prevalence after introduction of Romanomermis culicivorax (Mermithidae: Nematoda) in larval Anopheles habitats in Colombia.* Bulletin of the World Health Organization. **65**: 331-337

Welch, H. E. 1962. *New Species of Gastromermis, Isomermis, and Mesomermis (Nematoda: Mermithidae) from Black Fly Larvae.* Annals of the Entomological Society of America. **55**: 535-542

Wood, D.M., Peterson, B.V., Davies, D.M. and Gyorkos, H. 1963. *The Black flies (Diptera: Simuliidae) of Ontario. Part II. Larval identification, with description and illustration.* Proc. Entomol. Soc. Ont. **93**: 99-129.

**Table 1:** Geographical location of investigated areas

Invertigated areas	Nombre of sites	North Latitude	West Longitude
St-Élie	1	46° 29'	72° 58'
St-Boniface	1	46° 30'	72° 49'
St-Mathieu	1	46° 34'	72° 55'
St-Narcisse	1	46° 25'	72° 28'
Réserve faunique St-Maurice	3	46° 54'	72° 58'
Centre du Québec	3	45° 53'	72° 29'
Etrie	2	45° 25'	72° 17'
Zec Rimouski	3	48° 15'	68° 20'
Réserve Duchesnier	4	48° 13'	68° 32'
Réserve Matane	3	48° 40'	67° 20'
Parc National de la Gaspésie	2	48° 48'	66° 03'
Zec de l'Anse	3	48° 17'	64° 57'

**Table 2:** Seasonal variations in mermithid presence

Mermithids	Occurrence (%)		Phase	
	Summer	Winter	Summer	Winter
<i>Mesomermis sp.</i>	31	97	Par. and free	Parasitizing
<i>I. wisconsinensis</i>	63	3	Parasitizing	Free
<i>G. viridis</i>	6	0	Par. and free	-

**Nota:** Percentages established from 89 summer-collected mermithids and 137 winter-collected mermithids

**Table 3:** Environmental parameter values measured in the 21 sites, including mermithid presence (+) or absence (-)

Sites	Mermithid	pH	Width (m)	Depth (cm)	Current velocity (m/sec)	Conductivity ( $\mu\Omega / \text{cm}^3$ )	Suspended matter (g)
1	-	8.77	18	35	0.66	120	0.0057
2	-	8.57	7	30	1.29	70	0.0042
3	-	8.9	2.5	10	0.48	20	0.0062
4	+	8.5	4.3	45	1.12	65	0.0105
5	-	8.52	8	35	1.13	30	0.0066
6	+	8.73	5.7	25	0.6	30	0.0094
7	-	8.46	7	45	0.75	120	0.0036
8	+	8.77	2.3	12.5	0.76	105	0.0046
9	+	8.33	4.7	20	1.07	50	0.0033
10	+	8.27	2.7	12.5	1	40	0.0114
11	+	8.38	5.2	15	0.82	110	0.0047
12	+	8.44	1.8	15	0.45	210	0.0088
13	-	8.51	5.6	40	0.62	110	0.0046
14	+	8.34	2.6	17.5	0.72	110	0.0056
15	-	8.55	6.5	32.5	0.47	100	0.0057
16	+	5.68	6.9	15	0.7	50	0.00107
17	+	5.81	8.5	12.5	0.51	50	0.00303
18	+	6.64	6.6	10	0.44	30	0.00085

---

19	-	6.43	5.1	35	1.3	30	0.0068
20	+	5.62	4.1	15	0.34	40	0.00355
21	+	6.64	3	10	0.713	40	0.00394
22	+	6.44	6.6	30	1.044	30	0.01944
23	-	4.51	0.98	15	0.351	60	0.18
24	-	6.6	11.2	20	0.806	23	0.00747
25	-	5.96	35	25	0.847	30	0.003
26	-	6.3	0.9	27.5	0.455	45	0.014
27	-	6.68	12	45	0.806	14	0.025
28	-	6.94	6.5	20	0.775	16.5	0.048

---

**Table 4:** Presence (+) or absence (-) of each mermithid species in the collected blackfly species

	<i>Prosimulium sp.</i> *	<i>S. venustum/verecundum</i>	<i>S. vittatum</i>	<i>S. decorum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>C. dacotensis</i>	<i>C. mutata</i>
<i>Mesomermis sp.</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>I. wisconsinensis</i>	+	+	-	+	-	-	-
<i>G. viridis</i>	-	+	-	+	-	+	-
Non identifiable	-	-	+	+	+	-	-

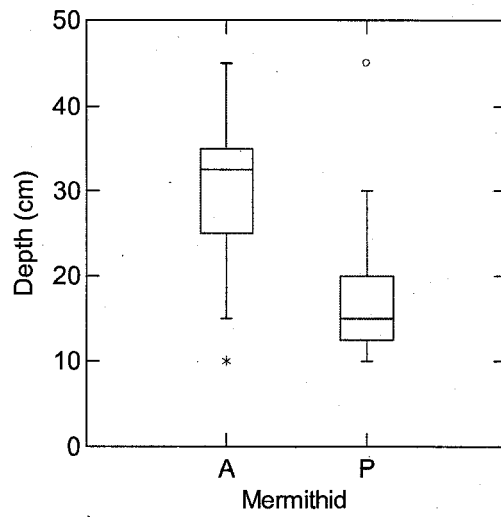
**Nota:** In the present investigation, the following blackfly species were not parasitized *S. annulus*, *S. corbis*, *S. euryadminiculum*, *S. longistylatum*, *S. pugetense* and *S. quebecense*.

\* The most frequently occurring, but with different amounts according to sites, are: *P. fontanum*, *P. fuscum* and *P. mixtum*.

**Table 5:** Determination of superparasitized blackfly species; number and identification of mermithids found.

	Number of superparasitized blackflies	Number of mermithids per larva	Mermithid species
<i>Prosimulium sp.</i>	7	5 x 2 2 x 3	All are <i>Mesomermis sp.</i>
<i>S. decorum</i>	1	2	1 <i>Mesomermis sp.</i> + 1 <i>I. wisconsinensis</i>
<i>S. tuberosum</i>	3	1 x 8 1 x 3 1 x 4	8 <i>Mesomermis sp.</i> 2 <i>mesomermis sp.</i> + 1 ? 4 ?
<i>S. venustum</i> / <i>verecundum</i>	1	2	1 <i>I. wisconsinensis</i> + 1 ?





**Figure 1:** Mermithid presence (P) or absence (A) according to depth distribution of sampled sites

**CHAPITRE 3**  
**DEUXIÈME ARTICLE**

Bernard LaRue  
Box 500, Université du Québec à Trois-Rivières  
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A5H7  
819-376-5052 (phone)  
819-376-5084 (fax)  
[bernard.larue@uqtr.ca](mailto:bernard.larue@uqtr.ca)

A Molecular Revision of the Taxonomic Status of Mermithids Parasites of Blackflies  
from Northeast America

Mylène St-Onge,<sup>1</sup> Bernard LaRue,<sup>1,2</sup> Guy Charpentier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de Chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351  
Boulevard des Forges, Box 500, Trois-Rivières, Canada G9A5H7

<sup>2</sup> Author for correspondence

## ABSTRACT

The four currently recognized mermithid (Nematoda) species parasites of blackflies (Diptera: Simuliidae) from Northeast America were distinguished using discriminatory PCR primers aimed at either COI or 18S rDNA. *Isomermis wiscosinensis*, *Gastromermis viridis* and *Mesomermis camdenensis* were easily differentiated using either genomic target. However, specimens from *Mesomermis fluminalis* being identical in external morphology belonged in fact to 3 distinct species according to sequence data. This trio included winter and summer 'physiological variants' of *M. fluminalis*, in addition to an entirely new species also belonging to, but diverging early from the rest of the *Mesomermis* genus as shown by a partial phylogenetic tree of the mermithid family.

Keywords: mermithidae, nematodes, simuliid hosts, PCR probes, cryptic species.

## RÉSUMÉ

Les quatre espèces de mermithides (Nematoda) couramment reconnues comme parasites de mouches noires (Diptera :Simuliidae) en Amérique du Nord ont été identifiées à l'aide d'un PCR discriminant dont les amorces visaient soit COI, soit l'extrémité 3' de l'ADNr 18S. *Isomermis wiscosinensis*, *Gastromermis viridis* et *Mesomermis camdenensis* sont facilement différenciés par l'une ou l'autre des combinaisons d'amorces. Cependant, les individus de l'espèce *Mesomermis fluminalis* qui sont absolument identiques sur le plan morphologique appartiennent en fait à trois espèces définies sur le plan moléculaire. Ce trio inclut les variants physiologiques d'été et d'hiver précédemment décrits ainsi qu'une espèce entièrement nouvelle appartenant également au genre *Mesomermis*, mais ayant divergé très tôt des autres espèces du même genre.

Among all parasites, mermithids are responsible for the highest known infection rates in blackflies (Adler *et al.*, 2004). Other representatives of these nematodes usually have a limited host range and infect insects of various orders as well as several other types of invertebrates. Recent molecular data position this family close to the evolutionary root of all nematodes and as neighbors to other groups that are not necessarily invertebrate parasites (Blaxter *et al.*, 1998; Holterman *et al.*, 2006). Some reports indicate that mermithid infection may persist up to the adult stage of the host (Colbo and Porter, 1980; Mokry and Finney, 1977) and that both female and male flies may then 'oviposit' the parasite in the water stream. However, blackfly mermithids are generally considered fully aquatic nematodes parasitizing larvae as juveniles and reproducing as free-living adults in the sandy bottom of the well oxygenated streams which harbor their hosts. Their presence is not only related to host availability, but also critically dependent on a shallow stream depth estimated at 25 cm or less (unpublished).

In eastern Nearctic areas, only 4 species are currently recognized as blackfly parasites, namely *Mesomermis fluminalis*, *Gastromermis viridis*, *Isomermis wisconsinensis* (Welch, 1962) and *Mesomermis camdenensis* (Molloy, 1979). Their taxonomy, which has been reviewed by Poinar (1979), but remains poorly developed, relies mostly on the genitalia in adults, while the more frequently sampled parasitizing juveniles are identified primarily by the shape of their stylus. However, specimens are easily damaged upon extraction from their host, which causes a high level of unidentified or misidentified individuals. More importantly, the paucity of morphological criteria leads to the suspicion that there may be many more cryptic species than usually recognized. For instance, two 'physiological variants' of *M. fluminalis*, the so-called winter and summer types, were identified in Newfoundland and

each shown to be univoltine and to differ from the other by host range, temperature tolerance and seasonal life cycle (Bailey and Gordon 1977; Ebsary and Bennet, 1975; Ezenwa, 1974). Given their effective reproductive isolation, these variants stand as likely candidates for the eventual recognition of two distinct species. Contrary to the limited host range of the three other species, *M. fluminalis* also appears to infect a disproportionate number of blackfly species (Adler *et al.*, 2004; the authors, unpublished). This suggests that a whole spectrum of nematode species could well hide under the *M. fluminalis* designation (Gordon, 1984). Others (Colbo, 1990) have also expressed the opinion that the apparent lack of a specific host-parasite relationship may indicate a general taxonomic problem for many species of mermithids. Consequently, the development of DNA-based typing methods seems desirable not only for the purpose of mermithid identification, including damaged or fragmentary specimens, but also as a tool for ecological studies. The latter includes a clearer understanding of the specificity, or lack of it, of the host-parasite relationship, especially in the case of multiple parasitism. Also, comparative DNA sequence analysis could pave the way for a more detailed view of mermithid phylogeny. The present report describes such a molecular tool and shows that '*M. fluminalis*' consists of at least 3 species which are clearly distinguished on the basis of partial sequences from the nuclear 18S rDNA (18S) and from the mitochondrial gene of subunit I of the cytochrome oxidase complex (COI).

## METHODS

### *Sample collection*

Mermithids were collected in streams from various locations in Quebec (Canada) over a 2-year period. Specimens, most of them parasitizing juveniles extracted from their host, were identified under the microscope using criteria from Poinar (1979), Molloy (1979) and Phelps and DeFoliart (1964) and stored afterwards at 4 °C in 95% ethanol prior to DNA extraction. Blackflies were identified under binoculars using the keys of Wood *et al.* (1963) and Adler *et al.* (2004).

### *DNA purification*

Following a brief hydration in TE buffer (Sambrook and Russel, 2001), the mermithid was transferred to a microcentrifuge tube containing 120 µl of a lytic buffer originally developed for drosophila (Zyskind and Bernstein, 1989) and DNA was extracted as previously described for insect material (Léry *et al.*, 2003). The final purification step involved cleaning on a commercial resin (Wizard DNA clean-up resin, Promega) and recovery of DNA in 50 µl of sterile water.

### *PCR assays, characterization of amplification products and DNA sequencing*

DNA amplification was performed in a 25 µl volume containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 200 µM of each dNTP, 0.4 µM of each PCR primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Roche) and 1 µl of purified mermithid DNA. The thermocycling profile was 180 s at 95 °C, followed by 38 cycles of 30 s at 95 °C, 50 s at annealing temperature and 60 s at 72 °C and ended by a final extension of 180 s at 72 °C. Sequences, targets and annealing temperatures of PCR primers are described in detail by Table 1. For size determination purposes, amplified DNA was analyzed by



electrophoresis on a 5% polyacrylamide + 2.7 M urea gel running in TBE buffer (Sambrook and Russel, 2001) at 12 volts/cm for 1 hour and DNA bands were stained with ethidium bromide prior to photography. If sequencing was required, the PCR products were instead separated shortly on a 1% agarose gel, after which the band of interest was cut and DNA extracted (QIAquick PCR purification kit from QIAGEN). Sequencing using standard dye-termination methods was performed at the automated sequencing facility of Laval University.

*Sequence alignment and phylogenetic trees.*

DNA sequences were aligned using GENEIOUS version 2.06 without further manual adjustment being required. Preliminary phylogenetic trees were obtained for 18S through neighbor-joining, maximum parsimony and maximum likelihood procedures, which agreed completely with each other except for the relative positioning of three neighboring intermediates branches. Consequently, these were arbitrarily set to a unique root and the final branch lengths for the whole tree were calculated from the difference matrix by using a least square criterion to globally minimize the difference between actual and simulated divergences of sequence pairs. While doing so, no correction for parallel mutations or reversions was performed.

## RESULTS

The mermithid sample was composed of 47 individuals, including 22 ambiguous or damaged specimens. Of the remaining 25, 13 individuals from *M. fluminalis* (Mf), 5 from *M. camdenensis* (Mc), 5 from *I. wisconsinensis* (Iw) and 2 from *G. viridis* (Gv) were identified by morphology. From this group, a reference specimen from each species was set aside in order to extract sequence information for specific primer design as described below.

Primers JB3 and JB4.5, originally designed for cestodes by Hu *et al.* (2005), gave an abundant PCR product with Mf and Mc DNA, but amplified the COI gene in Iw and Gv so poorly that reamplification proved essential to obtain enough material for sequencing purposes. The information from the resulting 440 bp sequence was used to create five new internal primers (Figure 1), including a partly degenerate reverse primer cCOI-R hybridizing to a common target being shared by all four species and four specific primers, COI-F.Mf, COI-F.Mc, COI-F.Gv and COI-F.Iw. The 3' end of each of these four primers was such that it would hybridize to the DNA of only one species. In so doing, the 3' terminal base was anchored to the first or second codon position of the target so as to avoid amplification failure due to possible intraspecific third position polymorphism. Predicted (and observed, see below) PCR product sizes were 394, 344, 302 and 250 bp for Mf, Mc, Iw and Gv respectively. A similar strategy was used to create 18S primers. Comparing *D. melanogaster* (Tautz *et al.*, 1988) and *C. elegans* (Ellis *et al.*, 1986) sequences revealed two long nucleotide stretches, with approximate locations at 15 and 360 bases upstream from the 3' end of 18S rDNA, found to be conserved between the two species and therefore assumed to be identical in the mermithid genome. This was indeed the case and the sequence information (Figure 2)

available through the use of the c18S-F and c18S-R common external primers led to the design of 4 internal specific primers which again enabled a distinction between all four species.

As shown by Figure 3A, an assay using the 4 specific primers plus the common primer (c18S-F in the case of the 18S target) led to a full species discrimination following a single PCR reaction. The band profile of both COI and 18S matched perfectly the morphological identification of all specimens for which this information was already available and the remaining dubious or damaged individuals could all be attributed to one of the four species (data not shown). In spite of primer design, there remained a weak chance that a specific primer could hybridize to a target DNA it was not intended for, thus leading to an incorrect identification. This possibility was checked for all four species in a series of assays including only one specific primer at a time. While no spurious amplification was ever revealed for COI primers, we recorded a single instance of 18S mispriming when using the Mf-specific primer since a band appeared for Iw gave at the level expected for Mf (Figure 3B). Cross-contamination of DNA samples can be excluded in this case since sequencing revealed that this band contained the authentic Iw sequence. In any case, this observation does not invalidate the principle of an assay mixing all four specific primers, since, as shown above, competitive conditions strongly favor the correct primer so that only the expected band is then obtained.

Since most of the mermithids were juveniles extracted from parasitized blackflies, this opens the possibility of contamination by blackfly material triggering an unwanted DNA amplification. This would at first seem unlikely since the sequence signature of mermithid COI and 18S (Figures 1-2) comes out very different from the one

given by blackflies (the authors, unpublished). However, DNA from mermithid-free blackflies revealed a series of weak bands with sizes overlapping the range of mermithid products for both COI and 18S targets (Figure 3A). Due to the high number of thermal cycles being used, one could likely attribute this result to non specific amplification, since these bands always vanished with a juvenile extracted mermithid as input DNA source.

Both mixed-primer assays can detect and identify cases of multiple parasitism. This was first simulated in unique amplification reactions driven by synthetic mixtures of DNA from 2 to 4 different species. All DNA combinations being tested for the COI target displayed the expected pattern of multiple bands with the predicted sizes (Figure 4); a similar result was also obtained for 18S (data not shown). These data should however be interpreted only in qualitative terms since, in real cases of multiple parasitism, variations in nematode sizes and yields for DNA extraction and amplification could well result into a distorted picture relative to the real number of individuals initially present from each species. The power of the assay was put to test when 2 mermithids harbored by the same blackfly from the *Simulium venustum/verecundum* complex were badly damaged during extraction from the host, such that only a stylus observed under the microscope provided a provisional identification for Iw. However, the PCR assay revealed bands for both Iw and Mf. As far as we know, this is the first reported case of a blackfly infection involving two different species of mermithids simultaneously.

As for the taxonomic status of *M. fluminalis*, 12 individuals representing equal numbers of winter (MfW) and summer (MfS) parasitizing juveniles were studied by comparing COI and 18S sequences using COI-F.Mf and 18S-R.Mf specific primers for

both amplification and sequencing reactions. As shown by Table 2 and Figures 1 and 2, individuals were clearly distinguished on the basis of the collecting season. With respect to species status, a difference of 2 nucleotides between MfS and MfW over a 318 bp length of 18S rDNA did not at first appear very convincing. However, this gene is so conservative in structure that it is used mostly for deeply rooted phylogenies (Pace *et al.*, 1986) and generally has little resolving power for close relatives. On the other hand, each of the two groups was nearly homogenous at the COI DNA sequence level, but so divergent from the other that there remained no doubt about the existence of two distinct MfW and MfS species as such. Moreover, two summer specimens (*M. fluminalis* 'new' or MfN) found to respectively parasitize *Simulium decorum* and *Simulium venustum/ verecondum* both possess 18S and COI sequences setting them completely apart from both MfW and MfS; no close Genbank counterparts could be found in this case. Based on molecular criteria, the uniform morphology of *M. fluminalis* thus hides a minimum of three distinct species.

COI was deemed unsuitable for inferring mermithid phylogeny. Genbank provided only a few dubious matches and, more importantly, the high and narrowly distributed level of observed differences for our DNA and even protein sequences indicated, save for the relatively close MfW and MfS pairs, that mutation saturation had been reached. Due to its high conservatism, 18S seemed a much more appropriate phylogenetic probe. Following a preliminary Genbank survey, several 18S sequences were discarded from the present analysis either due to dubious origins or to incomplete overlaps with the sequences being reported here. *Trichinella spiralis*, a pig parasite, was used as an external standard due to its location as the most divergent branch within the large clade comprising mermithids as a subset (Holterman *et al.*, 2006). When applied to

the final selected sequences, neighbor joining, maximum parsimony and maximum likelihood methods gave inconsistent results relative to the positions of branches 1-3 (Figure 5) nevertheless appeared to be always related to the same rapid divergence events. Given this uncertainty, they were set to a unique origin and, with the rest of the phylogeny following the common structure given by all three procedures, branch lengths for the whole tree were then computed and optimized according to Methods.

All 4 *Mesomermis* species, with MfN as the most divergent, clustered together in isolation from other branches, thus confirming their status as members of the same genus. *I. wisconsinensis* and *G. viridis* also belonged to a common branch, although, with only 2 quite divergent sequence representatives, it now seems premature to attribute them to the same genus. Blackfly mermithids clearly represented a minimum of two distinct molecular groups which are intermixed with others harboring parasites of various types of insect, crustacean or arachnid hosts. Also, the phylogenetic tree contained at least two instances of branches where one finds mixed types of hosts, namely *R. wuchangensis* (mosquito) and *Agamermis* sp. (woodlouse) on one hand and *A. solenopsii* (ant), *Mermithidae* sp. (spider) and *M. nigrescens* (grasshopper) on the other. This clearly demonstrated, despite the actual scarcity of data, that mermithids did not necessarily evolve in parallel with their hosts, which becomes strikingly clear when observing only a 2 base difference between *Mermithidae* sp. and *M. nigrescens*.

## DISCUSSION

Two simple discriminatory PCR assays can now distinguish between four mermithid species which had earlier been described mostly according to their morphology. However, mermithid taxonomy should not be taken for granted unless also supported by sequence data. Following here a careful morphological identification and a unique-sized PCR product with potential specific primers, sequence data later uncovered a complex of three cryptic species, MfW, MfS and MfN, otherwise posturing as *M. fluminalis*. With this information in hand, future applications could bypass sequencing after a general diagnosis of *M. fluminalis* by using a second, still to be created, set of primers to enable the further differentiation into MfW, MfS or MfN. Without alleviating the need for primary sequence data, this approach could be extended to other cases of suspected morphological twins. Distinguishing MfW from MfS did not represent too great a surprise since ecophysiological data had long raised serious doubts about the status of a species consisting of physiological variants which differed both by host range and reproductive timing. However, the unveiling of MfN is quite unexpected and one may wonder whether it corresponds to an earlier recognized morphological species. Given biogeography and previous reports, *Hydromermis* sp. which was described in Newfoundland by Mokry and Finney (1977) would appear as the only possible candidate. However, this attribution to MfN seems unlikely on two grounds. Firstly, according to the morphological criteria of Nickle (1972), confusion of species could arise more easily with *Gastromermis* than with *Mesomermis*. Next, in spite of a standing as its most divergent representative, MfN clearly belongs to the *Mesomermis* genus according to sequence data and should thus be recognized as a new species previously hidden by morphology under the *M. fluminalis* guise. Further studies will be required to

precisely define the host range of the three cryptospecies, with maybe yet new molecular species to be uncovered.

Cases of misidentification can also arise from molecular data if not considering available sequences in parallel with traditional information such as parasite morphology or appropriate host identification. For instance, the Genbank 18S sequence DQ533954 erroneously bears the *Gastromermis* sp. label since it shows a total identity with the MfW sequence which we report here as invariant between half a dozen specimens which had undergone careful morphological characterization prior to DNA extraction. In searching Genbank, we also recorded several other cases of two strikingly different sequence hits corresponding to the same species name. Finally, vague 'Mermithidae sp.' tags without the backing of traditional publications flourish in Genbank. Together with the rarity of sequence data from mermithids parasitizing invertebrates other than insects, this explains why their taxonomy and phylogeny remain so sketchy at the present time.

The most distantly related blackfly mermithids, namely *Mesomermis* versus Iw/Gv, diverge 5-10 times more, relative to each other, than their hosts when comparing homologous 18S sequence segments between *Prosimulium/Twinnia* and *Simulium*; similar conclusions emerge through comparisons of COI protein sequences, which vary very little within simuliids (unpublished), but diverge much more in mermithids. This suggests that mermithid origins anticipated the emergence of simuliids by hundreds of millions of years and that major host changes occurred in the same time course, unless one assumes very different molecular clock rates between simuliid host and parasite. Concerning this latter hypothesis, rapid evolution of 18S rDNA in plant and animal parasitizing nematodes has been suggested (Aguinaldo *et al.*, 1997; Gillooly *et al.*, 2005). According to data from Holterman *et al.* (2006), this seems to apply mostly to



upper clades of the phylum, but not to basal clade 2 which, in addition to mermithids, also harbors fungivores, algivores and plant parasites. One may hope that an increase in the number of DNA sequences of mermithids from a large spectrum of hosts will help to resolve this problem and to better document phylogenies as well as possible major events of host switches.

**Acknowledgments.** This work was supported in part by financial help from the Université du Québec à Trois-Rivières (M. St-Onge). We also wish to thank C. Gaudreau for help in the use of bioinformatics.

## REFERENCES

Adler, P.H., Currie, D.C., Wood, D.M., 2004. The blackflies of North America. ROM publication in science, New York.

Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., Lake, J.A., 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489-493.

Bailey, C.H., and Gordon, R., 1977. Laboratory culture of the free-living stages of *Neomesomermis fluminalis*, a mermithid nematode parasite of Newfoundland blackflies (Diptera : Simuliidae). *Can. J. Zool.* 55 391-397.

Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, K., 1998. A molecular evolution framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71-75.

Colbo, M.H. and Porter, G.N., 1980. Distribution and specificity of Mermithidae (Nematoda) infecting Simuliidae (Diptera) in Newfoundland. *Can. J. Zool.* 58, 1483-1490.

Colbo, M.H., 1990. Persistence of Mermithidae (nematode) infections in black fly (Diptera: Simuliidae) populations. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 6, 203-206.

Ebsary, B.A., Bennet, G.F., 1975. Studies on the bionomics of mermithid nematode parasites of blackflies in Newfoundland. *Can. J. Zool.* 53, 1324-1331.

Ellis, R.E., Sulston, J.E., Coulson, A.R., 1986. The rDNA of *C. elegans*: sequence and structure. *Nucl. Acids Res.* 14, 2345-2364.

Ezenwa, A.O., 1974. Ecology of Simuliidae, Mermithidae and Microsporida in Newfoundland freshwaters. *Can. J. Zool.* 52, 557-565.

Gillooly, J.F., Allen, A.P., West, G.B., Brown, G.H., 2005. The rate of DNA evolution: effects of body size and temperature on the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 140-145.

Gordon, R., 1984. Nematode parasites of blackflies. In: Nickle, W.R. (Ed.), *Plant and Insect Nematodes*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 821-847.

Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J., 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1792-1800.

Hu, M., Gasser, R.B., Chilton, N.B., Beveridge, I., 2005. Genetic variation in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 within three species of *Progamotaenia* (Cestoda: Anoplocephalidae) from macropodid marsupials. *Parasitology* 130, 117-129.

Léry, X., LaRue, B., Cossette, J., Charpentier, G., 2003. Characterization and authentication of insect cell lines using RAPD markers. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1035-1041.

Molloy, D., 1979. Description and bionomics of *Mesomermis camdenensis* n. sp. (Mermithidae), a parasite of blackflies (Simuliidae). *J. Nematol.* 11, 321-328.

Mokry, J.E., Finney, J.R., 1977. Notes on mermithid parasitism of Newfoundland blackflies, with the first record of *Neomesomermis fluminalis* from adult hosts. *Can. J. Zool.* 55, 13170-1372.

Nickle, W.R., 1972. Contribution to our knowledge of Mermitidae (Nematoda). *J. Nematol.* 4, 113-146.

Pace, N.R., Olsen, G.J., Woese, C.R., 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45, 325-326.

Phelps, R.J., DeFoliart, G.R., 1964. Nematode parasitism of simuliidae. Wisconsin University, Madison, Research division, Research bulletin # 245.

Poinar, G.O. Jr, 1979. Nematode for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, CA.

Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. A1.7-1.17.

Tautz, D., Hancock, J.M., Webb, D.A., Tautz, C., Dover, G.A., 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. Mol. Biol. Evol. 5, 366-376.

Welch, H.E., 1962. New species of *Gastromermis*, *Isomermis* and *Mesomermis* (Nematoda: Mermithidae) from blackfly larvae. Ann. Entomol. Soc. Am. 55, 535-542.

Wood, D.M., Peterson, B.V., Davies, D.M., Gyorkos, H., 1963. The black flies (Diptera: Simuliidae) of Ontario. Part II. Larval identification, with description and illustration. Proc. Entomol. Soc. Ont. 93, 99-129.

Zyskind, J.W. and Bernstein, S.I., 1989. Recombinant DNA laboratory manual. Academic Press, San Diego, pp. 15-16.

Table 1. Sequences, targets and annealing temperatures of PCR primers.

Name <sup>1</sup>	Sequence <sup>1</sup> , 5'→3'	Target <sup>2</sup> ; annealing temperature
JB3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	COI/codon 235; 47 <sup>0</sup> C
JB4.5	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG	COI/codon 382; 47 <sup>0</sup> C
cCOI-R	TGNCCAACYACAAARTAGGTRTCATG	COI/codon 375; 61 <sup>0</sup> C
COI-F.Mf	TTCTTATTTTACCTGCTTTTGGGATAG	COI/codon 245; 61 <sup>0</sup> C
COI-F.Mc	AGGGGTAAAAAATATGTATTTGGTACTA	COI/codon 262; 61 <sup>0</sup> C
COI-F.Gv	TTTACTGTGGGGTTGGATATTGATTC	COI/codon 292; 61 <sup>0</sup> C
COI-F.Iw	GCAATAATTAGAATTAGAATTCTTGGTA	COI/codon 276; 61 <sup>0</sup> C
c18S-F	CAGGTNTGTGATGCCCTTAGATG	18S/-350; 52 <sup>0</sup> C, 61 <sup>0</sup> C <sup>3</sup>
c18S-R	ATGATCCAGCTGCAGGTTACCTAC	18S/-27; 52 <sup>0</sup> C
18S-R.Mf	TTACGACTTTTACTTCCTCTAGAGG	18S/-35; 61 <sup>0</sup> C
18S-R.Mc	CCAGTTTAAAAAATTCTCCAAAACAT	18S/-64; 61 <sup>0</sup> C
18S-R.Gv	CGTACTTGCCACAGTCCAAGCG	18S/-101; 61 <sup>0</sup> C
18S-R.Iw	TCAACTCGAGCTTATGACTCGCAT	18S/-187; 61 <sup>0</sup> C

<sup>1</sup> -F, -R: forward, reverse primer. The prefix 'c' designates a common primer while .Mf, .Mc, .Gv and .Iw identify primers being specific for *M. fluminalis*, *M. camdenensis*, *G. viridis* and *I. wisconsinensis* respectively. JB3 (forward) and JB4.5 (reverse) COI primers are from Hu *et al.* (2005). N = mixture of all 4 bases, Y = C/T, R = A/G.

<sup>2</sup> Target: hybridization site of the primer 3' terminal base, with reference to COI (Genbank accession number X54252) and 18S rDNA (upstream position from ITS1 start; Ellis *et al.*, 1986) sequences from *C. elegans*.

<sup>3</sup> 52<sup>0</sup>C with c18S-R as second primer, 61<sup>0</sup>C otherwise.

Table 2. Difference matrix of *M. flumenalis* sequences, giving the number of raw differences for comparisons of aligned 18S (317 bp) and COI (in parenthesis, 325 bp) sequences. Upper left to lower right diagonal: observed range of intraspecific differences.

Species	MfW	MfS	MfN
MfW	0 (0-1)		
MfS	2 (49-51)	0 (0-3)	
MfN	17 (83)	16 (87-89)	0 (0)

```

Iw- TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT GTC TTA ATT CTT CCT GTG TTT GGA ATT ATC TCT CAT
Gv- ... .. A.T ... .. T.A .A .CT ..C ..T ... ..C
Mc- ... .. A.T C.T ... .. T.A ... ..CC ... ..T G.A T.A ... ..A
MfW- ... .. A.T CTT ATT TTA CCT GCT TTT GGG ATA G.G ..A ..A
MfS- ... .. T C.T ... .. T.A ... ..CT ... ..G ..A G.A ... ..G.A
MfN- ... .. T C.T ... .. T.A ... ..CT ... ..G ..A G.A ..A G.A

Iw- AGC GTA ATA CTA AAT AGT TCA AAA AAA TTT ACT TTT GGT CAC TTA GGT ATA ATT TAT GCA
Gv- TCT A.T C.T ..T TTA ... GGT ... .. TG. ... ..A A.T C... .CG ..G TC. ..C ...
Mc- ...T ACT T... ..T TTA AGG GGT AAA AAA TAT GTA TTT GGT ACT A... ... ..T
MfW- ...A ACC C.T G.T TTA ..G GGT ... ..G .A. GT. ... ..G TCA C.T ... ..
MfS- ... ACT C.. ACC TTA ..G GGT ..G ... ..A. GT. ... ..G TCT ... ..T
MfN- ... AGG T.. A.T TTA ..G GGT ..G CCT AAA GT. ... ..A AGG ... ..A ... ..C

Iw- ATA ATT AGA ATT AGA ATT CTT GGT ACA ATA GTC TGA GCT CAT CAC ATA TTT AGA GTA GGT
Gv- ... .. GCT G.A ..A ... TGT G.G ... ..G ..C ..C ... ..G ..TT ACT GTG GGG
Mc- ... G.A G.C ... ..G G.. T.A ... TGT G.T ... ..C ... ..T ... ..G
MfW- ... G.G G.T ... .. G.A T.A ... T.. G.. ..T ... ..C ... ..T ... ..G ... ..G
MfS- ... ..G G.T ... ..T G.A ... ..A T.. G.. ..T ... ..T ... ..T ..G
MfN- ... G.A .T. ..C ..G ... T.A ..G TGT G.T ..A ... ..G ... ..T ..A

Iw- ATA GAT CTA GAT AGA CGC TCA TAT TTT ACA GCT GCT ACA ATA ATT ATT GCT ATT CCT ACT
Gv- TTG GAT ATT GAT TCT ..A G.. ... ..T.T T.. ..C ... ..C ..A ..G
Mc- T.. ... A.T ... ..T ..T ..T ... ..A ..C ..T ... G.A ... ..G... ..A
MfW- T.. ... A.. ... ..A ..C ... ..T.A ... ..G ... ..G.A ... ..A
MfS- T.. ..C A.T ... ..T ..T ..C ... ..A ... ..G.A ... ..G G.. ...
MfN- T.. ..C A.T ... ..A G.T ..C ... ..G ..T ... ..G... ..G G.C ... ..A

Iw- GGG ATT AAA ATT TTC TCT TGA ATT TCT ACT ATT TCT GGT TCA TTT ATA ATT ATA ACT AAC
Gv- ..A ... ..T ... ..A ... ..GA ... ..AC ..G AG. A.. .AT .AA T.C T.A GTA
Mc- ..A ... ..T ... ..G GC. ... ..T.A .A. ..G A.. AG. T.T .GA TG. .A. ..T
MfW- ..T ... ..T ... ..C ... ..A ..A .A. ..G A.. A.A T.T .AA TG. .A. ...
MfN- ..A ... ..T ... ..C ... ..A .A. ... A.. A.A T.T .G. TG. .A. ..T
MfN- ..T ... ..G.A A.. ..G ..G CAA ..G AG. GGA A.T .AA ..T GA. ...

Iw- TTA AAT AAA TGA TTA TTT GGG TTT TTG TTC TTA TTT ACC ATA GGG GGT TTA ACA GGT GTT
Gv- ... TTA .T. ..G G.G AC. ..A ... C.A CA C.G ..A TTT T.G ... ..G A..
Mc- ACT TTA .T. ... AC. A.A ... ..A.A ..T ... ..A ... ..A ..G ... ..A A..
MfW- AC. TTA TT. ... ACT A.A ..A ..C C.. ..T ... ..A G.. ... ..A C.. ..T ..C A..
MfS- AC. TA TT. ... ACT A.A ..T ... C.T ..T ... ..A G.. ..A ... ..G ..T ..G A..
MfN- AG. CTG CTT ..G ACT ..A ..A ..C C.A ..T ... ..A ..T ..A ..G C.T ... ..G ...

Iw- ACA ATA AGA AAT AGG TCT TTA GAT TTA GCC TTA CAT GAT ACC TAT TTT GTA GTA GGA CAT
Gv- ..T C... ..T .G. ..T AGA C... ..TT C.T ... ..T ... ..G ..T ..C ...
Mc- ..C C.T ..T .G. ..T AGG ... ..TTG ..G ... ..C ..T ..C ... ..C ..T ..T ...
MfW- ..T T.. ..C ..G TCT AGG ... ..C C.G AT. ... ..C ..A ..C ... ..T ..G ...
MfS- ..T T.. ..C ..G TCT AG
MfN- ..T T.. ..G .GC TCT AG

Iw- TTT CAT TAT GTT CTT TCT TTA
Gv- ... ..
Mc- ... ..
MfN- ... ..

```

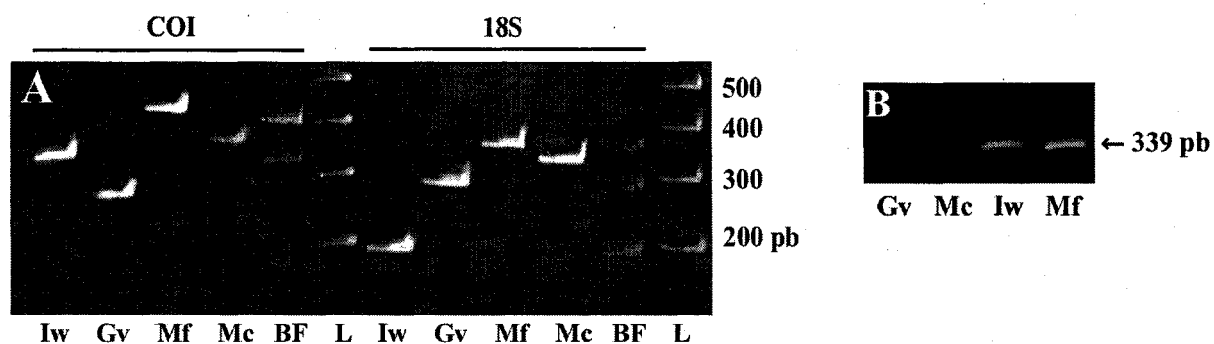
Figure 1. Reading frame of partial COI gene sequences from reference specimens. Iw, *I. wisconsinensis*; Gv, *G. viridis*; Mc, *M. camdenensis*. MfW, MfS and MfN are the winter, summer and new molecular species of '*M. fluminalis*'. A dot represents identity with Iw, save for targets of the 4 specific primers being underlined and given in full. JB3 and



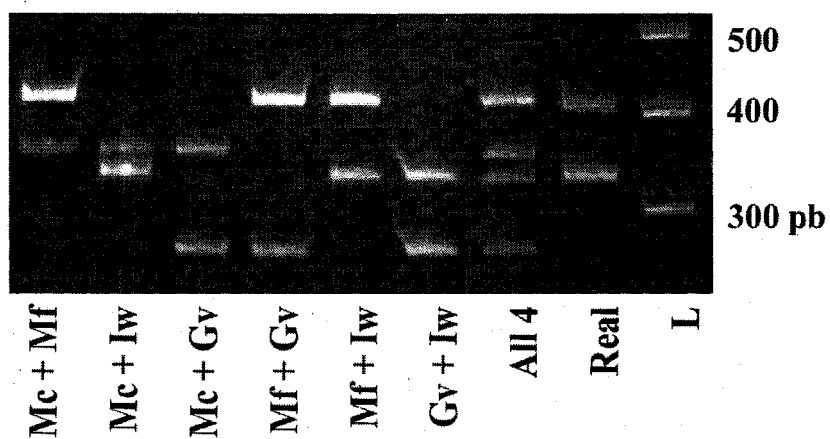
JB4.5 targets are shadowed and the complementary sequence to cCOI-R is indicated by italics.

Iw-	<u>CAGGTGTGTG</u>	<u>ATGCCCTTAG</u>	<u>ATGTCCGGGG</u>	CTGCACGCGC	GCTACAATGA	AGGTAGCAAT
Gv-	.....	.....	.....	.....	.....	.....G
Mc-	.....	.....	.....	.....	.....	.....A
MfW-	.....	.....	.....	.....	.....	.....A
MfS-	.....	.....	.....	.....	.....	.....A
MfN-	.....	.....	.....	.....	.....	.....A
Iw-	GTGCTTGTGG	TCCTCGCCCC	AAAGGGCTTG	GTAACACCA	ATTATTTTCG	TGCTTGGGAT
Gv-	.....T	A...T.T...	....A.A.	A..T...G.	....C.....	.....C
Mc-	...TG...AAA	A..AT.T.T.	...A.A....	...T.....	.....	.....
MfW-	...TG...AAA	A..AT.T.T.	...A.A....	...T.....	.....	.....
MfS-	...TG...AAA	A..AT.T.T.	...A.A....	...T.....	.....	.....
MfN-	...T...AAA	C..AT.T.T.	...A.A....	...T...T.	..C.....	.....
Iw-	AGGGAATTGA	AATTATTTCC	CTTGAACGAG	GAATTTCTAG	<u>TAAATGCGAG</u>	<u>TCATAAGCTC</u>
Gv-	.....	.....	.....	.....	..G.....	.....
Mc-	.....C	.....	.....	.....	..G..T...	.....
MfW-	.....C	.....	.....	.....	..G..T...	.....
MfS-	.....C	.....	.....	.....	..G..T...	.....
MfN-	.....C	.....	.....	.....	..G..T...	.....
Iw-	<u>GTGTTGATTA</u>	CGTCCCTGCC	CTTTGTACAC	ACCGCCCGTC	GCTACTACCG	ATTGGAGGAT
Gv-	A.....	.....	.....	.....	.....T.	.C...AA..
Mc-	AC.....	.....	.....	.....	.....	.....A..
MfW-	AC.....	.....	.....	.....	.....	.....A..
MfS-	AC.....	.....	.....	.....	.....	.....A..
MfN-	AC.....	.....	.....	.....	.....	.....A..
Iw-	TCAGTGAAAA	ATATGGACTG	TGTCCGGGAC	GGTGTAACAA	CTGCTCTGGT	ACGTGGGAAG
Gv-	.....C	<u>GCTTGGACTG</u>	<u>TGGCAAGTAC</u>	<u>G.CT.C..GG</u>	...AG..T..	GT.CA.....
Mc-	C.....G.	.....T.T	G...TT.A.T	A.CT.T..CG	..AG..ATGT	<u>TTTGGAGAAG</u>
MfW-	C.....G.	.....T.C	GA..T..A.T	A.CT.T..CG	..AG.TCA..	TTTG.AA...
MfS-	C.....G.	.....T.C	GA..T..A.T	A.CT.C..CG	..AG..CA..	TTTG.AA...
MfN-	G.....G.	.....T.C	GA..T..TCT	..CT...CG	..AGG.AA..	TTTG.A....
Iw-	TGTATTGAAC	TGAACTCTCT	AGAGGAAGTA	AAAGTCGTAA	CAAGGTTTCC	<u>GTAGGTGAAC</u>
Gv-	ACCG.....	..T.TGT...	GA.A.....	.....	.....	.....
Mc-	<u>TTTTTTAAAC</u>	<u>TGGTT.T</u>	.....	.....	.....	.....
MfW-	.T.TC.A...	..GTTCTCT	<u>AGAGGAAGTA</u>	<u>AAAGTCGTAA</u>	.....	.....
MfS-	.T.TC.A...	..GTTC....	.....	.....	.....	.....
MfN-	.T.TC.A...	..TGTC....	.....	.....	.....	.....
Iw-	<u>CTGCAGCTGG</u>	<u>ATCAT</u>	.....	.....	.....	.....
Gv-	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Mc-	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MfW-	.....	.....	.....	.....	.....	.....

*Figure 2.* Alignment of partial 18S sequences from reference specimens. Species identified as for Figure 1. Common and specific primer targets are shadowed and underlined respectively.



*Figure 3.* (A) Size characterization of the products from discriminatory PCR assays of COI and 18S. MfW, MfS and MfN species of *M. fluminalis*, not being distinguished, are collectively indicated by Mf. BF, products from mermithid-free blackflies. L, 100 bp ladder size marker. (B) Cross-reaction of Iw DNA with the Mf primer when the 3 other specific primers are omitted (Mf as positive control).



*Figure 4.* Simultaneous identification of species in a COI PCR assay. The 7 leftward wells: co-amplified synthetic DNA mixtures from previously identified individuals. ‘Real’ refers to a true case of multiple parasitism, with Iw and Mf being harbored by a blackfly larva from the *S. venustum/verecundum* complex. L: 100 pb ladder.

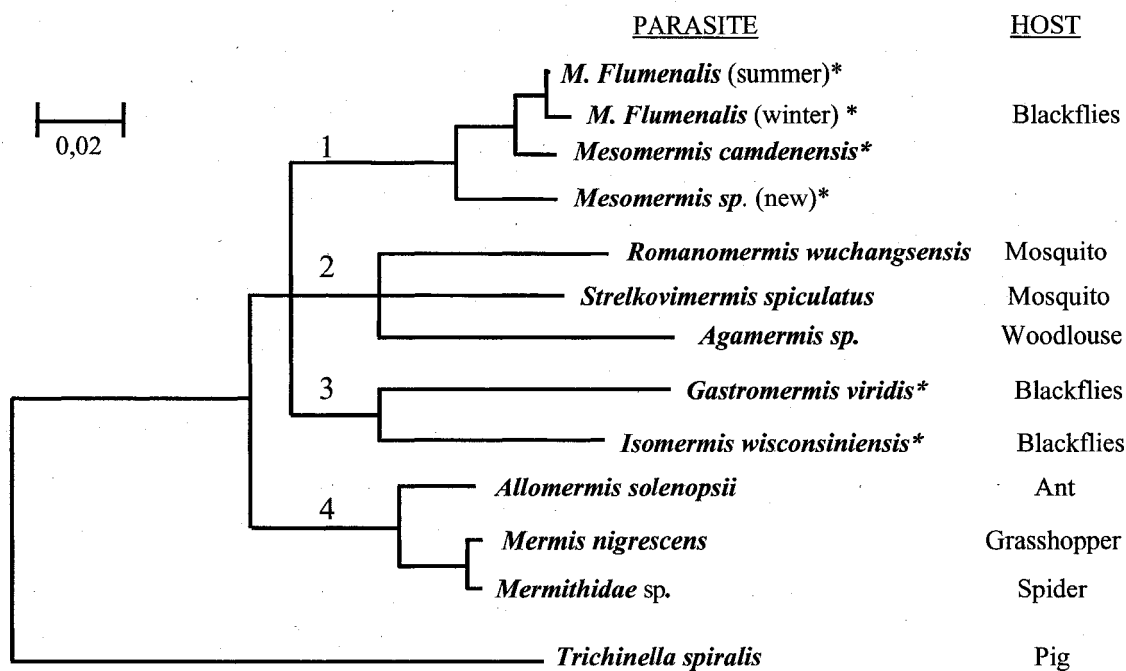


Figure 5. Phylogenetic tree of mermithids, with host category indicated at right. Asterisks identify sequences from this article. Other sequences bear Genbank accession numbers DQ665653 (*Agamermis sp.*), Dq665654 (*S. spiculatus*), AY 374416 (*Mermithidae sp.*), DQ518905 (*M. nigrescens*), DQ533953 (*A. solenopsii*), DQ520878 (*R. wuchangensis*) and U60231 (*T. spiralis*, external standard).

## **ANNEXE 1**

# The Canadian Entomologist

## Directives aux auteurs

### Généralités

Les articles pour publication dans *The Canadian Entomologist* peuvent être soumis en français ou en anglais. Les manuscrits couvrant tous les domaines de l'entomologie seront considérés, à moins d'avoir été soumis pour publication antérieure ou simultanée dans une autre revue. Les manuscrits doivent contenir des informations nouvelles et significatives et (ou) être d'intérêt général pour la communauté entomologique. Les travaux qui ne font que confirmer des découvertes antérieures, tels que les recherches d'intérêt local, les techniques (à moins d'être d'application large), les extensions d'aires et les nouvelles citations d'espèces, recevront une priorité assez faible. Les auteurs devraient remettre des spécimens-témoins à un institut reconnu pour confirmer l'identité des organismes étudiés et à indiquer dans leur article dans quelle collection les spécimens ont été déposés. Pour des renseignements sur les spécimens-témoins veuillez visitez <http://www.biology.ualberta.ca/bsc/briefs/brvouchers.htm>.

### Types d'articles

Les *synthèses* (10–15 pages imprimées) doivent traiter de sujets d'intérêt général ou d'actualité et se caractériser plus par leurs perspectives que par l'étendue de leur information. La plupart des synthèses sont préparées à la demande du Directeur scientifique en chef; cependant, les synthèses non sollicitées seront aussi examinées.

Les *articles traditionnels* présentent les résultats d'observations ou de recherches originales dans tous les domaines de l'entomologie. Les données ne doivent pas avoir été publiées auparavant, sauf sous une forme préliminaire. Les sujets non soumis à l'analyse scientifique, tels que les listes de spécimens ou les bibliographies, ne sont généralement pas acceptés.

Les *notes* (1–3 pages imprimées) sont une description concise mais complète d'une recherche de portée limitée dont les résultats ne seront pas publiés ailleurs plus tard; les notes ne sont donc pas un forum pour la publication de données préliminaires. Les résultats doivent être solidement appuyés par une bonne revue de la littérature et par la description des méthodes expérimentales employées, tout comme pour un article traditionnel. Elles doivent comporter un résumé (depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006), mais les sous-titres tels que l'Introduction, la Discussion, *etc.* ne sont pas nécessaires.

Les articles de type *forum* (3–6 pages imprimées) sont courts et ils fournissent l'occasion de formuler des hypothèses inédites, de remettre en question des théories généralement acceptées, de discuter de nouvelles idées, de proposer des interprétations différentes de données existantes et de réagir à d'autres forums publiés dans *The Canadian Entomologist*.

### Soumission des manuscrits pour examen

Les manuscrits doivent être soumis pour examen par courriel au Directeur scientifique en chef (Robb.Bennett@gov.bc.ca) avec un seul document joint en format Word ou WordPerfect. Une version PDF (Portable Document Format) peut également être jointe. Veuillez respecter les "Cession des droits d'auteur" qui suit. Les figures doivent être incluses dans le document à la suite de la liste des titres des figures. Les figures dans un document Word ou WordPerfect doivent être insérées sous forme de fichiers JPEG (JPG) ou GIF; ne pas insérer des fichiers non comprimés (*par ex.*, BMP, TIFF) et ne pas « couper » des images provenant d'autres applications et les « coller » dans le document, car il en résulte des fichiers trop volumineux. Pour le processus d'examen, une résolution réduite est préférable. On doit utiliser des polices « True Type » pour tout le texte. Les manuscrits qui utilisent des symboles particuliers doivent être soumis en format PDF (ainsi qu'en format Word ou WordPerfect) pour en faciliter la lecture. Prière de noter le logiciel, la version, et le système d'opération utilisés. Les manuscrits soumis en format papier sont recevables, mais l'examen risque d'être plus long.

### Cession des droits d'auteur

Pour obtenir l'acceptation finale du manuscrit, tous les auteurs doivent compléter et signer le formulaire « Autorisation de publier / Cession de droits d'auteur » (disponible sur le site de TCE à <http://esc-sec.org/canent2f.htm>) cédant tous les droits à la Société d'entomologie du Canada. **La version finale du manuscrit doit être accompagnée d'un formulaire complété par chaque co-auteur. On doit adjoindre aux « communications personnelles » cités dans le texte une lettre d'autorisation de la personne en question.** Cette lettre (un message courriel suffit) doit indiquer clairement que la personne qui a fait la communication personnelle a lu le texte de la communication, qu'elle en approuve le libellé et qu'elle en permet l'utilisation.

### Évaluation des manuscrits

Les auteurs ont la possibilité de suggérer eux-mêmes des examinateurs pertinents. Chaque soumission est confiée par le Directeur scientifique en chef au directeur scientifique responsable du secteur qui correspond au sujet du travail. Ce dernier est responsable du processus d'évaluation du manuscrit. C'est le directeur scientifique responsable du

secteur, ou l'un des directeurs scientifiques associés, qui choisit un minimum de deux examinateurs dont il ne dévoile pas l'identité à moins d'y être expressément autorisé par l'examineur en question. Cependant, toute demande d'information sur l'état du dossier doit être adressée au Directeur scientifique en chef. Tout article soumis sera retourné aux auteurs par le Directeur scientifique en chef pour modification d'après les rapports des examinateurs ou sera alors rejeté. Dans les cas d'articles qui ont déjà été refusés par d'autres revues, il faut inclure des copies des commentaires des réviseurs et des examinateurs.

### Soumission des manuscrits acceptés

Les auteurs devront fournir une version finale du manuscrit accepté en format électronique sur disquette ou par courriel. Les fichiers de textes et de figures doivent être sur des disquettes différentes. Toutes les disquettes doivent être identifiées clairement avec le nom des auteurs, le logiciel utilisé, la version, et la plate-forme (IBM ou Macintosh). Le texte, y compris les tableaux, doivent être en format de traitement de texte (toute version de WordPerfect ou de Word). Pour ce qui est des figures, voir la section sur les Illustrations des manuscrits acceptés.

### Format du manuscrit

#### Généralités

Les manuscrits qui ne satisfont pas aux exigences sous-mentionnées pourront être retournées à l'auteur (aux auteurs) pour correction. Le manuscrit doit être dactylographié dans une police de caractère de 12 points, **entièrement à double interligne** (incluant renvois au bas de page, titres des tableaux et figures, synonymies et listes bibliographiques), au recto du papier seulement, et en laissant des marges d'au moins 35 mm. La première page du manuscrit ne doit comporter que le titre de l'article, les noms des auteurs, les organismes auxquels ils sont affiliés, leurs numéros de téléphone et de télécopieur et leur adresse de courriel. Chaque page du manuscrit doit être numérotée en commençant par la page titre et comporter le nom du premier auteur, dans le coin droit supérieur de la page. Toutes les pages doivent être numérotées en ordre jusqu'à la dernière, y compris les pages portant les tableaux, les figures et les appendices. Notez que chaque ligne doit maintenant être numérotée. Des lignes devraient être numérotées séquentiellement de la page 2 (le résumé). L'orthographe doit suivre *Le Grand Robert*. Utiliser le *Dictionnaire des termes d'entomologie* d'E. Séguéy comme source de définition des termes d'entomologie. Dans le texte, les dates doivent être données sous la forme 1 avril 1991, 28 juin 2003, etc. Pour les dates apparaissant dans les sections Matériel type et Matériel examiné des soumissions en taxonomie, nous préférons la forme 1.iv.1991, 28.vi.2003, etc., sauf dans une citation. Dans le texte, les renvois aux figures doivent être faits sous la forme «(fig. 1)», «(fig. 1-5)», etc. Les renvois au bas de page doivent être réduits au strict minimum. Lorsqu'essentiels, ils doivent apparaître au bas de la page même où ils sont faits et être séparés du texte par une ligne.

**Tous les taxons de genre et d'espèce** doivent inclure le nom du ou des descripteurs à leur première mention dans le résumé et le texte (mais pas dans le titre). Le nom des arthropodes doit être accompagné de l'ordre et de la famille (*par ex.*, « le genre *Strobilomyia* Michelsen (Diptera : Anthomyiidae), incluant *Strobilomyia varia* (Huckett) », alors que celui des plantes doit être suivi seulement par la famille (*par ex.*, « *Quercus velutina* Lamarck (Fagaceae) »). Les noms communs des insectes doivent être ceux approuvés par la Société d'entomologie du Canada (*Noms communs des insectes du Canada*, disquette disponible auprès de la Société : 393, avenue Winston, Ottawa (Ontario), Canada K2A 1Y8, ou en ligne à <http://esc-sec.org/menu.htm>).

Les **abréviations et symboles** de mots, phrases, et termes doivent si possible être ceux recommandés par *Scientific Style and Format: The CBE Style Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Sixth Edition (1994) (Council of Biology Editors, Inc., Chicago, Illinois 60603, États-Unis d'Amérique). Le Système international d'unités (SI) doit être utilisé pour les poids et mesures. La description du système et d'autres renseignements utiles se retrouvent dans le *Guide de familiarisation au système métrique* (2000) publié par l'Association canadienne de normalisation (178 Rexdale Boulevard, Toronto (Ontario), Canada M9W 1R3).

Les **articles en taxonomie** doivent être conformes au *Code international de nomenclature zoologique* (International Trust for Zoological Nomenclature 1999, Natural History Museum, Cromwell Road, Londres, Royaume-Uni SW7 5BD). Les auteurs sont priés de regrouper l'information pertinente à la description ou à la révision de taxons sous les rubriques suivantes (s'il y a lieu) et de préférence dans l'ordre suivant : Synonymes, Matériel type (ou Matériel examiné), Étymologie, Diagnose, Description, Variation, Biologie, Hôtes et répartition géographique et Discussion (Commentaires ou Remarques). Les auteurs doivent placer tout nouveau taxon (espèce, genre) dans un contexte approprié; ils doivent, autant que possible, fournir une clé d'identification ou une version modifiée d'une clé existante. L'établissement formel de groupes taxonomiques supraspécifiques doit être appuyé par des méthodes cladistiques, idéalement par une analyse cladistique formelle; exceptionnellement, une énumération des états synapomorphes des caractères avec leur état plésiomorphe correspondant dans le ou les groupes externes peut suffire. Les auteurs sont encouragés à fournir l'information relative aux holotypes telle qu'elle apparaît sur les étiquettes.

#### Titre et résumé



Lorsque le nom d'un organisme apparaît dans le titre, utiliser soit son nom commun ou son nom scientifique (sans le nom du descripteur), mais pas les deux. Tous les types d'articles doivent débiter par un résumé d'au plus 200 mots. L'ajout d'une traduction du résumé en anglais est encouragée; elle devrait être fournie avec le manuscrit soit à la soumission, soit au moment de la révision finale. **Les auteurs qui ne peuvent soumettre une traduction anglaise de bonne qualité du résumé de leur article se verront facturer un montant supplémentaire de 50,00 \$(20,00 \$ pour les notes).**

#### Remerciements

Ils doivent être concis et regroupés dans un paragraphe séparé à la fin du texte.

#### Références

Les citations de travaux publiés doivent se faire sous l'une ou l'autre des formes suivantes : « Klimaszewski (2003) a montré... », « (Klimaszewski 2003) », « (Walker 1976, 1978) », ou « (Walker 1976; Allen 1977a, 1977b) ». Les références doivent être énumérées alphabétiquement par ordre d'auteur à la fin du texte. Les noms des revues et des périodiques doivent être **écrits au long**. Le titre complet de chaque référence doit apparaître, de même que les pages exactes, sauf dans le cas de livres; pour les livres, ne pas indiquer de pages ou de figures en particulier dans la liste bibliographique. Si c'est nécessaire, le faire dans le texte de la façon suivante : « (Nealis et Turnquist 2003, p. 906, fig. 1) ». Utiliser les formats suivants pour énumérer les références.

#### Article de revue :

Truman, J.W., et Riddiford, L.M. 2002. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annual Review of Entomology*, **47**: 467–500.

#### Livre :

Layberry, R.A., Hall, P.W., et Lafontaine, J.D. 1998. *The butterflies of Canada*. University of Toronto Press, Toronto.

#### Conférence :

Knudson, A. 1996. Evaluation of the biosprayer for the application of *Trichogramma* to cotton. *Dans Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*, Nashville, Tennessee, 9–12 janvier 1996. *Sous le direction de P. Dugger et D. Richter*. National Cotton Council, Memphis, Tennessee. p. 788–791.

#### Chapitre de livre :

Marshall, S.A., Buddle, C.M., Sinclair, B.J., et Buckle, D.J. 2001. Spiders, flies and some other arthropods of the Fathom Five National Marine Park islands and the upper Bruce Peninsula. *Dans Ecology, culture and conservation of a protected area: Fathom Five National Marine Park, Canada*. *Sous le direction de S. Parker et M. Munawar*. Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas. p. 191–229.

#### Article de revue avec DOI:

Wahlberg, N., Oliveira, R., et Scott, J.A. 2003. Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mtDNA variation and species delimitations. *Systematic Entomology*, **28(2)**: 257–273. doi:10.1046/j.1365-3113.2003.00212.x.

#### Article de revue avec URL:

Wahlberg, N., Oliveira, R., et Scott, J.A. 2003. Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mtDNA variation and species delimitations. *Systematic Entomology*, **28(2)**: 257–273. Disponible sur <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3113.2003.00212.x> [consulté le 28 octobre 2005].

#### Article de revue disponible en ligne seulement (avec DOI):

Lambshhead, P.J.D., Brown, C.J., Ferrero, T.J., Hawkins, L.E., Smith, C.R., et Mitchell, N.J. 2003. Biodiversity of nematode assemblages from the region of the Clarion–Clipperton Fracture Zone, an area of commercial mining interest [en ligne]. *BMC Ecology*, **3**:1. doi:10.1186/1472-6785-3-1.

#### Citation d'un site web:

Peck, S.B., et Newton, A.F. 2001. The leiodid beetles of Costa Rica [en ligne]. Disponible sur <http://www.inbio.ac.cr/papers/leiodidae/index.html> [consulté le 4 janvier 2006].

Ne pas faire référence à ses propres travaux non encore publiés sous la forme d'« article soumis » ou d'« article en préparation ». Il faut plutôt énoncer simplement les résultats trouvés. Ne pas inclure des « informations non publiées » ou des « communications personnelles » dans la liste bibliographique.

#### Tableaux

Le titre de chaque tableau doit être conforme aux normes de la revue quant à la ponctuation et l'usage des majuscules et doit expliquer clairement son contenu. Les tableaux doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes et regroupés à la fin du texte, **chacun sur une page séparée**. Les renvois au bas du tableau qui se retrouvent soit dans le titre, l'entête ou le contenu du tableau doivent être identifiés par un symbole typographique. Toute

information supplémentaire qui ne fait pas l'objet d'un renvoi particulier doit être mise en note sous le tableau plutôt que dans le titre du tableau.

#### **Titres des figures**

Les titres des figures doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes et dactylographiés à double interligne et en ordre à la fin du manuscrit, immédiatement avant les illustrations. Les titres doivent être compréhensibles sans référence au texte. **Les titres doivent être soumis séparément des illustrations.**

#### **Illustrations des manuscrits acceptés**

Les Presses scientifiques du CNRC, qui assurent la publication de *The Canadian Entomologist*, préfèrent recevoir la version électronique des illustrations des manuscrits acceptés et l'utiliseront dans la mesure du possible. Dans le cas des illustrations en couleur, il faut soumettre à la fois les fichiers électroniques et les copies papier. On trouvera une liste des formats acceptables à <http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/elegraph.html>. Indiquer le logiciel (et la version) et le système d'opération utilisés pour la réalisation de chaque figure.

Tous les fichiers en **couleurs** doivent être en format CMYK (cyan, magenta, jaune et noir). Le système graphique RGB (rouge, vert et bleu, des couleurs utilisées spécifiquement pour générer une image sur l'écran) ne permet pas une impression convenable. **Ne pas oublier** que plus le travail graphique est complexe, plus il y a de chances qu'il y ait un problème lors de la production. Éviter les textures et les ombrages complexes, particulièrement dans les programmes d'illustration vectorielle, car le résultat final risque d'être de mauvaise qualité. **Les illustrations en couleur augmentent significativement les coûts de publication par page.**

Les figures finales doivent entrer dans une (6,9 cm × 21,3 cm) ou deux (14,4 cm × 21,3 cm) colonnes et doivent être préparées en conséquence. Les figures soumises dans des fichiers TIFF, EPS ou BMP doivent être enregistrés dans leur taille finale (largeur d'une ou de deux colonnes). La résolution minimale doit être de 600 ppp (dpi) pour les dessins au trait et les lignes fines (les dessins au trait comportant des lignes fines ou un fond grisé), 300 ppp pour les demi-teintes et les couleurs et 600 ppp pour les combinaisons (*par ex.*, demi-teintes avec lettrage à l'extérieur de l'espace réservé à la photo).

L'épaisseur des lignes doit être suffisante (au moins 0,5 point) pour que la reproduction soit nette; tous les symboles, les indices supérieurs ou inférieurs et les signes décimaux doivent être en bonne proportion avec le reste du dessin et suffisamment marqués pour permettre la réduction nécessaire sans perte de détail. Ne pas utiliser de petits symboles ouverts qui ont tendance à se refermer lorsqu'ils sont reproduits. Le lettrage produit par imprimante à matrice de points, par machine à écrire ou à la main n'est pas acceptable. Le même style de police et la même dimension de lettrage doivent servir dans toutes les figures de dimensions semblables.

Tous les **termes, abréviations et symboles** (voir ci-haut) doivent correspondre à ceux du texte. Ne mettre que les informations essentielles et ajouter les détails dans le titre de la figure. **Les dessins au trait et les photomicrographies d'insectes doivent comporter une échelle de taille. Les cartes géographiques doivent contenir les latitudes et les longitudes (ou les coordonnées MTU/UTM — Mercator transverses universelles) et une échelle graphique.** Tous les noms d'endroits et les caractéristiques géographiques sur les cartes du Québec doivent être en français, avec les accents et les majuscules appropriés, à l'exception de ceux qui sont d'importance pancanadienne. Pour une liste complète de ces sites, voir p. 236–237 de *Le guide du rédacteur* (2<sup>e</sup> éd., 1996), publié par Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, Ottawa (Ontario), Canada K1A 0S5.

S'il n'est pas possible d'avoir des fichiers électroniques des figures, la version papier des figures sera digitalisée. On doit se rappeler que le lecteur optique copiera généralement les imperfections (*par ex.*, les taches de liquide de correction, les barbouillages). La soumission de photographies non en continu (en matrices de points) ou d'illustrations digitalisées et imprimées sur imprimante laser n'est pas recommandée. Les originaux ne doivent pas dépasser 200% de la largeur finale d'une ou deux colonnes, car toute réduction additionnelle risque de causer une perte de détails.

#### **Permission de réutiliser du matériel publié dans *The Canadian Entomologist***

Toute demande de publier à nouveau un article en tout ou en partie doit être adressée à la Société d'entomologie du Canada, 393 avenue Winston, Ottawa (Ontario), Canada K2A 1Y8 ([courriel:entsoc.can@bellnet.ca](mailto:courriel:entsoc.can@bellnet.ca)).

#### **Frais de publication**

Les articles qui paraissent dans *The Canadian Entomologist* comportent des frais de 35,00 \$ par page imprimée pour les auteurs qui sont membres de la Société; les manuscrits publiés par des auteurs dont aucun n'est membre de la Société comportent des frais additionnels de 10,00 \$ par page publiée. **Des frais additionnels associés à la publication d'illustrations en couleur seront chargés directement à l'auteur (contacter le Directeur scientifique en chef pour les frais courants).** Les illustrations en couleur sont à la charge entière des auteurs. Les chercheurs à la retraite et les entomologistes amateurs qui ne sont rattachés à aucune université ou institution officielle et qui devraient normalement payer les frais de publication eux-mêmes, mais qui sont dans l'impossibilité de le faire, peuvent demander de l'aide. **Seuls les membres de la Société d'entomologie du Canada sont éligibles à une**

**exemption des frais de publication; sans une demande d'exemption, les auteurs se rendent responsables des frais.** Les auteurs canadiens doivent inclure la TPS de 7% (n<sup>o</sup> commercial 10730 6003 RT 0001).

Les tirés-à-part se vendent sous forme de copies-papier en paquets de 50 ou sous forme de fichiers PDF pour diffusion par les auteurs, aux prix suivants (en dollars canadiens) :

Nombre de pages	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32	33-36
Copies-papier, premier paquet de 50	\$75	\$100	\$125	\$150	\$175	\$200	\$225	\$250	\$275
Copies-papier, chaque paquet additionnel	\$20	\$30	\$40	\$50	\$60	\$70	\$80	\$90	\$100
Fichiers PDF, sans copies-papier	\$65	\$90	\$115	\$140	\$165	\$190	\$215	\$240	\$265
50 copies-papier + PDF	\$100	\$135	\$170	\$205	\$240	\$275	\$310	\$345	\$380
100 copies-papier + PDF	\$120	\$165	\$210	\$255	\$300	\$345	\$390	\$435	\$480

Les auteurs qui désirent obtenir des tirés-à-part en copies-papier ou en format PDF, en plus de ceux qui ont été commandés par leur établissement, pourront profiter d'un rabais. Toutefois, un minimum de 50 tirés-à-part doit être acheté au plein prix avant que les auteurs n'aient droit à ce rabais. Les rabais sont variables et les auteurs sont priés de contacter la Société par courriel ([entsoc.can@bellnet.ca](mailto:entsoc.can@bellnet.ca)) au moment de passer leur commande de tirés-à-part pour connaître le montant exact du rabais.

Révisé en août 2007

## **ANNEXE 2**

# JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY

## Guide for Authors

The *Journal of Invertebrate Pathology* publishes articles on all aspects of original research concerned with the causation and manifestation (including immunologic responses) of infectious and noninfectious diseases of invertebrates, the suppression of such diseases in beneficial species, and the use of these pathogens in controlling undesirable species such as agricultural pests and vectors of pathogens transmissible to other organisms. In addition, this journal publishes the results of biochemical, physiological, morphological, genetic, and ecological studies related to the etiologic agents of diseases of invertebrates. The journal is particularly dedicated to the publication of contributions of a basic and fundamental nature, although it will accept suitable articles pertaining to the applications of invertebrate pathology. The editor-in-chief and members of the Editorial Board will examine contributions from any qualified worker in any country of the world.

## Submission of Manuscripts

It is a condition of publication that all manuscripts must be written in clear and grammatical English and be submitted to the *Journal of Invertebrate Pathology* Web site at <http://ees.elsevier.com/jip>. Minimal exceptions will be allowed. Authors who are unable to provide an electronic version should contact the Editorial Office prior to submission [e-mail: [jip@elsevier.com](mailto:jip@elsevier.com); telephone: (619) 699-6538; or fax: (619) 699-6859].

The accompanying letter should be in Word (.doc) format and should outline the basic findings of the paper and their significance. **Authors are also asked to suggest the names (along with e-mail addresses) of three to five potential reviewers.**

For revised papers, please include a letter (.doc) to the Editor indicating changes to the manuscript, an editable file (a Word document is preferred) for text and tables, .tif or .eps files for all artwork.

There are no submission fees or page charges.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in *Journal of Invertebrate Pathology* will be immediately returned to the authors, without detailed review.

*English language help service:* Authors who are not sure of proper English usage must have their manuscripts checked by one or more persons proficient in English. Failure to use proper English can result in a manuscript being rejected without review. For a list of providers of English editing services, please refer to

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see ). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided after acceptance.

If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com).

**US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.** Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com)) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

The *Journal of Invertebrate Pathology* publishes the following types of articles:

*Regular Articles.* Manuscripts for Regular Articles are full-length papers the reports the results of a large and well-defined study. There is no page limit, but this type of article is usually in the range of eight published pages.

*Short Communications.* Manuscripts for Short Communications should be 1500 or fewer words and contain not more than two illustrations or two tables, or one of each. Manuscripts should contain an abstract of not more than 100 words. References should be kept to a minimum and should be styled according to the guidelines in the section on References.

*Minireviews.* Manuscripts for Minireviews typically range from four to six published pages and provide a succinct review of important and recent developments in any field of invertebrate pathology.

*Forum Articles.* Manuscripts for Forum Articles typically range from one to four published pages and focus on a topical issue in invertebrate pathology. It is the intent of Forum Articles to stimulate discussion of controversial or unresolved issues relevant to all aspects of invertebrate pathology.

### **Preparation of Manuscripts**

Manuscripts should be double-spaced throughout, and a line-numbering program should be used so that all lines on all pages bear consecutive numbers. With respect to style, a useful writing guide is the latest edition of the CBE Style Manual, published by the Council of Biology Editors. This manual should also be used as a guide to most abbreviations employed. Proprietary substances and trade names must be accompanied (at the first mention) by the chemical name. Pages should be numbered consecutively and organized as follows:

The **Title Page** (p. 1) should contain the article title, authors' names and complete affiliations, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence (including e-mail address and telephone and fax numbers).

The **Abstract** (p. 2) must be a single paragraph that summarizes the main findings of the paper in less than 250 words. After the abstract a list of up to 10 **keywords** that will be useful for indexing or searching should be included. The keywords should include the taxonomic designations of organisms, both host and pathogen(s), mentioned in the text and the major subject matter, e.g., castration, parasitic; biological control; or nuclear polyhedrosis virus, pathogenicity of. The names of enzymes, substrates, and other important compounds should also appear in the list of keywords.

The **Introduction** should be as concise as possible, without subheadings.

**Materials and methods** should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

**Results and Discussion** may be combined and may be organized into subheadings.

**Acknowledgments** should be brief and should precede the references.

**References** should be cited in the text by name and date. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. The names of journals should be abbreviated according to *Chemical Abstracts Service Source Index*. Please use the following style:

Becnel, J.J., 1997. Complementary techniques: preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, pp. 337-353.

Schneider, M., Dorn, A., 2001. Differential infectivity of two *Pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera). *J. Invertebr. Pathol.* 78, 135-140.

Tanada, Y., 1992. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.

**Figures.** Number figures consecutively with Arabic numerals. Please visit our Web site at for detailed instructions on preparing electronic artwork.

In composing photographic illustrations such as micrographs, especially where multiple micrographs are presented, figures should be composed as plates that combine two or more illustrations per figure. The width of these plates should be composed so that they are equal to either one or two columns of a journal page.

Illustrations in **color** in the printed issue can be accepted only if the authors defray the cost. However, if together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

Please note: Because of technical complications that can arise in converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the color illustrations.

**Tables** should be numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and with essential footnotes below.

**Nomenclature.** Binomial Latin names should be used in accordance with International Rules of Nomenclature. The first time a binomial is used, it should be fully spelled out. In papers largely taxonomic in nature the names (fully spelled out) of the authors of the scientific names should be used. Otherwise, the names of authors should be omitted.

**Identification of Pathogens.** Pathogens should be identified using current methods accepted for each pathogen group. Molecular methods should be used to identify pathogens being described for the first time where these methods are standard for the field.

### **Preparation of Supplementary Material**

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer additional possibilities for publishing supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, and more. Supplementary files supplied will be



published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). To ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Please note, however, that supplementary material will not appear in the printed journal.

### **Proofs**

PDF proofs will be e-mailed to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly.

[www.elsevier.com/locate/languagepolishing](http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing)

<http://www.elsevier.com/authorsrights> <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

