

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES LIGNEUX ET DES GRANDES CULTURES, UPRES EA 1207

**THÈSE** présentée par :

**Sophie POINTEAU**

soutenue le : **20 12 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Physiologie et biologie des organismes et des populations - Interactions

Spécialité : Biologie Forestière

**Interactions peuplier - puceron lanigère  
(*Phloeomyzus passerinii* (Sign.))  
et processus à l'origine de l'émergence et de l'expansion  
des pullulations**



**THÈSE dirigée par :**

**M. François LIEUTIER**

Professeur, Université d'Orléans

**Co-encadrée par :**

**Mme Stéphanie BANKHEAD-DRONNET**

Maître de conférences, Université d'Orléans

**RAPPORTEURS :**

**M. Philippe GIORDANENGO**

Professeur, Université de Picardie Jules Verne

**M. Jean-Christophe SIMON**

Directeur de recherche, INRA Rennes

**JURY :**

**M. Jean-Christophe SIMON**

Directeur de recherche, INRA Rennes, Président du jury

**Mme Stéphanie BANKHEAD-DRONNET**

Maître de conférences, Université d'Orléans

**M. Olivier BAUBET**

Directeur, Pôle interrégional DSF Massif central

**M. Thomas BOIVIN**

Chargé de Recherche, INRA Avignon

**M. Philippe GIORDANENGO**

Professeur, Université de Picardie Jules Verne

**M. François LIEUTIER**

Professeur, Université d'Orléans



**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES LIGNEUX ET DES GRANDES CULTURES, UPRES EA 1207

**THÈSE** présentée par :

**Sophie POINTEAU**

soutenue le : **20 12 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Physiologie et biologie des organismes et des populations - Interactions

Spécialité : Biologie Forestière

**Interactions peuplier - puceron lanigère  
(*Phloeomyzus passerinii* (Sign.))  
et processus à l'origine de l'émergence et de l'expansion  
des pullulations**



**THÈSE dirigée par :**

**M. François LIEUTIER**

Professeur, Université d'Orléans

**Co-encadrée par :**

**Mme Stéphanie BANKHEAD-DRONNET**

Maître de conférences, Université d'Orléans

**RAPPORTEURS :**

**M. Philippe GIORDANENGO**

Professeur, Université de Picardie Jules Verne

**M. Jean-Christophe SIMON**

Directeur de recherche, INRA Rennes

**JURY :**

**M. Jean-Christophe SIMON**

Directeur de recherche, INRA Rennes, Président du jury

**Mme Stéphanie BANKHEAD-DRONNET**

Maître de conférences, Université d'Orléans

**M. Olivier BAUBET**

Directeur, Pôle interrégional DSF Massif central

**M. Thomas BOIVIN**

Chargé de Recherche, INRA Avignon

**M. Philippe GIORDANENGO**

Professeur, Université de Picardie Jules Verne

**M. François LIEUTIER**

Professeur, Université d'Orléans



## **Remerciements**

Mes remerciements vont tout d'abord à mes rapporteurs **Philippe Giordanengo** et **Jean-Christophe Simon**, ainsi qu'à **Thomas Boivin** et **Olivier Baubet** pour avoir accepté de lire et juger ce travail et pour l'intérêt qu'ils lui ont porté.

Je remercie également **Francis Delmotte** pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (Université d'Orléans) et **Franck Brignolas** pour son implication, ses encouragements et son attention envers le bon déroulement de mon travail depuis sa nomination en tant que directeur du laboratoire.

**Je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué au bon déroulement et à l'évolution de cette thèse :**

Je remercie vivement **François Lieutier**, mon directeur de thèse, et **Stéphanie Bankhead-Dronnet** qui a co-encadré cette thèse.

François, merci de m'avoir accueillie au sein de l'équipe Entomologie Forestière du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, d'abord en Master 1 ... puis 2, où j'ai d'abord eu la joie et l'honneur de partager ton intérêt pour les scolytes. Merci de m'avoir proposé ensuite ce sujet de thèse me permettant de mettre un pied dans le monde des pucerons. Tes conseils et tes encouragements m'ont permis d'évoluer dans mes recherches et surtout je sais maintenant qu'il y a 24h dans une journée !!! Je n'oublierai pas non plus les séjours en colloques, surtout à Fribourg où j'ai vraiment appris à te connaître et à apprécier ton humour!

Fanny, merci de m'avoir suivie, soutenue et encouragée depuis mon arrivée en Master et de m'avoir fait partager ton expérience dans les analyses de génétique des populations. Ton optimisme a été un vrai moteur et ta gentillesse et ta bienveillance m'ont toujours beaucoup touchée. Je tiens à te dire que je suis heureuse et fière d'avoir été ta première étudiante en thèse. Tu m'as toujours dit « tu feras une super thèse », j'espère que maintenant l'hypothèse se vérifie!!

Parmi les membres de l'équipe Entomologie forestière, je tiens tout d'abord à remercier **Aurélien Sallé** (alias tête d'œuf) pour son investissement dans ce travail de thèse. Merci pour ta disponibilité, ton aide et tes nombreux conseils dans les manips, mais également pour tes nombreuses relectures (pardon encore pour mon anglais ... et mon français !), sans oublier tous les bons moments passés au labo et nos grandes discussions scientifiques (ou non) qui m'ont été très profitables. La franchise de tes remarques ainsi que ta capacité d'écoute m'ont vraiment permis d'avancer et d'évoluer.

Merci à **Jean-Claude Vala** (notre « mouchologue ») pour ses conseils et pour m'avoir accompagnée de nombreuses fois sur le terrain afin d'échantillonner les pucerons. J'ai beaucoup apprécié nos « couscous du midi » en tête-à-tête et notre visite forcée des Pays de la Loire après une sortie d'autoroute ratée!! Je te remercie aussi pour m'avoir donné le seul 20/20 de mon cursus universitaire en biologie animale ! A titre plus personnel, je n'oublierai pas toute l'attention que tu m'as portée depuis mon arrivée en thèse ainsi que cette découverte de la mangrove de Guadeloupe un peu privilégiée je l'avoue. Et surtout chose importante, grâce à toi je sais maintenant que « Fò par zòt confon' coco é pi zabrico. Coco tini dlo, zabrico tini grenn !! ».

**France Dardeau** (alias France pseudo-galle), nous n'avons partagé qu'un an le même bureau, mais tes petites attentions quotidiennes m'ont beaucoup touchée. Je te confie mon euphorbe pour que tu veilles à ce qu'Aurélien ne finisse pas par en faire un sapin de Noël !!

Merci également à **Xavier Pineau**, **Carine Martin** et **Alain Guichard** pour leur implication et leur aide dans les manips. Xavier, ton petit côté « MacGyver » m'a beaucoup aidée et ta connaissance des insectes m'a été d'une aide précieuse, surtout pour les TP biodiv. Te souviens-tu ce jour où nous nous sommes débarrassés discrètement de la cuisse de sanglier ?!!! Je pense que tu sais de quoi je veux parler... Alain je garde aussi en mémoire nos « rempotages de I214 !... Quelle galère ! »

**Gilles Moreau** « Gillou » qui m'a vraiment beaucoup aidée lors de mes nombreux problèmes de salle d'élevage. Ton aide m'a évité de gros soucis de manip.

Merci à tous les stagiaires pour leur contribution dans l'avancée de mes recherches. **Vincent Lesieur** (mon p'tit Vincent) pour les bons moments passés au labo : ah !! toi et ton humour incomparable... Sans oublier **Salih Aazouz**, **Elodie Deprost**, **Daphné Virfollet** et **David De Feraudy**.

Je tiens également à remercier tous les membres du Laboratoire de Biologie des Entomophages (Université de Picardie Jules Verne, Amiens) pour leur accueil et leur gentillesse et pour tous les bons moments que j'ai pu passer avec vous lors de mes séjours Amiénois ou bien en colloque. **Philippe Giordanengo** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. **Arnaud Ameline**, ton aide et tes conseils ont contribué au développement de mes recherches. **Anas Cherqui**, **Sébastien Boquel** et **Aude Couty** pour leur aide, leurs conseils et leur gentillesse.

**Yvan Rahbé** du Laboratoire de Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions (BF2I INRA, Lyon) pour ses nombreux conseils et son enthousiasme vis-à-vis de mes recherches, ce qui m'a beaucoup encouragée.

Mes remerciements vont également aux membres de l'INRA d'Orléans qui m'ont suivie depuis mes débuts en Master et pendant ma thèse.

Les membres de l'Unité de Zoologie Forestière. **Géraldine Roux-Morabito** grâce à qui j'ai mis un premier pied dans le monde de la recherche en me permettant de réaliser mon premier stage de master 1. **Jérôme Rousselet** pour tes explications si détaillées et si passionnantes de la génétique. Je ne me lasserai jamais de nos discussions. **Emmanuelle Magnoux** pour avoir été toujours disponible et à l'écoute lorsque j'ai dû développer les marqueurs microsatellites et pour le temps consacré à t'occuper de mes séquences. **Francis Goussard** pour avoir sacrifié de nombreux week-ends afin que je puisse mener mes expérimentations. **Christelle Robinet**, pour son aide lorsque j'ai dû mettre au point la modélisation.

Les membres de l'Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, **Françoise Laurans** et **Alain Moreau** pour leur enseignement des joies et des labeurs de l'histologie végétale.

Enfin, merci à **Patrick Poursat** de l'Unité de Génétique et Biomasse Forestière qui m'a permis de sauver « ma manip 15°C » lorsque la chambre d'élevage m'a lâchée en zoo.

**Sylvain Pincebourde** de l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (Université François Rabelais, CNRS, Tours) pour avoir toujours répondu présent lorsque j'avais besoin d'un conseil.

**Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont partagé de près ou de loin mon quotidien pendant ces années de thèse (et de master)**

**Coralie Bertheau** qui m'a fait confiance pendant mes stages de master et qui m'a initiée à la biologie moléculaire. Tu as toujours été à l'écoute et je te suis très reconnaissante de ta gentillesse et tes nombreux conseils concernant la recherche et l'enseignement. De plus, grâce à toi j'ai pu découvrir les joies du terrain en forêt et du piégeage de scolytes .....et des tiques....

Je remercie aussi tous les anciens thésards du labo pour les moments inoubliables passés ensemble : **Bruno** (Broun's) mon voisin de bureau avec qui j'ai pu partager nos craquages de 16h et de vrais moments de rigolade, ainsi que **Fotini**, **Marie-Véronique**, **Thomas** et **Ludo**.

Merci à mon amie **Françoise Chedfor** (ma p'tite framboise), d'une part pour les nombreux conseils en biologie moléculaire et pour ton soutien, et d'autre part pour avoir partagé nos passions communes... vive le sport et les cochons d'Inde. Ne t'inquiète pas je n'oublierai pas Groseille et Kiwi.

**François Héricourt** qui a toujours su me donner de bons conseils en bio mol et me remonter le moral dans les moments un peu difficiles. Sache que ton soutien a été très important pour moi. **Domenico Morabito** (alias 'Joyeux Noël') qui ne se souvient même plus que c'est une de ses remarques en TP ...un jour... qui m'a vraiment permis de comprendre que je voulais faire ce métier. Et puis Dom tes petites taquineries quotidiennes vont bien me manquer (au fait je te l'avoue ...c'était

bien la Suède !). Je tenais également à remercier **Muriel Feinart-Duranceau** qui a toujours été à l'écoute. Merci à ma p'tite **Lulu** et à **Sabine** pour leur joie et leur bonne humeur quotidienne qui permettent d'avoir un rayon de soleil permanent au labo, même en hiver... Merci à **Claire Hébrard** et **Clément Lafon-Placette** qui ont toujours été disponibles pour répondre à mes questions et pour m'aider en bio mol. **Daniel Auguin** pour ton humour et ton aide précieuse dans le « bidouillage » de dernière minute de mes figures d'article. Heureusement que tu étais là !! Maintenant les logiciels de traitement d'image et de PDF n'ont plus de secrets pour moi. Merci enfin à **Cécile Barbaroux**, **Christiane Depierreux**, **Sylvain Chamillard** mon collègue de promo, **Sylvain Bourgerie**, **Stéphane Maury** et **Laurent Jean-Alphonse** pour les bons moments passés au labo.

### **Un grand merci à ma famille**

Merci à **mon père** et **ma mère** qui m'ont beaucoup aidée et soutenue depuis mes débuts à l'université, euh... non depuis la maternelle.

**Dimitri** de m'avoir supportée pendant ces années de fac et surtout de thèse. Merci pour ta patience lorsque j'ai dû passer la plupart de mon temps devant mon ordinateur qui était devenu mon principal interlocuteur.

Ma p'tite **Touity** pour avoir été le meilleur anti-stress que je connaisse.

Merci enfin à ma sœur **Caroline** et mon frère **Hugo** à qui je dédie cette thèse.



À Caroline & Hugo,



# Table des matières

---

<b>Introduction générale</b>	13
<b>1. EMERGENCES D'INSECTES RAVAGEURS INDIGENES EN MILIEU FORESTIER</b>	15
1.1. Principales causes	15
1.2. Cas des pucerons	17
<b>2. ÉMERGENCE D'UN PUCERON RAVAGEUR INDIGENE SUR PEUPLIER</b>	17
2.1. Historique des infestations	17
2.2. Description des dégâts	19
2.3. Moyens actuels de lutte	20
<b>3. QUELLES HYPOTHESES POUR EXPLIQUER L'ÉMERGENCE ET L'EXPANSION DES POPULATIONS DE <i>P. PASSERINII</i> ?</b>	21
3.1. Facteurs environnementaux biotiques	21
3.1.1. Niveau de résistance des peuplements forestiers	21
3.1.1.1. <i>Impact des contraintes abiotiques sur la résistance des arbres</i>	21
3.1.1.2. <i>Impact des pratiques sylvicoles</i>	22
3.1.2. Prédation et parasitisme	23
3.2. Les modifications climatiques	24
3.2.1. Impacts directs sur les insectes	24
3.2.2. Impacts indirects via l'arbre hôte	25
3.2.3. Impacts sur les régimes de pullulation d'insectes	26
3.3. Caractéristiques génétiques des populations	27
3.3.1. Variabilité génétique et arbre hôte	27
3.3.2. Variabilité génétique, cycle de vie et climat	28
3.3.3. Variabilité génétique et dispersion	29
<b>4. PROBLEMATIQUE &amp; OBJECTIFS DE LA THESE</b>	30
4.1. Problématique	30
4.2. Objectifs et structure de la thèse	31
<b>Chapitre I. Synthèse bibliographique</b>	33
<b>Partie 1. Les pucerons des arbres</b>	35
<b>1.1. BIOLOGIE DES PUCERONS DES ARBRES</b>	37
1.1.1. Cycle de vie	38
1.1.1.1. <i>Généralités sur la stratégie de reproduction</i>	38
1.1.1.2. <i>Place de l'hôte ligneux dans le cycle de vie</i>	39
1.1.2. Spécialisation à l'arbre hôte	40
1.1.3. Adaptation à la saisonnalité de l'arbre hôte	41
1.1.4. Dynamique des populations	41
1.1.5. Mode d'alimentation et adaptations associées	42
<b>1.2. LES INTERACTIONS ARBRES-PUCERONS</b>	45
1.2.1. Etapes de la sélection et de la colonisation de la plante hôte	45
1.2.1.1. <i>Localisation de l'arbre hôte</i>	46
1.2.1.2. <i>Sélection du site d'alimentation</i>	46
1.2.1.3. <i>Acceptation de l'arbre hôte</i>	48
1.2.2. Mécanismes de résistance affectant le processus de colonisation	49
1.2.2.1. <i>La qualité nutritionnelle de l'arbre</i>	50
1.2.2.2. <i>Les mécanismes de résistance des parties non lignifiées</i>	50
1.2.2.3. <i>Les mécanismes de résistance des parties lignifiées</i>	51

<b>1.3. ROLE DES PUCERONS DANS L'ECOSYSTEME FORESTIER</b>	53
1.3.1. Interactions mutualistes arbres-pucerons	53
1.3.2. Dégâts occasionnés par les pucerons en milieu forestier	53
1.3.2.1. Dégâts asymptomatiques	54
1.3.2.2. Dégâts symptomatiques	55
<b>1.4. CONCLUSION</b>	56

## **Partie 2. Le système biologique étudié** 57

<b>2.1. PEUPLIER ET INSECTES ASSOCIES</b>	59
2.1.1. Peuplier et populiculture	59
2.1.2. Problèmes entomologiques du peuplier	62
2.1.3. Mécanismes de résistance du peuplier aux insectes	62
2.1.3.1. Mécanismes de défense constitutifs	63
2.1.3.2. Mécanismes de défense induits	64
2.1.3.3. Phénologie de l'arbre	65
<b>2.2. LE PUCERON LANIGERE DU PEUPLIER, <i>Phloeomyzus passerinii</i></b>	66
2.2.1. Une sous-famille, un genre et une seule espèce	66
2.2.2. Identification taxonomique : singularité des caractères morphologiques	66
2.2.3. Position systématique : une histoire ponctuée d'interrogation...	68
2.2.3.1. Reconstructions phylogénétiques basées sur la morphologie	68
2.2.3.2. Reconstructions phylogénétiques basées sur les caractères génétiques	69
2.2.4. Distribution géographique et arbres hôtes	70
2.2.5. Cycle de vie de <i>Phloeomyzus passerinii</i>	72
2.2.5.1. Stades de développement	72
2.2.5.2. Déroulement du cycle de vie	72
2.2.5.3. Modes de dispersion	74
2.2.6. Alimentation du puceron	74
2.2.7. Ennemis naturels	75
<b>2.3. CONCLUSION</b>	75

## **Chapitre II. Mode d'alimentation & position systématique** 77

<b>1. PRESENTATION DE L'ETUDE</b>	79
<b>2. MODE D'ALIMENTATION DE <i>P. PASSERINII</i></b>	79
Présentation de l'article n°1 et principaux résultats	79
ARTICLE N°1	83
<b>3. ETUDE PHYLOGENETIQUE ET EVOLUTION DES MODES D'ALIMENTATION CHEZ LES APHIDIDAE</b>	103
3.1. Introduction	103
3.2. Matériels & Méthodes	104
3.3. Résultats	104
3.4. Discussion	104

## **Chapitre III. Effets de la résistance du peuplier sur le puceron lanigère** 109

<b>1. PRESENTATION DE L'ETUDE</b>	111
<b>2. EFFET DE LA RESISTANCE SUR LES PERFORMANCES DE <i>P. PASSERINII</i></b>	112
Présentation de l'article n°2 et principaux résultats	112
ARTICLE N°2	115
<b>3. CARACTERISATION DE L'ANTIBIOSE ET DE L'ANTIXENOSE</b>	126
Présentation de l'article n°3 et principaux résultats	126
ARTICLE N°3	127

<b>Chapitre IV. Facteurs conditionnant l'émergence et l'expansion des pullulations</b>	143
<b>1. PRESENTATION DE L'ETUDE</b>	145
<b>2. ROLE DE LA TEMPERATURE &amp; DE L'ARBRE HOTE</b>	146
Présentation de l'article n°4 et principaux résultats	146
ARTICLE N°4	149
<b>3. ETUDE GENETIQUE DES POPULATIONS DE <i>P. PASSERINII</i></b>	173
3.1. Choix des marqueurs génétiques moléculaires	175
3.2. Caractérisation de loci microsatellites chez <i>P. passerinii</i>	178
Présentation de l'article n°5 et principaux résultats	178
ARTICLE N°5	183
3.3. Structure génétique des populations de <i>P. passerinii</i>	190
Présentation de l'article n°6 en préparation et résultats préliminaires	190
ARTICLE N°6	196
<b>Conclusion générale</b>	220
<b>Références bibliographiques</b>	232
<b>Annexes</b>	260



# Introduction générale

---



## 1. EMERGENCES D'INSECTES RAVAGEURS INDIGENES EN MILIEU FORESTIER

Face aux changements environnementaux d'origine anthropique, les problèmes liés aux pullulations d'insectes dans les écosystèmes forestiers sont devenus plus fréquents et leur impact économique et écologique s'est considérablement accru (Barbosa & Schaefer 1997 ; Day & Leather 1997 ; Speight 1997 ; Dale et al. 2001 ; Paine 2006). Les populations de certains insectes ravageurs<sup>1</sup> atteignent plus fréquemment ou de manière plus intense des niveaux épidémiques ou étendent les limites de leur aire géographique naturelle. C'est le cas par exemple des pullulations exceptionnelles en grandeur et en durée du dendroctone du pin, *Dendroctonus ponderosae* (Hopkins) (Coleoptera) en Amérique du Nord, avec 18 millions d'ha de forêt de pins détruits (Safranyik & Wilson 2006 ; Carroll et al. 2006 ; Safranyik et al. 2010). L'espèce, à l'origine cantonnée à l'ouest des montagnes rocheuses, s'est récemment établie à l'est grâce à l'augmentation des températures hivernale et estivale et menace maintenant toute la forêt boréale nord américaine (Carroll et al. 2006 ; Safranyik et al. 2010). De même en France, le décalage de la limite septentrionale et altitudinale de l'aire de distribution de la processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera) est attribué à l'augmentation des températures hivernales et à la diminution de la fragmentation des forêts de pins (Battisti et al. 2005 ; Robinet et al. 2007). De plus, au cours des deux derniers siècles, l'introduction intentionnelle ou accidentelle d'insectes non-indigènes, facilitée par l'intensification des échanges internationaux, a largement contribué à l'émergence de nouveaux insectes ravageurs forestiers (Liebhold et al. 1995 ; Paine 2006 ; Sakai et al. 2001 ; Mattson et al. 2007). En confrontant les insectes à de nouvelles ressources et de nouveaux habitats, ces introductions accidentelles, comme celles résultant de l'extension "naturelle" d'espèces favorisées par les changements climatiques, conduisent à de nouvelles interactions au sein des écosystèmes offrant à ces insectes la possibilité d'étendre leur gamme d'hôte et parfois de devenir des espèces invasives d'intérêt économique. Enfin, durant la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses espèces d'insectes indigènes (e.g. *Operophtera brumata* (L.) (Lepidoptera) en Europe ou *Enaphalodes rufulus* (Haldeman) (Coleoptera) aux Etats-Unis) ont atteint le statut de ravageurs forestiers (Day & Leather 1997 ; Stephen et al. 2003).

### 1.1. Principales causes

La majorité des insectes indigènes dans les écosystèmes forestiers se caractérisent par de bas niveaux de populations faiblement fluctuants, et maintenus en dessous du seuil de tolérance par des facteurs naturels de régulation, tels que la disponibilité et la qualité de l'arbre hôte, les ennemis

---

<sup>1</sup> Ravageur : concept anthropocentrique qui qualifie les insectes dont l'activité entre en conflit avec les intérêts et les besoins humains, par exemple en portant atteinte aux bénéfices d'une production forestière

naturels et les conditions climatiques. Ces espèces indigènes constituent toutefois un réservoir d'espèces susceptibles d'atteindre le statut de ravageur dans le cas où l'efficacité des facteurs de régulation faiblirait. Les modifications environnementales d'origine anthropique peuvent conduire à une telle situation, en modifiant les interactions biotiques et donc le fonctionnement des écosystèmes forestiers. Au cours des 30 dernières années, plusieurs espèces d'insectes indigènes ont ainsi atteint le statut de ravageur suite au développement des plantations monoclonales d'arbres exotiques, souvent associées à des sols mal adaptés ou à un déficit en ennemis naturels (Watt et al. 1997 ; Paine 2006). C'est le cas par exemple de deux espèces de Lépidoptères indigènes de Grande Bretagne, *Panolis flammea* (Denis & Schiffermüller) et *Operophtera brumata* (L.), qui sont devenues d'importants ravageurs des plantations d'essences introduites comme *Pinus contorta* ((Dougl.) Loud.) et *Picea sitchensis* ((Bong.) Carr.) (Stoakley 1985 ; Watt & Leather 1988 ; Kerslake et al. 1996). Les insectes indigènes peuvent également devenir ravageurs d'essences autochtones, suite par exemple à des pratiques sylvicoles conduisant à une altération des niveaux de résistance et à une abondance croissante de l'arbre hôte, surtout quand ces actions se doublent de problèmes climatiques. Ainsi, des sécheresses intenses, l'abondance et l'âge des chênes rouges (*Quercus rubra* L.), liés aux pratiques sylvicoles employées dans les montagnes Ozark de l'Arkansas a engendré des pullulations sans précédent du coléoptère *Enaphalodes rufulus* (Haldeman), auparavant endémique (Stephen et al. 2003). De même, l'élagage du pin maritime, *Pinus pinaster* Ait., dans les plantations forestières des Landes favorise la vigueur des arbres et crée des blessures de l'écorce qui augmentent l'attractivité des pins vis-à-vis du lépidoptère, *Dioryctria sylvestrella* Ratzeburg (Jactel et al. 1994, 1996). La possibilité d'atteindre le statut de ravageur suite à des modifications environnementales dépend cependant de la sensibilité de l'espèce aux changements en question et donc de sa physiologie et plus généralement de sa biologie (Bale et al. 2002).

Notons aussi toutefois l'existence de quelques espèces indigènes se caractérisant par des pullulations naturelles cycliques (e.g. tordeuse grise du mélèze, *Zeiraphera diniana* Guénéé (Lepidoptera)) ou éruptives (e.g. typographe, *Ips typographus* L. (Coleoptera)) qui dépassent périodiquement ou occasionnellement, hors interventions humaines, le seuil de tolérance et constituent les principaux éléments des perturbations naturelles structurant les écosystèmes forestiers (Ayres & Lombardero 2000 ; Dale et al. 2000 ; Frelich 2002 ; Esper et al. 2007). Les fluctuations cycliques sont principalement régulées par les interactions trophiques (Berryman 2002 ; Esper et al. 2007), tandis que celle des espèces éruptives sont souvent déclenchées par des événements climatiques exceptionnels (e.g. sécheresses, tempêtes) entraînant à la fois un accroissement rapide des populations et une baisse du niveau de résistance des arbres, comme c'est le cas pour les scolytes (Annala 1969 ; Chararas 1979 ; Bakke 1983).

## 1.2. Cas des pucerons

Comme chez les autres insectes, la croissance des populations de pucerons (Hemiptera) est fortement influencée par la qualité de la plante hôte et les facteurs abiotiques, en particulier la température (Bale et al. 2007). Toutefois, les pucerons possèdent de nombreuses caractéristiques biologiques spécifiques qui les rendent particulièrement bien adaptés et sensibles aux modifications des conditions environnementales. La présence d'une reproduction parthénogénétique, en contribuant à réduire la durée de génération et à accroître le taux de reproduction (Dixon 1998), leur permet d'atteindre un grand nombre de générations chaque année et de croître rapidement quand les conditions leur sont favorables. Ils possèdent aussi un cycle de vie très flexible caractérisé par la présence de morphes variés leur permettant de varier leur comportement et leur physiologie en fonction de l'environnement. En outre, ils partagent l'investissement de la ressource énergétique entre la reproduction parthénogénétique (conditions favorables) et la dispersion et/ou la reproduction sexuée (aîlés sexués et parthénogénétiques) en cas de dégradation des conditions (i.e. surpopulation ou arrivée de l'hiver) (Moran 1992). Dans ces conditions, la sensibilité et les capacités adaptatives des pucerons face aux facteurs de l'environnement peuvent-elles conduire certaines espèces indigènes à devenir des ravageurs en milieu forestier ?

Les pucerons sont surtout connus pour les pertes économiques qu'ils occasionnent aux cultures et aux essences ligneuses des vergers, conduisant à de sérieux impacts sur la production mondiale de nourriture. Une centaine d'espèces d'Aphididae coûte des millions de dollars chaque année à l'agriculture avec des pertes variables selon les pays et les espèces de puceron (Blackman & Eastop 2007). Aux Etats-Unis, les pertes annuelles attribuables au puceron russe du blé, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) ont été estimées à 200 millions de dollars (Tatchell 1991). En revanche, très peu d'espèces de pucerons forestiers ont atteint le statut de ravageur. Les dommages en milieu forestier résultent essentiellement d'introductions aboutissant à la constitution de nouvelles associations : espèces introduites s'acclimatant sur essences autochtones ou espèces indigènes s'installant sur essences exotiques introduites (Blackman & Eastop 1994).

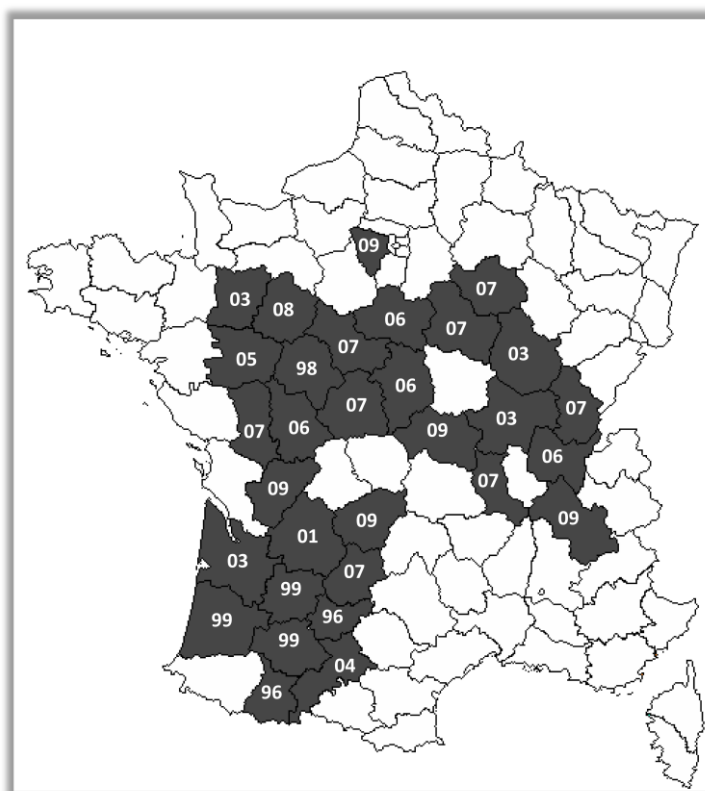
## 2. EMERGENCE D'UN PUCERON RAVAGEUR INDIGENE SUR PEUPLIER

### 2.1. Historique des infestations

Le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) est une espèce indigène de la zone paléarctique dont les espèces hôtes appartiennent au genre *Populus*. Des pullulations inhabituelles de cet insecte ont été recensées depuis les années 1930. En Italie, les premiers dégâts

furent observés en 1934 dans le Piémont (Della Beffa 1936) puis, à partir des années 1980, une recrudescence de dégâts fut rapportée, avec une périodicité d'environ deux ans (Lapietra & Allegro 1990). L'Espagne fut touchée en 1940, puis en 1967 et 1970 (Aparisi 1971). Au Moyen-Orient, les premières pullulations furent signalées dans les années 1980 en Iran (Rajabi Mazhar et al. 2003 ; Karahroodi et al. 2006 ; Sadeghi et al. 2007 ; Rajabi Mazhar et al. 2008). Dans tous ces pays, *P. passerinii* est considéré comme le principal insecte ravageur des peupleraies.

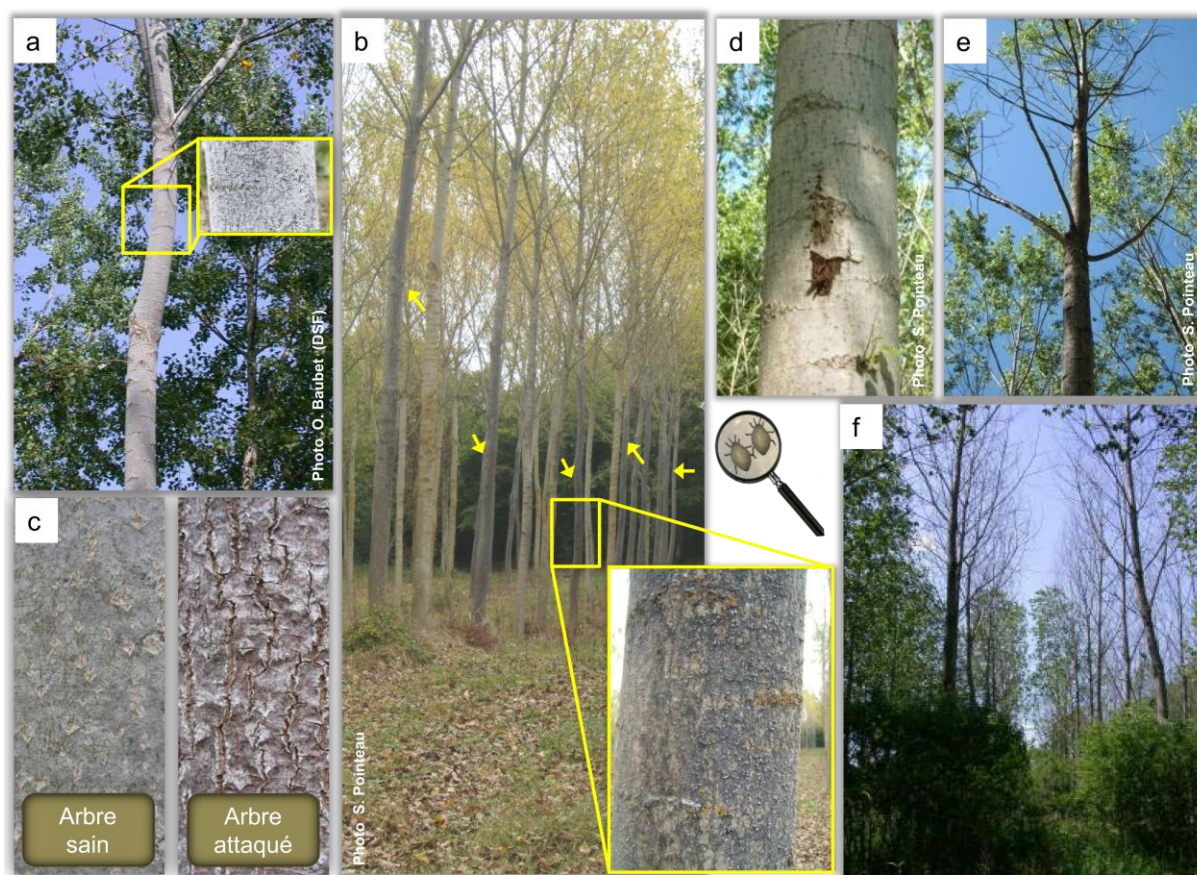
La présence du puceron lanigère du peuplier dans les peupleraies françaises est signalée depuis 1939. Toutefois, les premiers dégâts ne sont apparus dans le Sud-Ouest de la France qu'en 1996, avec des pullulations se répétant selon un rythme bisannuel jusqu'en 2003, date à laquelle on note une colonisation généralisée de la vallée de la Garonne (Maugard 1996 ; Maugard & Baubet 2004) (Fig. 1). A partir de 2003, les infestations se sont étendues à la Bourgogne avec des dommages importants principalement en 2003 et 2004. Après une détection ponctuelle en 1998 (Indre et Loire) et 2003 (Sarthe), elles se sont étendues aux Pays de la Loire et à la région Centre au cours de l'année 2006 (Baubet 2007). La suite a été marquée par une pullulation généralisée sur l'ensemble des régions déjà touchées et une extension des dégâts à huit nouveaux départements en 2007 et cinq en 2009 (Baubet & Carouille 2009). Les pullulations les plus sévères ont été celles de l'année 2007, qui ont causé la destruction de la quasi-totalité de certaines parcelles (Paillassa 2009).



**Fig. 1** Départements français actuellement infestés par le puceron lanigère du peuplier. Les deux derniers chiffres de l'année de première détection des dégâts sont mentionnés pour chaque département (d'après Baubet & Goudet 2010 (Département Santé des Forêts))

## 2.2. Description des dégâts

Della Beffa (1936) rédigea la première monographie sur l'espèce et réalisa une étude détaillée du type de dégâts, mentionnant que les pullulations pouvaient être particulièrement dévastatrices en Italie. *P. passerinii* est un ravageur primaire<sup>2</sup> qui semble s'attaquer à des arbres situés sur des stations riches et bien drainées. Les arbres attaqués ont un âge supérieur à 6 – 7 ans correspondant généralement à la fermeture des peuplements (circonférence voisine de 90 cm). Les infestations tendent à se localiser à l'intérieur des peuplements, délaissant les arbres de lisière (DSF 2006), et des facteurs tels que température élevée, forte hygrométrie et faible luminosité semblent favoriser le développement du puceron (Vidotti 1960 ; Arzone & Vidano 1984 ; Maugard 1996).



**Fig. 2** Principaux symptômes et dégâts des infestations de puceron lanigère du peuplier : (a) tronc infesté entièrement recouvert de cire blanche sécrétée par les colonies de puceron, (b) arbres recouverts de fumagine [signalée par les flèches jaunes] après une lourde infestation, (c) craquelures caractéristiques de l'écorce après attaques - aspect 'peau de lézard' de l'écorce, (d) nécroses corticales, (e) mortalité des branches basses et (f) mortalité dans une peupleraie après une infestation sévère

<sup>2</sup> Ravageur primaire : insecte qui s'attaque à des arbres vigoureux et sains

Les premiers signes d'attaque sont difficiles à détecter puisque les premières colonies apparaissent dans les crevasses de l'écorce au niveau du tiers supérieur du tronc (i.e. zone d'insertion des branches basses). En cas de forte pullulation, les colonies s'étendent jusque dans la partie basse du tronc, le recouvrant complètement d'un feutrage blanchâtre constitué de cire sécrétée par l'insecte (Fig. 2a). Les conséquences sont multiples (Fig. 2c,d,e) : (1) perte d'élasticité de l'écorce dans les zones occupées par les colonies, aboutissant à des craquelures caractéristiques connues sous le nom de 'peau de lézard', (2) nécroses corticales entourées de bourrelets cicatriciels, (3) mortalité de branches basses, (4) absence de débourrement et mort l'année suivant l'infestation (Fig. 2f) (Della Beffa 1936 ; Arzone & Vidano 1984 ; DSF 2006), la mortalité pouvant atteindre 70 % des arbres d'une parcelle. Après une infestation sévère, des champignons saprophytes se développent sur le miellat produit par les pucerons. Leurs mycéliums donnent au tronc une couleur noire caractéristique, connue sous le nom de fumagine (Fig. 2b). L'importance des dégâts est généralement fonction de la proportion de tronc recouvert par les colonies. Ainsi, lorsque la fraction de tronc colonisée reste inférieure à 50 % de la surface totale, on assiste essentiellement à une diminution de croissance, tandis qu'une surface de colonisation supérieure à 50 % aboutit généralement à la mort de l'arbre (DSF 2007).

### 2.3. Moyens actuels de lutte

La longévité et la hauteur des arbres rendent difficile l'application en peupleraie des méthodes conventionnellement appliquées en agriculture. En cas d'attaques sévères, la lutte curative chimique peut-être utilisée (Maugard & Baubet 2004 ; DSF 2006). Toutefois, la mise en place des traitements insecticides en début de colonisation reste difficile car elle ne doit intervenir ni trop tôt (pour éviter d'autres traitements) ni trop tard (pour limiter l'infestation), et nécessite des moyens techniques et humains importants et coûteux. Les troncs sont traités jusqu'au tiers supérieur en utilisant un important volume d'eau mais l'impossibilité d'atteindre les plus hautes parties, allée au fort potentiel de recolonisation de l'insecte, diminue beaucoup l'efficacité du traitement. De plus, les molécules chimiques utilisées (e.g. lambda cyhalothrine, pyrimicarbe) sont peu sélectives et sont nocives pour le reste de l'entomofaune (Maugard & Baubet 2004 ; DSF 2006).

Les pullulations de *P. passerinii* sont sans précédent et contrastent avec les faibles densités des populations typiquement observées sur son hôte de prédilection le peuplier noir, *Populus nigra* (L.), dans les zones naturelles de ripisylve (Source : crop protection compendium-cabi.org). Le puceron lanigère du peuplier est une espèce qui reste à ce jour très peu étudiée et les raisons de son émergence et de l'expansion de ses pullulations vers le nord restent à clarifier.

### **3. QUELLES HYPOTHESES POUR EXPLIQUER L'EMERGENCE ET L'EXPANSION DES POPULATIONS DE *P. PASSERINII* ?**

L'émergence et la propagation rapide des populations de *P. passerinii* soulèvent une principale interrogation : pourquoi et comment une espèce indigène de puceron a-t-elle pu acquérir le statut de ravageur sur une essence autochtone ? Plusieurs facteurs liés à l'environnement biotique et abiotique de l'insecte, ainsi qu'à ses caractéristiques biologiques et génétiques pourraient être impliqués dans l'apparition et la propagation des pullulations sans précédent de *P. passerinii*.

#### **3.1. Facteurs environnementaux biotiques**

Les pullulations d'insectes correspondent à des périodes durant lesquelles leurs populations ne sont plus contrôlées par les facteurs naturels de régulation. La dynamique des populations d'insectes phytophages forestiers peut être régulée par deux types de facteurs biotiques: ceux liés à l'arbre hôte, en particulier l'abondance et le niveau de résistance des peuplements, et ceux relatifs aux ennemis naturels. L'importance relative de l'arbre hôte et des ennemis naturels sur la dynamique de leurs populations varie considérablement selon l'espèce d'insecte considérée (Kidd & Jervis 1997).

##### **3.1.1. Niveau de résistance des peuplements forestiers**

La résistance des arbres joue un rôle crucial dans l'écologie des insectes forestiers (Wagner et al. 2002). Les contraintes environnementales qui affectent le niveau de résistance des arbres sont donc particulièrement susceptibles d'affecter les interactions arbre-insecte, ce qui peut conduire à une amélioration des performances des insectes et par conséquent à l'émergence de nouveaux ravageurs.

###### *3.1.1.1. Impact des contraintes abiotiques sur la résistance des arbres*

La réponse des insectes aux modifications du niveau de résistance des peuplements semble dépendre de la guildes alimentaire de l'insecte (Koricheva et al. 1998b). Ainsi, les insectes xylophages et piqueurs-suceurs semblent globalement favorisés dans les peuplements stressés par les contraintes abiotiques (Larsson 1989 ; Larsson & Björkman 1993 ; Koricheva et al. 1998b), tandis que les défoliateurs le semblent plutôt dans des peuplements non stressés (Price 1991 ; Larsson & Björkman 1993 ; Koricheva et al. 1998b). Toutefois, si la réponse des insectes xylophages semble constante, celle des insectes piqueurs-suceurs et des défoliateurs montre une certaine variabilité intra-gilde (Koricheva et al. 1998b). De telles variations sont probablement liées aux caractéristiques

biologiques des insectes, telles que leur mobilité, leur mode d'alimentation (tissus ciblés, spécialisation) et dépendent du groupe taxonomique considéré (Jones & Coleman 1991).

Les contraintes abiotiques, telles que la fertilisation, la température, les désastres naturels (sécheresse, incendies de forêts, tempêtes), la concentration en CO<sub>2</sub> ou la pollution peuvent modifier la résistance de l'arbre, agir sur l'insecte lui-même ou sur les deux simultanément (Berryman 1981 ; Mattson & Haack 1987 ; Jones & Coleman 1991 ; Herms & Mattson 1992 ; Larsson 1989 ; Tuomi et al. 1991 ; Koricheva et al. 1998a,b ; Lieutier 2004). Par exemple, la combinaison d'une sécheresse intense diminuant le niveau de résistance des peuplements d'épicéas et de température élevées favorisant le taux d'accroissement des populations d'insectes peut déclencher des pullulations d'insectes xylophages tels que le scolyte *Ips typographus* L. (Coleoptera) (Chararas 1979 ; Bakke 1983). Les désastres naturels sont connus pour être des facteurs déclencheurs des pullulations en milieu forestier puisqu'ils affaiblissent les arbres. Ainsi, les tempêtes de grande envergure sont le principal facteur déclencheur des pullulations de scolytes. La fertilisation agit de manière multifactorielle. D'une part, elle peut augmenter la qualité nutritionnelle de l'arbre hôte et donc sa susceptibilité aux attaques de pucerons (Rowntree et al. 2010), comme par exemple chez le puceron lanigère du pin sylvestre, *Schizolachnus pineti* (F.) (Kainulainen et al. 1996). D'autre part, selon l'hypothèse de la balance croissance/différenciation (Loomis 1932 ; Herms & Mattson 1992), la fertilisation tend à augmenter la concentration en métabolites secondaires et donc la résistance des arbres jusqu'à un certain seuil au-delà duquel la tendance s'inverse. Les contraintes abiotiques directement liées aux variables climatiques telles que la température, les sécheresses ou la concentration en gaz à effet de serre (CO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) sont des facteurs importants lorsque l'on considère les pullulations d'insectes dans le contexte du changement climatique. Ce thème sera traité dans le paragraphe 3.2.2 de l'introduction.

### 3.1.1.2. Impact des pratiques sylvicoles

Les écosystèmes forestiers sont depuis longtemps modifiés par les pratiques sylvicoles assurant le renouvellement naturel ou artificiel des peuplements, la préparation du terrain et agissant sur la composition des peuplements (Zsuffa et al. 1996 ; FAO 2001). Depuis le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, la nécessité d'accroître la productivité des forêts est apparue avec la demande croissante en bois d'œuvre, de chauffage et d'industrie. La ligniculture<sup>3</sup>, s'est donc développée de manière importante plaçant au premier rang des essences plantées à l'échelle mondiale, le pin (*Pinus* spp.) et l'eucalyptus

---

<sup>3</sup> Ligniculture : culture d'arbres à croissance rapide en plantation de courte révolution avec des pratiques sylvicoles intensives en vue d'obtenir le maximum de rendement de matière ligneuse

(*Eucalyptus* spp.) (Ohmart & Edwards 1991 ; FAO 2001). Dans l'hémisphère nord, les principales essences autochtones concernées sont les Salicaceae avec d'abord le peuplier (*Populus* spp.) puis le saule (*Salix* spp) (Zuffa et al. 1996 ; Coyle et al. 2005). La standardisation des produits du bois pour les besoins industriels a contribué à des dégâts plus fréquents et intenses des ravageurs indigènes ainsi qu'à l'émergence de nouveaux ravageurs (Day & Leather 1997).

La nécessité d'accroître la production forestière a conduit à une réduction de la diversité génétique des peuplements (Mason 1985 ; Muller-Starck & Zeihe 1992), en raison du développement de la sélection génétique d'hybrides à forte productivité (croissance rapide, qualité du bois) (Stettler et al. 1996 ; Pallett & Sale 2004). Si l'on considère qu'il existe un compromis entre les caractères liés à la croissance et ceux relatifs à la défense contre les phytophages (Loomis, 1932 ; Lorio 1986 ; Coley et al. 1985 ; Gulmon & Mooney 1986 ; Herms & Mattson 1992) et que la mise en place de mécanismes de résistance est coûteuse (Koricheva 2002 ; Strauss et al. 2002), il est probable que la sélection pour la croissance affecte négativement les capacités de défense des génotypes sélectionnés. Dans ces conditions, la sensibilité aux insectes peut être accrue et l'émergence de nouveaux ravageurs favorisée.

De nombreuses espèces d'insectes indigènes forestiers ont atteint le statut de ravageur suite au développement des plantations à densité élevée et à diversité génétique réduite, voire inexistante (Day & Leather 1997 ; Speight 1997). Par exemple en Australie, de nombreux insectes indigènes présents à l'état endémique dans les forêts naturelles d'eucalyptus sont devenus ravageurs dans les plantations monoclonales de cette même essence (Strauss 2001 ; Henery 2010). L'homogénéisation spatiale et génétique des plantations peut avoir de profonds effets sur la dynamique des populations d'insectes capables d'utiliser la ressource, en particulier les espèces monophages (Jactel et al. 2005). La forte densité des peuplements permet aussi de réduire les pertes subies par les insectes lors de leur dispersion pour trouver un nouvel hôte. C'est particulièrement crucial pour les pucerons dont le taux de mortalité lié à la dispersion est très élevé (Ward et al. 1998). Finalement, la simplification des écosystèmes par la réduction de la diversité génétique des arbres, par les plantations sur sols plus ou moins adaptés et par l'augmentation de la densité sont autant de facteurs dont la combinaison affecte le niveau de résistance des peuplements forestiers et accentue le risque d'émergence de nouveaux ravageurs (Coyle et al. 2005 ; Wainhouse 2005 ; Henery 2010).

### **3.1.2. Prédation et parasitisme**

Les parasitoïdes et les prédateurs peuvent aussi réguler significativement la dynamique des populations d'insectes forestiers (Kidd & Jervis 1997). Toutefois, dans un habitat peu diversifié comme certaines plantations forestières modernes, 'l'hypothèse des ennemis naturels' suggère que les

espèces et les populations de prédateurs et parasitoïdes sont moins abondantes et donc peu efficaces dans la régulation des populations d'insectes phytophages (Root 1973 ; Russel 1989). De plus, chez les pucerons des arbres, les ennemis naturels ne sont généralement pas les principaux facteurs de régulation des populations mais plutôt des facteurs perturbant occasionnellement leur dynamique. C'est le cas par exemple pour les populations du puceron de l'érable, *Drepanosiphum platanoïdes* (Schrank) qui sont parfois réduites de manière drastique par les Hyménoptères parasitoïdes *Aphelinus thomsoni* Graham, *Monoctonus pseudoplatani* Marshall ou *Trioxys cirsii* Curtis (Dixon 2005).

### **3.2. Les modifications climatiques**

Les modifications climatiques impliquent des changements complexes et simultanés de nombreuses variables environnementales (Trenberth et al. 2007). La température moyenne globale a augmenté d'environ 1°C depuis l'ère préindustrielle en Europe, avec une accélération au cours des dernières décennies durant lesquelles huit années entre 1996 et 2007 étaient parmi les plus chaudes depuis 1850 (EEA 2008). De plus, en se basant sur les modèles d'évolution de la température pour les 100 prochaines années, il est prédit que l'augmentation de la concentration en gaz à effet de serre pourrait augmenter la température moyenne globale de 1,8 à 4,0 °C d'ici 2100 (Meehl et al. 2007). Des modifications du niveau de pénétration des ultraviolets B (UVB) ainsi que de la fréquence et de l'intensité des précipitations et des événements climatiques extrêmes dont les sécheresses et les tempêtes sont aussi prédites. Les modifications climatiques affectent directement les insectes phytophages, prédateurs et parasitoïdes via leurs impacts sur la physiologie et le comportement, ce qui peut avoir des conséquences sur leurs interactions (Harrington et al. 1999 ; Hance et al. 2007). Pour les insectes phytophages, l'impact peut être également indirect lorsque l'insecte est affecté par des changements d'autres facteurs eux-mêmes modifiés par les paramètres climatiques, en particulier les facteurs liés à la plante hôte (Herms & Mattson 1992).

#### **3.2.1. Impacts directs sur les insectes**

La plupart des études concernant l'impact direct des modifications climatiques sur les insectes s'intéressent à l'effet de l'augmentation de la température, puisque ce sont des organismes poïkilothermes dont la physiologie est fortement influencée par la température ambiante. Il existe peu de preuves expérimentales de l'effet direct des autres facteurs climatiques sur les insectes (e.g. UVB : Hatcher & Paul 1994 ; McCloud & Berenbaum 1994 et CO<sub>2</sub> : Stange et al. 1993 ; Agrell et al. 2000). L'augmentation des températures peut avoir un effet positif direct sur le taux de phytophagie (DeLucia et al. 2008 ; Bale et al. 2002) et sur la dynamique spatiotemporelle des insectes forestiers à travers la

modulation de processus physiologiques tels que la survie hivernale, le développement, la fécondité, la phénologie et la dispersion (Messenger 1959 ; Andrewartha & Birch 1984 ; Bale et al. 2002 ; Robinet & Roques 2010). Comparativement aux autres insectes, le seuil thermique minimal de développement des pucerons est bas et leur durée de génération est courte et sans diapause (Harrington et al. 1995). La température a donc une influence déterminante sur leur dynamique et le réchauffement climatique est susceptible d'affecter fortement leur statut de ravageur (Bale et al. 2002). De plus, la température affecte le mode de reproduction des pucerons (cf. § 3.3.2).

Notons également que si la température affecte la physiologie des insectes phytophages, elle affecte également celle de leurs prédateurs et parasitoïdes qui n'ont pas la même tolérance physiologique à la température et le même optimum de développement (Parmesan & Yohe 2003 ; Parmesan 2006). Ainsi, l'augmentation des températures peut conduire à des perturbations de la synchronisation phénologique spatiale et temporelle entre le cycle biologique de l'insecte proie et celui de son prédateur ou parasitoïde (Harrington et al. 1999 ; Visser & Both 2005 ; Hullé et al. 2010). Les études empiriques visant à analyser l'impact d'une augmentation de la température sur les interactions entre les pucerons et leurs ennemis naturels montrent qu'il n'est pas possible de tirer de conclusion générale quant à un effet positif ou négatif des modifications de synchronisation phénologique sur la croissance des populations de pucerons (Hullé et al. 2010). Toutefois, un décalage de l'aire de distribution du puceron non suivi par un décalage de celle de ses ennemis naturels ou une émergence trop précoce d'un parasitoïde vis-à-vis de son puceron hôte peut favoriser les populations de puceron (Hance et al. 2007), et donc l'émergence de nouveaux ravageurs.

### **3.2.2. Impacts indirects via l'arbre hôte**

Tous ces effets directs sur les populations d'insectes phytophages peuvent être en outre modulés par des effets indirects positifs ou négatifs, résultant de l'action des modifications climatiques sur la physiologie et la phénologie de l'arbre hôte et qui affecte sa qualité nutritionnelle ou sa sensibilité.

L'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique a pour effet de modifier les propriétés nutritionnelles des plantes en augmentant le rapport C/N. Cela conduit à un taux de phytophagie plus important des larves d'insectes (alimentation compensatoire) pour achever leur développement et donc à des dégâts plus importants (Lindroth et al. 1995 ; Docherty et al. 1996). Les études réalisées sur les pucerons des arbres montrent une certaine variabilité de leur réponse (Docherty 1997). L'élévation de la concentration des gaz à effets de serre peut aussi affecter le niveau de résistance des arbres. Ainsi, Percy et al. (2002) ont montré qu'une élévation de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>3</sub> affecte les caractéristiques défensives physiques et chimiques du peuplier tremble, *Populus tremuloides* (Michx)

entraînant des pullulations plus sévères du puceron, *Chaitophorus stевensis* (Sanborn). S'agissant de l'impact de la température sur la physiologie de la plante, les quelques études réalisées montrent qu'à l'heure actuelle aucune généralisation n'est possible puisque la réponse de la plante semble varier selon les composés chimiques et selon l'espèce (Bidart-Bouzat and Imeh-Nathaniel 2008). En revanche, les sécheresses plus fréquentes et intenses qui accompagnent l'élévation des températures ont un impact beaucoup plus marqué sur la résistance de l'arbre vis-à-vis des insectes phytophages et sur leurs pullulations (Mattson & Haack 1987). De gros événements de sécheresse peuvent favoriser l'émergence de nouveaux ravageurs, comme dans le cas des sécheresses intenses subies par le chêne rouge ayant contribué à l'émergence du coléoptère *Enaphalodes rufulus* dans l'Arkansas (Stephen et al. 2003). L'hypothèse de la balance croissance/différenciation (Loomis 1932 ; Herms & Mattson 1992) est suggérée pour expliquer ce phénomène. D'après cette hypothèse, un stress hydrique modéré augmente la concentration en métabolites secondaires impliqués dans la résistance (e.g. composés phénoliques), tandis qu'un stress hydrique intense la réduit. La réponse des pucerons aux modifications physiologiques induites par la sécheresse sont variables (Hale et al. 2003).

Les modifications thermiques peuvent agir sur la synchronisation phénologique entre le puceron et son arbre hôte, conduisant à des effets négatifs lorsqu'elles engendrent un décalage entre l'apparition du stade végétal recherché par l'insecte et le stade agressif du ravageur, comme chez le puceron de l'érable sycomore, *Drepanosiphum platanoides* (Dixon 2003). Toutefois, l'impact pourrait-être positif pour des pucerons endémiques qui seraient en discordance partielle avec leur hôte et dont la synchronisation serait meilleure par suite des modifications de phénologie.

### **3.2.3. Impacts sur les régimes de pullulation d'insectes**

Il existe des preuves visibles des effets directs du réchauffement climatique sur les modifications de l'intensité et de la fréquence des pullulations, ainsi que sur les modifications des aires de distribution des insectes forestiers (Safranyik & Wilson 2006 ; Carroll et al. 2006 ; Ayres & Lombardero 2000 ; Bale et al. 2002 ; Logan et al. 2003 ; Netherer & Schopf 2010 ; Robinet & Roques 2010). Les modifications d'intensité et de fréquence des pullulations sont généralement attribuées à un accroissement du voltinisme (Ayres & Lombardero 2000 ; Harrington et al. 2001 ; Berg et al. 2006 ; Kiritani 2006 ; Lange et al. 2006 ; Westgarth-Smith et al. 2007 ; Jönsson et al. 2007). L'aire de distribution peut être modifiée par un allongement de la période de vol, une augmentation du taux de survie hivernal et un décalage altitudinal et latitudinal des isothermes modifiant la limite des températures létales basses spécifiques à chaque espèce (Kurz et al. 2008 ; Battisti et al. 2005 ; Robinet & Roques 2010). Plus généralement, Bale et al. (2002) ont suggéré que l'aire de distribution d'une espèce forestière phytophage était approximativement déterminée par une combinaison du taux

de développement avec la présence/absence d'une diapause. Leur modèle simplifié prédit que l'augmentation des températures affectera positivement le voltinisme et la limite altitudinale et latitudinale des espèces multivoltines sans diapause, tels que les pucerons. Chez ces espèces, une période de vol plus précoce et la diminution du taux de mortalité hivernale des générations anholocycliques<sup>4</sup> peut également entraîner une plus grande sévérité des pullulations. C'est de cette façon que la capacité reproductrice des générations anholocycliques d'*Elatobium abietinum* au printemps a été améliorée, entraînant d'importantes défoliations dans les forêts d'épicéas du Royaume-Uni (Powell & Parry 1976 ; Westgarth-Smith et al. 2007).

### **3.3. Caractéristiques génétiques des populations**

Nous venons de voir que les changements environnementaux peuvent affecter la dynamique des populations des insectes en influençant la dispersion des individus, et donc leur répartition, en affectant leurs interactions avec la plante hôte et leurs ennemis naturels, ainsi qu'en ayant des effets sur la physiologie de l'insecte (e.g. reproduction parthénogénétique favorisée par le réchauffement chez les pucerons, changements dans leur phénologie et premières migrations printanières plus précoces ; Hullé et al. 2010). À cela s'ajoutent les caractéristiques génétiques des populations d'insectes répondant aux variables environnementales et qui constituent aussi un facteur clé de leur dynamique de populations (Wallner 1987), pouvant notamment conduire à l'émergence de nouveaux ravageurs. Chez les pucerons, la présence d'une reproduction parthénogénétique assurant une succession rapide de nombreuses générations clonales, peut amplifier la réponse génétique et favoriser l'émergence rapide de populations adaptées à leur habitat.

#### **3.3.1. Variabilité génétique et arbre hôte**

Des modifications de la qualité et de la disponibilité de la plante hôte peuvent affecter la dispersion des individus, ce qui influence directement les flux de gènes au sein et entre les populations et ainsi la distribution de la variabilité génétique (Mopper 1996 ; Peterson & Denno 1998a). La spécialisation pour un hôte donné peut limiter les flux de gènes et conduire à l'apparition de populations génétiquement distinctes associées à un hôte particulier (race d'hôte) ou de variants génotypiques (biotypes) contournant les gènes de résistance de l'hôte et que l'on identifie généralement sur la base d'expériences de préférence/performance des individus (Edmunds & Alstad 1978 ; Rausher 1983). Ce phénomène, fréquemment observé chez les pucerons (Shufran et al. 1992 ;

---

<sup>4</sup> Anholocyclique : générations à reproduction parthénogénétique

Via 1999 ; Sunnucks et al. 1997 ; Miller et al. 2005 ; Frantz et al. 2006 ; Margaritopoulos et al. 2009), peut conduire à l'émergence de populations ravageuses car plus spécialisées ou plus agressives. Par exemple, depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle en Europe, les vignes ont été greffées sur des porte-greffes de variétés américaines de vigne naturellement résistantes au phylloxéra. Cette résistance, jusqu'alors efficace, a finalement été contournée par un nouveau biotype apparu en Allemagne en 1994 (van Emden 2007). La culture en plantations monoclonales favorise clairement la spécialisation et l'émergence de nouveaux biotypes chez les pucerons ainsi que leur expansion, comme dans le cas de l'apparition de la race d'hôte de *Myzus persicae* (Sulzer) associée au tabac (Margaritopoulos et al. 2009). L'apparition de biotypes et de races d'hôte adaptés à des cultivars particuliers est également observée chez les pucerons des arbres. Ainsi, dans les vergers de pommiers, quelques cas d'apparition de nouveaux biotypes du puceron lanigère du pommier, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann), contournant le gène de résistance *Er1* présent dans le génotype Northern Spy ont été rapportés (McClintock 1930 ; Giliomee et al. 1968). Les races d'hôte et des biotypes ne doivent pas être négligées chez les insectes forestiers qui ont souvent une large distribution géographique et sont associés à des hôtes pérennes (Day & Leather 1997). Toutefois, leur existence n'est pas systématique. Nicol et al. (1998) ont identifié 28 génotypes chez 40 populations du puceron vert de l'épicéa, *Elatobium abietinum* mais ils n'ont pas mis en évidence de biotypes.

### 3.3.2. Variabilité génétique, cycle de vie et climat

Il existe chez certaines espèces de puceron un polymorphisme génétiquement déterminé du mode de reproduction permettant la coexistence, au sein d'une même espèce, de lignées variant dans leurs stratégies de reproduction et d'hivernation (Simon et al. 2002): (1) des clones holocycliques alternent entre une reproduction asexuée et sexuée et hivernent sous forme d'œufs, (2) des clones anholocycliques maintiennent une reproduction exclusivement parthénogénétique pendant toute l'année et hivernent sous forme d'individus parthénogénétiques, (3) des clones intermédiaires (ou dicycliques) maintiennent simultanément les deux modes de reproduction pendant l'hiver (Blackman 1974 ; Dedryver et al. 1998). Cette flexibilité de cycle de vie est fortement influencée par la température (Rispe et al. 1998). Le climat peut alors affecter la composition clonale des populations. Les études réalisées sur les pucerons des grandes cultures ont montré qu'il existait le plus souvent un cline latitudinal avec prédominance de clones anholocycliques dans les régions à hivers doux, de clones holocycliques dans les régions à hiver rude, et de clones intermédiaires dans les régions à hiver fluctuant (Dedryver et al. 1998, 2001 ; Simon et al. 1999 ; Llewellyn et al. 2003). Des modifications de température peuvent alors non seulement améliorer le taux de survie hivernale des individus parthénogénétiques mais également favoriser les clones anholocycliques, conduisant à une croissance exponentielle des populations et à l'émergence de nouveaux ravageurs (revu dans Hullé et al. 2010).

### 3.3.3. Variabilité génétique et dispersion

Les processus de dispersion ont d'importantes conséquences sur les flux de gènes. Chez les pucerons, certaines espèces ont une grande capacité migratoire avec des flux de gènes importants entre populations (e.g. *Drepanosiphum platanoides*), tandis que d'autres dispersent plus localement avec des flux de gènes limités, comme les espèces gallicoles (e.g. *Pemphigus bursarius*) (Loxdale & Lushai 2007). De même, au sein d'une espèce, certains clones, dont la tolérance écologique est large, sont présents sur des zones géographiques étendues tandis que les autres sont plus spécialisés et localisés (e.g. *Myzus persicae*, Margaritopoulos et al. 2009). Les clones anholocycliques, non contraints par la photopériode ou l'obligation de trouver un hôte favorable pour la reproduction sexuée, ont une grande tolérance écologique (Margaritopoulos et al. 2009). La dispersion large (et rapide) de certains génotypes est aussi attribuée au transport d'origine humaine (e.g. *Elatobium abietinum* en Nouvelle-Zélande, Nicol et al. 1998). Quelque soit le mode de dispersion, si des pucerons immigrants trouvent un hôte favorable à leur arrivée, se reproduisent et survivent sur cet hôte, ils peuvent constituer une population fondatrice qui peut persister, se développer et finalement continuer à s'étendre. Parfois, ces populations deviennent ravageuses. Par exemple dans les grandes cultures, la dispersion peut aboutir à la sélection de génotypes (clones) résistants aux insecticides (Margaritopoulos et al. 2009). En revanche, des populations fondatrices limitées, comme dans le cas d'une introduction d'origine humaine très ponctuelle, peuvent restreindre la capacité d'adaptation des populations (e.g. *Elatobium abietinum* en Nouvelle-Zélande, Nicol et al. 1998). Compte-tenu de leur petite taille et de la dilution rapide des populations ailées dans les airs, la dispersion des pucerons est difficilement appréciable avec les méthodes conventionnelles (Loxdale 2001). En examinant la structure génétique des populations, il est possible de mettre en évidence les processus d'expansion géographique et de colonisation et d'identifier les populations sources (e.g. *Myzus persicae*, Margaritopoulos et al. 2009).

## 4. PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS DE LA THESE

### 4.1. Problématique

Les dégâts dus au puceron lanigère du peuplier de même que leur extension spectaculaire restent inexplicables, et il n'existe pas actuellement de méthode efficace de suivi et de gestion des populations de l'insecte dans les zones infestées, ni de méthodes de prévision des risques et de prévention des dégâts dans les zones indemnes. La mise au point de telles méthodes implique nécessairement de connaître la biologie générale et la dynamique du puceron, en particulier le rôle des facteurs abiotiques, biotiques et génétiques conditionnant leurs performances et leur agressivité.

Mon travail de thèse démarré en 2007 s'inscrit dans un programme de recherche débuté la même année par l'équipe d'Entomologie Forestière du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC). Ce programme vise à définir les facteurs de la dynamique spatio-temporelle des populations de puceron lanigère, pour comprendre les processus à l'origine des pullulations. En effet, l'émergence et la propagation rapide des populations de *P. passerinii* soulèvent plusieurs interrogations : S'agit-il de populations locales favorisées par des conditions environnementales favorables ? S'agit-il de populations méridionales qui se sont propagées plus au nord ? Ce programme vise également à proposer les bases de méthodes de surveillance, de prévision des risques et de prévention des dégâts. Il cherche à mettre en évidence les particularités des interactions arbres / puceron lanigère / environnement qui pourraient être mises à profit. En particulier, il vise :

- 1- à éclaircir le rôle des facteurs abiotiques sur la biologie des populations de l'insecte;
- 2- à caractériser les mécanismes naturels de résistance de l'arbre vis-à-vis du puceron et l'impact de celui-ci sur les tissus de son hôte, dans des conditions environnementales variées;
- 3- à apprécier le niveau de variabilité génétique des populations du puceron en lien avec l'agressivité de celles-ci, afin d'appréhender leurs possibilités d'adaptation à la résistance des arbres.

L'ensemble de ce programme représente un travail considérable. Mon travail de thèse s'est tout d'abord focalisé sur l'étude des interactions entre le peuplier et le puceron lanigère en éclaircissant la biologie générale du puceron et en initiant l'étude des mécanismes de résistance. Puis ce travail s'est concentré sur l'appréciation des processus à l'origine des pullulations. Afin de répondre aux deux principales questions, deux approches ont été développées : - la première évaluant l'effet des facteurs environnementaux sur les populations du puceron et leur implication potentielle dans l'émergence et l'expansion des pullulations de *P. passerinii*, - la deuxième visant à retracer l'histoire évolutive des populations de ce puceron afin de mieux comprendre leur origine géographique et les facteurs

conditionnant leur évolution. Dans ce but, ce travail s'est focalisé sur l'appréciation du rôle de l'arbre hôte et de la température dans la dynamique de ses populations et l'émergence des dégâts, et sur l'évaluation du niveau de variabilité et de structure génétique des populations du puceron.

Mon projet de recherche présente un intérêt tant fondamental qu'appliqué. Il s'insère d'abord dans une démarche scientifique générale visant d'une part à comprendre les interactions au sein d'un modèle arbre-puceron original, et d'autre part à comprendre comment les facteurs génétiques et environnementaux interagissent pour conduire à l'émergence de nouveaux ravageurs indigènes. Il permet aussi d'apporter des informations utiles aux forestiers pour développer des méthodes de prévision des risques et de gestion préventives des populations de ce nouveau ravageur. Plus largement, mon étude pose la question du rôle potentiel des pucerons comme futures espèces ravageuses forestières, d'autant plus que plusieurs études ont déjà souligné une abondance croissante des populations de pucerons des arbres, en particulier celles inféodées aux parties lignifiées, dans de nombreuses régions d'Europe (Sage 1994 ; Sage & Tucker 1997 ; Armstrong 2000 ; Collins 2001).

## 4.2. Objectifs et structure de la thèse

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis la réalisation de six articles dont un paru dans le *Canadian Journal of Forest Research* en 2011, un accepté pour publication dans *Molecular Ecology Resources*, trois en relecture avant soumission et un en préparation. Afin d'éviter les redondances, les références bibliographiques sont présentées à la fin du manuscrit.

Le **Chapitre I** est une synthèse bibliographique visant à situer *P. passerinii* dans le contexte général des pucerons des arbres pour souligner les particularités du modèle biologique et préciser les points importants à approfondir. Une première partie est consacrée à la présentation des connaissances sur la biologie des pucerons des arbres, leurs adaptations, les interactions avec leurs hôtes et leurs impacts sur les écosystèmes forestiers. La seconde partie traite du modèle biologique et présente les connaissances acquises préalablement à mon travail.

Le **Chapitre II** vise à approfondir les connaissances sur la biologie et l'écologie du puceron. L'originalité des dégâts et le fait que l'espèce se développe sur le tronc d'arbres matures soulève d'importantes questions quant aux interactions fines entre l'hôte et son agresseur. Une étude détaillée du **mode d'alimentation** de *P. passerinii*, est d'abord présentée. C'est un aspect fondamental de ces interactions, à l'origine des dégâts et des mécanismes de résistance potentiellement impliqués. Les tissus ciblés par le puceron sont identifiés et le comportement alimentaire est décrit. Une **étude phylogénétique** vise ensuite à replacer l'espèce au sein des Aphididae, pour éclaircir la position

systematique de la sous-famille des Phloeomyzinae et apporter des éléments de discussion quant à l'évolution du mode d'alimentation dans ce groupe.

Le **Chapitre III** aborde la variabilité génétique de résistance du peuplier avec pour objectif d'évaluer l'effet du niveau de résistance sur les performances de *P. passerinii*. A cette occasion, les types de résistance impliqués (antibiose ou antixénose) ont pu être précisés. Le chapitre est scindé en deux grandes parties: 1- une **étude physiologique** sous trois conditions expérimentales (boutures non enracinées au laboratoire, jeunes plants en serre, arbres en peupleraie) dont les objectifs, en comparant divers génotypes de peuplier, sont d'une part de déterminer comment les performances de l'insecte sont affectées par la résistance du peuplier, d'autre part de définir un test simple de mesure relative du niveau de résistance, transposable au terrain; 2- une **étude comportementale** comparant les modalités de pénétration des stylets dans des génotypes de niveau de résistance différents, afin de compléter les informations précédentes.

Le **Chapitre IV** est consacré à l'identification des processus à l'origine de l'émergence et de l'expansion des pullulations de *P. passerinii* en France et à la prédiction des risques pour les zones non-infestées. Il se scinde en deux grandes parties. Dans la première, **l'effet de la température** sur les performances du puceron est évalué, ce qui permet de construire un modèle mécanistique de dynamique de ses populations basé sur les relations entre température et réponse physiologique de l'insecte. Ce modèle est ensuite utilisé pour tester le rôle des modifications climatiques récentes sur l'émergence et l'expansion des dégâts et prédire les risques dans le cadre d'une évolution du réchauffement climatique. Dans la seconde partie, les **caractéristiques génétiques des populations** sont prises en compte. Il s'agit d'identifier un ensemble de marqueurs génétiques suffisamment polymorphes pour permettre ensuite l'estimation de la diversité génétique et l'analyse de la distribution spatiale de la variabilité génétique chez *P. passerinii*.

La **conclusion générale** présente une vision d'ensemble des connaissances biologiques de l'espèce, des ses interactions avec l'arbre hôte et des facteurs impliqués dans la dynamique de ses pullulations.

# Chapitre I.

---

*Synthèse bibliographique*



# Partie 1.

---

## *Les pucerons des arbres*



# Chapitre I. ~ Partie 1.

## Synthèse bibliographique : *Les pucerons des arbres*

Le puceron lanigère du peuplier et ses interactions avec son hôte étant relativement peu connus, il convenait de resituer notre système biologique dans le contexte général des pucerons des arbres. Cette première partie a donc pour objectif de présenter la biologie générale des pucerons des arbres et les particularités du modèle d'interaction arbres-pucerons.

Les pucerons au sens large ou Aphidoidea (*sensu* Blackman & Eastop 1994) constituent un groupe d'insectes piqueurs-suceurs à corps mou apparu il y a 280 millions d'années (Grimaldi & Engels 2005). Ils appartiennent à l'ordre des Hemiptera et au sous-ordre des Sternorrhyncha qui compte également trois autres super-familles : Coccoidea (cochenilles), Aleyrodoidea (aleurodes) et Psylloidea (psylles) (Blackman & Eastop 2007). Les pucerons se développent dans les zones tempérées de l'hémisphère nord aussi bien sur des plantes sauvages que cultivées, ornementales ou forestières. Environ 40 % des espèces d'Aphidoidea passent tout ou une partie de leur cycle de vie sur un arbre hôte, tandis que 55 % se développent sur les plantes herbacées et les arbustes, les 5 % restant vivant sur un hôte inconnu (Blackman & Eastop 1994, 2006). Les trois familles reconnues (*sensu* Blackman & Eastop 1994) possèdent des espèces exclusivement associées aux arbres : (1) les Adelgidae ( $\approx$  70 espèces) toutes associées aux conifères (Gymnospermes), (2) les Phylloxeridae ( $\approx$  70 espèces) dont la grande majorité des espèces se trouve sur chênes et pacaniers et une espèce particulièrement ravageuse sur la vigne, et (3) les Aphididae (4700 espèces) avec par exemple la sous-famille des Lachninae possédant de nombreuses espèces associées aux arbres (i.e. tribus des Eulachnini et des Lachnini). Les espèces d'Aphididae modernes résultent d'une radiation évolutive des pucerons parallèle à celle des Angiospermes et Gymnospermes modernes qui a eu lieu à la fin du Crétacé (Heie 1987 ; Blackman & Eastop 1994 ; von Dohlen & Moran 2000 ; Peccoud et al. 2010).

### 1.1. BIOLOGIE DES PUCERONS DES ARBRES

L'arbre diffère des plantes herbacées par un certain nombre de caractéristiques ayant joué un rôle important dans l'adaptation des pucerons via les processus de sélection. Un arbre se définit comme un '*végétal pérenne, ligneux, rameux, ne portant de branches durables qu'à une certaine distance du sol*' (www.larousse.fr). La présence de tissus lignifiés, la complexité architecturale ainsi

que la durée de vie d'un arbre contribuent à offrir aux insectes une grande diversité de niches écologiques (feuilles, rameaux, branches, tronc et racines) qui diffèrent entre elles par leurs caractéristiques structurales et écologiques et sont toutes susceptibles d'être colonisées.

### 1.1.1. Cycle de vie

#### 1.1.1.1. Généralités sur la stratégie de reproduction

Le cycle de vie annuel typique des pucerons alterne une succession de 'n' générations à reproduction parthénogénétique thélytoque (femelles parthénogénétiques dites femelles virginipares) favorisées par les conditions climatiques du printemps et de l'été, et une génération à reproduction sexuée qui produit à l'automne les œufs qui passeront l'hiver. Ce phénomène d'alternance des deux modes de reproduction, connu sous le nom de parthénogénèse cyclique, est une réponse adaptative à la saisonnalité et caractérise les espèces dites holocycliques (Simon et al. 2010). La production des sexués est sous contrôle de la photopériode (longueur de la nuit), bien que la température puisse moduler ses effets (Simon et al. 2010). L'absence de fécondation durant la parthénogénèse permet aux embryons de débiter leur développement dès l'ovulation à l'intérieur même de leur mère encore à l'état d'embryon dans sa propre mère. Ce phénomène, portant le nom de télescopage des générations, raccourcit considérablement le temps de développement des pucerons (Kindlmann & Dixon 1989 ; Dixon 1990, 1998). Comme nous avons pu l'évoquer en introduction (§ 3.3.2), il existe un polymorphisme génétiquement déterminé du mode de reproduction des pucerons impliquant des clones holocycliques, anholocycliques et intermédiaires (Simon et al. 2002). Notons également la présence de clones androcycliques produisant uniquement des mâles se reproduisant avec les femelles sexuées des clones holocycliques (Simon et al. 1991). Certaines espèces présentent même exclusivement des lignées parthénogénétiques et sont dites apomictiques comme c'est le cas pour le puceron géant du saule, *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) (Aphididae) (Blackman & Spence 1996).

Les Adelgidae et les Phylloxeridae ont conservé un caractère primitif puisque les femelles parthénogénétiques sont ovipares tandis que chez les Aphididae, la reproduction asexuée s'accompagne de la viviparité (Blackman & Eastop 1994 ; Havill & Footit 2007). Chez les Aphididae, on distinguera donc les femelles sexuées ovipares aptères, les mâles et les femelles parthénogénétiques vivipares (aptères ou ailées selon les espèces) (Hille Ris Lambers 1966). La présence d'individus ailés est indispensable à la dispersion. Cette plasticité phénotypique (ou polyphénisme) qui se manifeste par la succession de différents morphes au cours du cycle de vie d'une même espèce caractérise le cycle biologique des pucerons (Hille Ris Lambers 1966 ; Moran 1992). Chez les pucerons des arbres, le polyphénisme est réduit et comporte généralement trois morphes, comme chez le puceron de l'érable

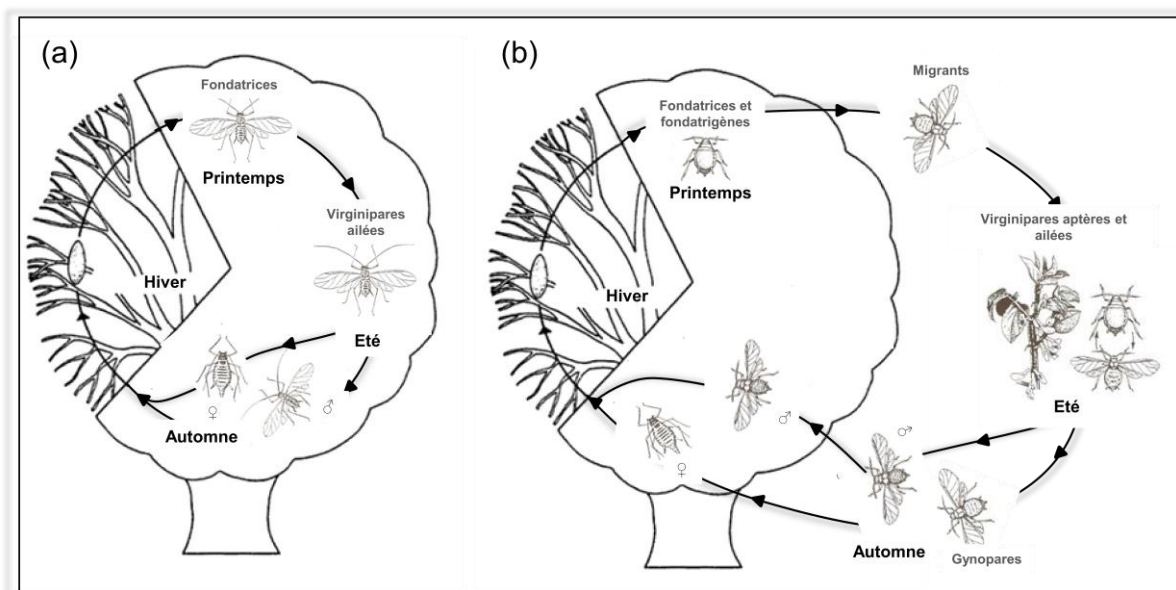
*Drepanosiphum platanoides* (Schrank) (Aphididae) : femelles parthénogénétiques ailées, mâles ailés et femelles ovipares aptères (Dixon 1969).

#### 1.1.1.2. Place de l'hôte ligneux dans le cycle de vie

La grande majorité des espèces de pucerons sont monoéciques et effectuent leur cycle de vie sur le même hôte, tandis que d'autres sont hétéroéciques ( $\approx 10\%$  des espèces) et alternent obligatoirement entre deux plantes hôtes généralement sans lien taxonomique.

Les espèces monoéciques vivent généralement sur les arbres (Williams & Dixon 2007). Chez ces dernières, les femelles fondatrices issues de l'éclosion des œufs d'hiver sont semblables aux autres morphes. Elles initient le développement de générations parthénogénétiques (femelles virginipares) qui se succèdent avant de produire les sexupares à l'automne. Les sexupares donneront naissance aux sexués mâles ou femelles (Fig. 1.1a).

Chez les espèces hétéroéciques, l'hôte ligneux constitue l'hôte primaire sur lequel se produit la reproduction sexuée et l'hivernation, tandis que l'hôte secondaire sera une plante herbacée ou un arbuste sur lequel la reproduction est exclusivement parthénogénétique (Dixon 1998, 2005 ; Moran 1992). L'alternance d'hôtes est très répandue dans certaines sous-familles d'Aphididae (e.g. Aphidinae, Anoeciinae, Hormaphidinae et Eriosomatinae) (Blackman & Eastop 2000, 2006) et chez les Adelgidae dont les hôtes primaires et secondaires sont des conifères appartenant à des genres différents (Blackman & Eastop 1994 ; Havill & Footitt 2007). Le cycle des espèces hétéroéciques est complexe mais peut se résumer de la façon suivante (Fig. 1.1b) : un cycle typique débute par l'accouplement et le dépôt des œufs d'hiver sur l'hôte primaire où les femelles fondatrices initient le développement des colonies de femelles fondatrices aptères. Ces dernières produisent les pucerons ailés au printemps qui migrent vers l'hôte secondaire sur lequel les colonies se développent exclusivement par parthénogenèse thélytoque (femelles virginipares aptères et ailées). Enfin, les virginipares finissent par donner naissance aux mâles et aux gynopares ailés (femelles donnant des femelles ovipares aptères) qui retournent sur l'hôte primaire pour l'accouplement et l'hivernation. Deux principales hypothèses sont proposées pour expliquer l'alternance d'hôte : (1) 'la spécialisation de la fondatrice', selon laquelle il y a passage au printemps d'un hôte ligneux vers un hôte herbacé plus favorable nutritionnellement, mais l'adaptation de la fondatrice à l'hôte primaire oblige un retour vers ce dernier (Moran 1988, 1990) ; (2) l'hypothèse adaptative, selon laquelle l'alternance d'hôte correspond à une utilisation optimale des ressources nutritives (Mackenzie & Dixon 1991).



**Fig. 1.1** Représentation schématique du cycle de vie d'un puceron (a) monoécique et (b) hétéroécique (d'après Blackman & Eastop 1994 ; Williams & Dixon 2007)

### 1.1.2. Spécialisation à l'arbre hôte

Il existe un continuum dans la spécificité à un hôte, allant des généralistes aux spécialistes avec toutefois une large prédominance de la stratégie spécialiste (Jaenike 1990 ; Shoonhoven et al. 2005). Eu égard à leur mode de vie parasitique (parasite du phloème) qui impose des contraintes sélectives fortes, les pucerons n'échappent pas à cette règle et présentent un haut degré de spécialisation à la plante hôte (Eastop 1973), les plaçant parmi les insectes les plus spécialisés (Peccoud 2010). Plus de la moitié des espèces de puceron effectuent tout leur cycle de vie sur une seule espèce de plante hôte et certains genres de puceron sont associés à un genre de plante hôte particulier ou plusieurs genres très proches (espèces monophages et oligophages) (Eastop 1973). Ainsi, les espèces du genre *Cinara* (Aphididae) sont toutes associées au genre *Pinus* (Pinaceae) et certaines espèces sont même spécialisées sur une seule ou deux espèces (Favret & Voegtlin 2004). De même, toutes les espèces de la sous-famille Chaitophorinae sont associées aux genres *Salix* et *Populus* (Salicaceae) (Blackman & Eastop 1994). Chez les espèces hétéroéciques, la gamme d'hôtes primaires ligneux est généralement restreinte tandis que celle de l'hôte secondaire peut être large et diversifiée avec des espèces pouvant être polyphages et ravageuses de grandes cultures (1 % des Aphididae) (Peccoud et al. 2010 ; Jousselin et al. 2010). Ainsi tous les hôtes primaires des espèces du genre *Pemphigus* (Aphididae) appartiennent à l'espèce *Populus* (Abbot & Withgott 2004), tandis que les hôtes secondaires englobent de nombreuses espèces d'Asteraceae (Miles 1989b ; Miller et al. 2005).

### 1.1.3. Adaptation à la saisonnalité de l'arbre hôte

Les pucerons des arbres vivent dans un environnement saisonnier très contrasté, nutritionnellement très favorable au printemps et à l'automne et pauvre en été à la maturité du feuillage (Mordvilko 1908). Au printemps, la croissance des feuilles crée une forte demande en azote (ou puits d'azote) puisque les feuilles constituent le compartiment majeur de stockage des composés azotés (protéines et acides aminés libres). Cette demande en azote chute à la maturité du feuillage en été. En automne, l'azote foliaire est remobilisé, recyclé et stocké sous forme d'acides aminés et de protéines dans les parties pérennes de l'arbre (Morot-Gaudry 1997). Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'hétéroécie pourrait constituer une réponse adaptative à cette variation saisonnière de la qualité nutritionnelle de l'arbre (Mackenzie & Dixon 1991). Certaines espèces monoéciques associées aux feuilles, comme *Drepanosiphum platanoïdes*, initient une diapause reproductive durant la période estivale (Hille Ris Lambers 1966 ; Dixon 2005). Chez de telles espèces la synchronisation de l'éclosion des œufs avec le débourrement des bourgeons et la synchronisation de la reproduction sexuée avec la chute des feuilles sont clairement des avantages sélectifs (Dixon 2005).

### 1.1.4. Dynamique des populations

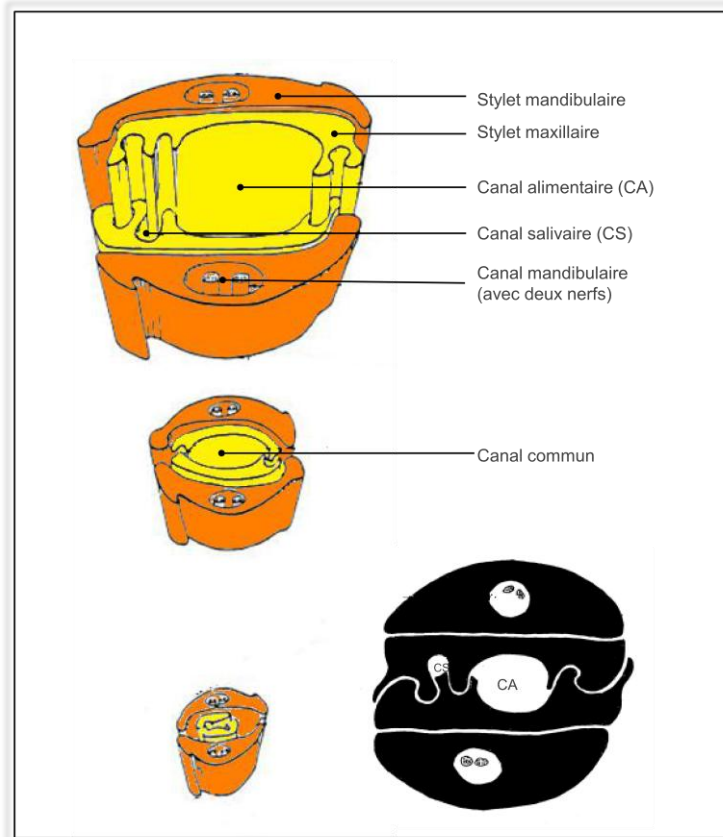
La dynamique annuelle des populations de pucerons des arbres se caractérise par une évolution de la densité saisonnière des populations marquée par un pic d'abondance à la fin du printemps et un second plus ou moins marqué à l'automne selon les espèces. Cette densité saisonnière ne résulte pas uniquement de l'évolution saisonnière de la qualité nutritionnelle de l'arbre mais aussi de facteurs densité-dépendants liés à la compétition intraspécifique. Le déclin estival est initié par la migration résultant de la compétition intraspécifique pour la ressource et son intensité dépend du degré avec lequel la qualité nutritionnelle de l'arbre hôte diminue (Dixon 1970, 1971c, 2005 ; Dixon et al. 1993 ; Dixon et al. 1996 ; Sequeira & Dixon 1997 ; Kindlmann & Dixon 1996). Chez les pucerons des arbres, il existe une corrélation négative entre l'abondance des pucerons émergeant des œufs au printemps (fondatrices) et le taux d'accroissement des populations à l'automne (femelles ovipares) connue sous le nom d'effet '*dents-de-scie*' (Dixon 1971c, 2005). En effet, un grand nombre de pucerons au début du printemps induit une forte compétition intraspécifique qui peut : (1) avoir un effet négatif sur la qualité nutritionnelle de la plante hôte à l'automne (e.g. pucerons du pacanier, Wood et al. 1985 ; Alverson & English 1990 ; Bumroongsook & Harris 1991), (2) induire une réduction de la taille des pucerons affectant positivement le taux de migration et/ou négativement le potentiel d'accroissement de la population lors du pic automnal (puceron du sycomore *Drepanosiphum platanoïdes*, Dixon 1971c), (3) exercer ces deux effets simultanément. Les fluctuations de populations des espèces présentant un effet '*dents-de-scie*' se caractérisent par des pics d'abondance cyclique entre les années

(souvent des cycles bisannuels) puisqu'une réduction de la croissance des populations à l'automne conduira à une faible population au printemps suivant permettant une croissance plus importante des populations à l'automne (Dixon 1971c). Cette régularité dans la fluctuation des populations est une caractéristique commune aux pucerons des arbres à feuilles caduques et des conifères (Dixon 2005). Le climat et les ennemis naturels peuvent occasionnellement modifier un tel système (Jarošik & Dixon 1999 ; Dixon 2005).

### 1.1.5. Mode d'alimentation et adaptations associées

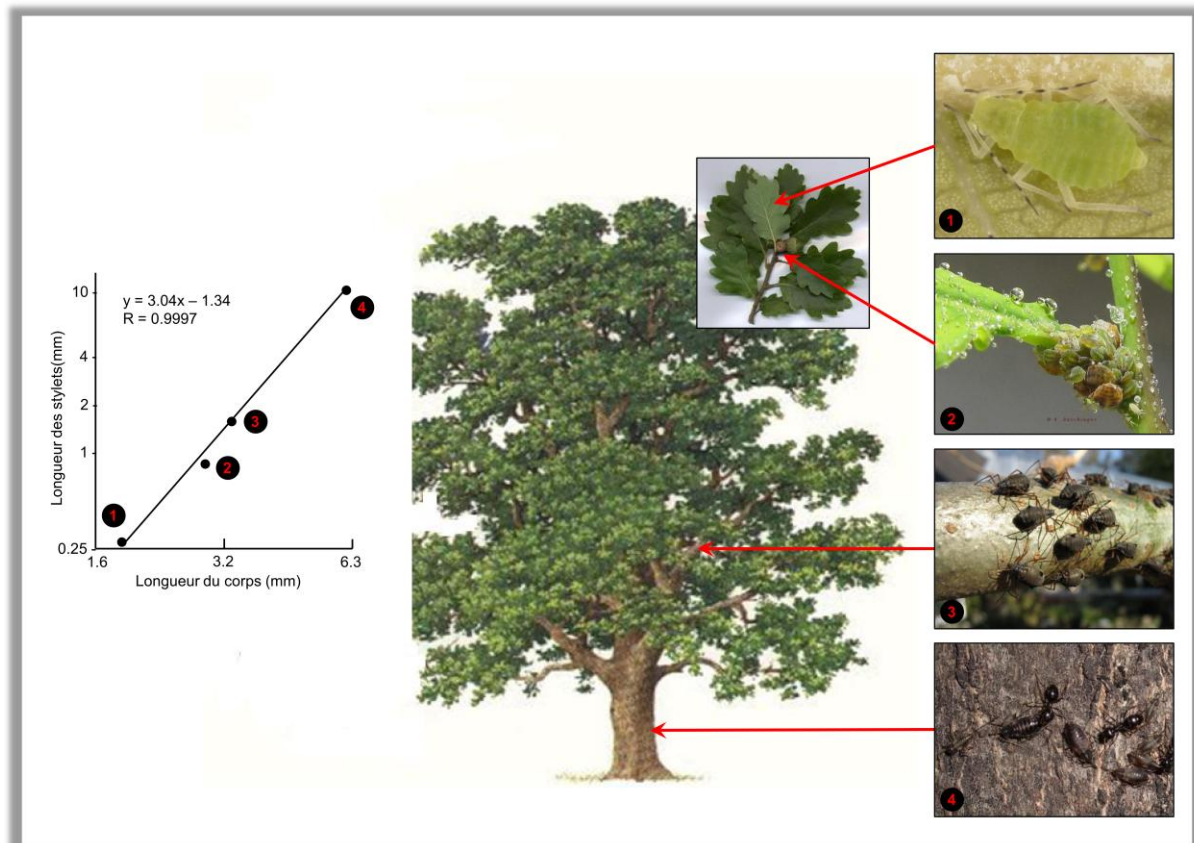
La plupart des pucerons se nourrissent de sève élaborée qu'ils prélèvent au niveau du phloème grâce à leurs pièces buccales modifiées en stylets (Douglas 2003). Elles sont composées de deux mandibules externes et de deux maxilles internes formant un canal salivaire et un canal alimentaire puis, à l'extrémité, un canal commun (Fig. 1.2) (Miles 1999). La sève élaborée est conduite passivement dans le canal alimentaire par la pression de turgescence des tubes criblés du phloème. L'alimentation par succion active est ponctuellement observée lors de la consommation de sève brute (au niveau du xylème) pour compenser un stress hydrique (Tjallingii 1994). La sève élaborée est un substrat alimentaire déséquilibré car riche en carbone (saccharose) mais pauvre en acide aminés essentiels (leucine, tryptophane, méthionine) non synthétisés par les pucerons (Douglas 2003). Ces derniers sont alors fournis par un endosymbionte bactérien mutualiste obligatoire (primaire), *Buchnera aphidicola* situées dans des cellules spécialisées nommées bactériocytes et transmis par la femelle à sa progéniture lors de la production des gamètes (transmission verticale ; Douglas 1998).

Les pucerons se développant sur les feuilles, les pétioles, les aiguilles et les bourgeons, où le phloème est facilement accessible, ne présentent pas d'adaptations particulières. Un petit nombre d'espèces induit cependant des déformations d'organes (ou pseudogalles) ou des proliférations cellulaires anormales (hyperplasies) à l'origine de galles (Miles 1989a,b, 1990 ; Quisenberry & Ni 2007). Les galles présentent souvent une structure complexe (galles organoïdes) (Shorthouse & Rohfritsch 1992 ; Stern & Foster 1995). Leur fonction principale est nutritive mais elles offrent également une protection pour la femelle et sa progéniture (Wool 2004). Les Adelgidae (e.g. *Adelges* spp.), les Phylloxeridae (e.g. *Phylloxera* spp. sur le pacanier) et les Aphididae des sous-familles Eriosomatinae (*Pemphigus* spp.) et Hormaphidinae (e.g. *Hormaphis* spp.) sont les principaux groupes concernés (Auclair 1963 ; Pollard 1973 ; Miles 1989b ; Wool 2004). Ce sont essentiellement des espèces hétéroéciques qui induisent les galles sur leur hôte primaire ligneux (Wool 2004), comme les espèces du genre *Pemphigus* sur les pétioles de feuilles de peuplier ou *Adelges abietis* (L.) sur les bourgeons d'épicéa (Miles 1989b).



**Fig. 1.2** Représentation schématique de l'anatomie du système buccal piqueur-suceur des pucerons en coupes transversales (d'après Miles 1999)

Les pucerons se développant sur les parties lignifiées nécessitent des adaptations morphologiques spécifiques, telles que de très long stylets pour pouvoir atteindre le phloème situé en profondeur sous l'écorce (Dixon 1997 ; Dixon et al. 1995). En conséquence, chez les pucerons des arbres, il existe une corrélation positive entre la taille du proboscis et la profondeur de localisation du phloème (Dixon 1997, 1998). Le fonctionnement d'un long proboscis nécessite d'être associé à une grande taille du corps, il existe donc en parallèle un accroissement de la taille du corps des insectes (Dixon 1997, 1998). Par exemple, les espèces de Lachninae, essentiellement associées aux parties lignifiées du tronc et des branches, sont toutes des espèces de grande taille (Pollard 1973). Certaines espèces présentent des adaptations morphologiques supplémentaires, telles qu'un allongement disproportionné de la taille des stylets. C'est le cas par exemple de *Stomaphis quercus* (L.) (Aphididae) dont la longueur des stylets fait approximativement le double de la taille du corps afin de s'alimenter sur le tronc de chênes matures (Dixon 1998). En prenant l'exemple des pucerons associés au chêne, la figure 1.3 illustre la corrélation positive qui relie la taille du corps des pucerons des arbres, la longueur de leurs stylets et la niche occupée par l'espèce (Dixon 1998). Les jeunes stades possèdent généralement de longs stylets disproportionnés puisque leur taille reste constante au cours des différentes mues (Balch 1952 ; Mittler 1954).



**Fig. 1.3** Relation entre la longueur du corps et celle des stylets (échelle logarithmique) de quatre espèces de pucerons du chêne (Aphididae) associées à différents sites d'alimentation : (1) *Tuberculatus annulatus* (Hartig), (2) *Thelaxes dryophila* (Schrank), (3) *Lachnus roboris* (L.) et (4) *Stomaphis quercus* (L.) (d'après Dixon 1998)

La corrélation positive qui existe entre la taille des stylets et du corps et la profondeur de localisation du phloème implique également que les espèces de petite taille ne seront pas capables d'atteindre le phloème situé en profondeur sous l'écorce (Dixon 1997, 1998). Chez ces dernières, les stylets restent donc localisés au niveau du cortex<sup>5</sup>. Ces espèces induisent fréquemment des gonflements tumoraux non structurés, ou galls histoiodes, au niveau des racines et/ou des parties ligneuses aériennes (Müllick 1977 ; Rohfritsch 1990 ; Shorthouse & Rohfritsch 1992 ; Stern & Foster 1995 ; Forneck et al. 2002 ; Kellow et al. 2004). Les cellules tumorales forment un tissu nourricier dans lequel peuvent s'accumuler des acides aminés et de l'amidon favorisant le développement du puceron (Miles 1989a). Par exemple, sur les racines et les parties aériennes du pommier, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) (Aphididae) induit une division active (hyperplasie) des cellules du cambium.

<sup>5</sup> Cortex : tissus situés entre l'épiderme et le système vasculaire (Esau 1977)

Celle-ci aboutit à la formation d'un gonflement constituée d'un parenchyme cortical<sup>6</sup> hypertrophié et d'un xylème non fonctionnel qui se propage aussi bien latéralement que radialement (Staniland 1924 ; Jeanneau 1968 ; Brown et al. 1991). Le phylloxera de la vigne, *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch (Phylloxeridae) induit la formation de galles au niveau des racines de vigne suite à une prolifération cellulaire anormale des cellules du parenchyme phloémien<sup>7</sup> (Granett et al. 2001 ; Forneck et al. 2002 ; Kellow et al. 2004). Les galles ne sont pas toujours visibles extérieurement. C'est le cas par exemple du puceron lanigère du sapin, *Adelges piceae* (Ratzburg) (Adelgidae) qui induit la formation d'un parenchyme cortical hypertrophié et un élargissement des cellules de xylème sur le tronc et les branches de son hôte secondaire, le sapin de Fraser, sans que des gonflements ne soient visibles extérieurement (Balch 1952 ; Balch et al. 1964 ; Müllick 1977; Rohfritsch 1990).

## 1.2. LES INTERACTIONS ARBRES-PUCERONS

Les interactions arbres-pucerons englobent l'ensemble des étapes qui interviennent dans la sélection et la colonisation de l'hôte par le puceron et des caractéristiques et réactions de l'arbre qui affectent les préférences et les performances des pucerons, et par là-même le processus de colonisation (Pickett et al. 1992 ; Prado 1997 ; Powell et al. 2006 ; Pettersson et al. 2007).

### 1.2.1. Etapes de la sélection et de la colonisation de la plante hôte

La sélection et la colonisation de la plante hôte résultent d'une succession de séquences comportementales, impliquées dans la localisation de l'hôte, la sélection du site d'alimentation et l'acceptation de la plante hôte qui constitue l'étape ultime du processus de colonisation. Ces étapes sont guidées par la perception de signaux visuels, olfactifs, gustatifs et tactiles impliqués dans la reconnaissance de la nature hôte ou non-hôte de la plante (Niemeyer 1990, 1991 ; Pickett et al. 1992 ; Powell et al. 2006 ; Pettersson et al. 2007). L'ensemble des étapes a principalement été décrit chez les Aphididae d'intérêt économique pour les plantes cultivées incluant les arbres des vergers (Caillaud & Niemeyer 1996).

---

<sup>6</sup> Parenchyme cortical : tissu continu du cortex des tiges et des racines formé de cellules parenchymateuses. Les cellules parenchymateuses sont capables de croître, de se diviser et sont impliquées dans les fonctions réparatrices et de stockage (Esau 1977)

<sup>7</sup> Parenchyme phloémien : le phloème renferme des cellules parenchymateuses dont certaines sont intimement associées aux tubes criblés : les 'cellules compagnes' (Esau 1977)

### 1.2.1.1. Localisation de l'arbre hôte

La localisation d'un nouvel arbre hôte s'effectue par les morphes ailés particulièrement adaptés à la dispersion à courte, moyenne et longue distances grâce à la présence d'ailes et d'un système sensoriel bien développé (Dixon 1998 ; Lombaert et al. 2006), tandis que les morphes aptères investissent l'énergie dans la reproduction et le développement local des colonies. Toutefois, Hoyt & Madsen (1960) ont montré que la dispersion active entre arbres chez le puceron lanigère du pommier, *Eriosoma lanigerum* était principalement réalisée par le premier stade larvaire très mobile et il n'est pas exclu que la dispersion passive par le vent en lien avec la sécrétion de cire intervienne également.

L'orientation des pucerons et l'atterrissage sont sous l'action de stimuli visuels et olfactifs. Les morphes ailés sont capables de s'orienter au cours du vol migratoire à moyenne distance grâce à la perception de signaux visuels non spécifiques (Dixon 1998 ; Kennedy et al. 1961). A proximité immédiate de la plante, les pucerons ne sont plus sensibles aux stimuli visuels (Robert 1987) et l'orientation du vol est guidée par les odeurs spécifiques de la plante (Chapman et al. 1981 ; Hardie et al. 1994 ; Powell et al. 1995). Parmi les composés impliqués dans l'attraction et/ou la répulsion des pucerons, on peut citer les composés soufrés, les composés cyanogènes, les benzaldehydes ou les composés organiques volatiles (COVs) (Pickett et al. 1992 ; Hori 2007 ; Nottingham et al. 1991 ; Holopainen et al. 2010). Bien que le comportement d'atterrissage puisse être guidé par la perception des signaux visuels et olfactifs, il semble le plus souvent s'effectuer aléatoirement et la discrimination de la nature hôte ou non hôte de la plante s'effectue au cours des étapes qui succèdent à l'atterrissage (Kennedy et al. 1959 ; Kring 1972 ; Ward et al. 1998).

### 1.2.1.2. Sélection du site d'alimentation

Après avoir atterri sur l'arbre, le puceron réalise trois séquences comportementales pouvant aboutir à la phase d'alimentation :

❖ La première étape, guidée par des stimuli chimiques et mécaniques, consiste à sélectionner le site de piqûre. Pour cela, les pucerons prospectent la surface de la plante avec leurs antennes portant les sensilles olfactives ainsi que leurs tibias et l'extrémité de leur labium qui portent des soies mécanoréceptrices. Ainsi, ils peuvent évaluer les propriétés physico-chimiques (COVs, cires cuticulaires, exsudats de trichomes, texture, topologie) de surface avant l'insertion des stylets dans les tissus de la plante (Niemeyer 1990 ; Pickett et al. 1992 ; Powell et al. 1999, 2006).

❖ La seconde étape intervient lorsque les caractéristiques physico-chimiques de la plante perçues lors de l'étape précédente sont acceptées par le puceron. Les pucerons testent le contenu du

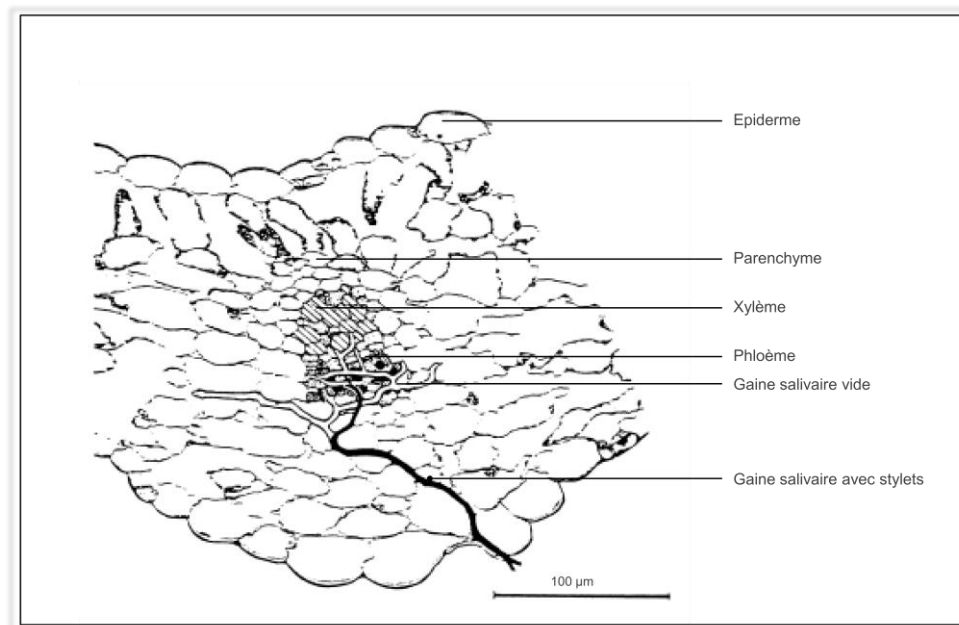
cytosol des cellules épidermiques par des piqûres de test brèves (< 1 min) (Powell 1991 ; Tjallingii & Hogen-Esch 1993). Les récepteurs gustatifs localisés dans la partie proximale du canal alimentaire sont impliqués dans la perception des métabolites intracellulaires primaires et secondaires (McLean & Kinsey 1984 ; Wensler & Filshie 1969). Ces piqûres gustatives ont lieu sur les plantes hôtes (Powell & Hardie 2000) et non-hôtes (Tosh et al. 2003) et semblent fournir suffisamment d'informations pour conduire soit au rejet d'une plante non-hôte soit à l'étape ultime de la recherche du site d'alimentation (Powell & Hardie 2000 ; Powell et al. 2006). Chez les espèces spécialistes, la perception de un ou deux composés secondaires semble suffire pour reconnaître une plante hôte, tandis que les généralistes ont besoin de percevoir une plus large gamme de métabolites incluant également les métabolites primaires (acides aminés et carbohydrates) (Douglas 2003 ; Powell et al. 2006).

❖ En cas de non-rejet, les pucerons insèrent leurs stylets entre deux cellules épidermiques puis poursuivent leur cheminement à travers les tissus par voie extracellulaire<sup>8</sup> au cours duquel ils réalisent de nombreuses piqûres intracellulaires brèves (de l'ordre de 50-100 piqûres de 5-10 s chacune au cours d'une phase de pénétration) (Tjallingii 1985b ; Tjallingii & Hogen Esch 1993). Ces brefs prélèvements de cytosol renseignent non seulement le puceron sur la qualité nutritionnelle et gustative de la plante mais également sur la localisation des stylets dans les tissus. Il semble que le puceron utilise la perception des métabolites intracellulaires et des facteurs apoplastiques (pH et gradient de saccharose) pour atteindre le phloème (Tjallingii & Hogen Esch 1993 ; Miles 1999 ; Hewer et al. 2008). Tout au long du cheminement des stylets, les pucerons synthétisent une salive gélifiante qui, en se solidifiant, forme une gaine salivaire (ou gaine sétale) dans laquelle les stylets peuvent glisser et être manœuvrés plus aisément par le puceron (Miles 1999). La gaine salivaire plus ou moins ramifiées laisse une empreinte de la zone prospectée par le puceron (Fig. 1.4). Les pucerons injectent également une salive liquide avant et après la pénétration dans les tubes criblés pour prévenir l'occlusion de ceux-ci par dépôt de callose ou coagulation de protéines P (phloémiennes) en réaction de la plante au stress mécanique infligé par les stylets (Tjallingii & Hogen Esch 1993 ; Prado 1997 ; Tjallingii 2006 ; Will & van Bel 2006). A l'heure actuelle, la phase de pénétration des stylets chez des pucerons s'alimentant sur les parties lignifiées a été très peu étudiée (Sandanayaka & Hale 2003 ; Kingston & Powell 2007 ; Cardoso 2007 ; Penteado 2007). Globalement, les quelques études réalisées montrent que la phase de pénétration est similaire à celle des espèces vivant sur les parties non lignifiées, hormis certaines différences liées à la nature des tissus ligneux et aux mécanismes de formation des galles pour les espèces non phloémophages. Par exemple, en étudiant le comportement alimentaire d'*Eriosoma lanigerum* sur l'écorce de tiges de pommier, Sandanayaka & Hale (2003) ont montré que la phase initiale de contact des stylets étaient plus longue du fait de la pénétration dans le suber (liège)

---

<sup>8</sup> Via l'apoplaste qui correspond au réseau de parois cellulaires en contact les unes avec les autres

de l'écorce. Ils ont également mis en évidence de nombreuses phases de salivation au cours du cheminement extracellulaire des stylets, dont ils suggèrent l'implication dans la formation de la galle. Enfin, en étudiant le comportement alimentaire du puceron lanigère du pin, *Pineus boernerii* Annand (Adelgidae) sur l'écorce du pin taeda, Cardoso (2007) a montré que le cheminement des stylets chez cette espèce s'effectuait sans piqûres intracellulaires.



**Fig. 1.4** Représentation schématique de la zone prospectée par le puceron pour atteindre le phloème avec les gaines salivaires vides ainsi que la gaine salivaire renfermant les stylets du puceron (d'après Tjallingii & Hogen Esch 1993)

### 1.2.1.3. Acceptation de l'arbre hôte

Chez les espèces phloémophages, la décision finale d'accepter la plante en tant qu'hôte se reflète par l'activité d'alimentation puisque les signaux induisant la parturition<sup>9</sup> sont généralement perçus avant le contact avec le phloème au cours de la phase de recherche du site d'alimentation (Tosh et al. 2003 ; Powell et al. 2006). La perception de la qualité nutritionnelle (métabolites primaires) et de la quantité du phloème ainsi que sa qualité gustative (métabolites secondaires attractifs, répulsifs, phagostimulants ou anti-appétants) jouent un rôle essentiel dans l'acceptation finale de l'hôte (Pettersson et al. 2007). Elle se traduit par une ingestion soutenue de phloème au moins supérieure à 10 min pouvant se prolonger pendant plusieurs heures (Prado & Tjallingii 1994). Celle-ci intervient souvent après une durée moyenne de plusieurs heures après l'accès à la plante (Prado & Tjallingii

<sup>9</sup> Parturition : dépôt des larves

1994 ; Pettersson et al. 2007). Par exemple, le puceron de l'érable *Drepanosiphum platanoides* initie une phase d'ingestion soutenue en moyenne 4 h après l'accès à des feuilles d'érable (Tjallingii unpublished data). Ce laps de temps ne semble pas différer entre espèces spécialistes et généralistes bien que ces dernières nécessitent de percevoir plus de signaux pour reconnaître leur plante hôte (Pettersson et al. 2007). A l'heure actuelle, on sait relativement peu de choses sur la phase d'acceptation de l'hôte chez les espèces non phloémophages. Les études réalisées ne sont que des études exploratoires qui ne permettent pas de tirer de conclusion générale quant à la phase d'acceptation et qui soulèvent des interrogations. Par exemple, Sandanayaka & Hale (2003) ont mis en évidence une phase d'ingestion soutenue chez *Eriosoma lanigerum* qui ressemblant à une ingestion dans le phloème, or on sait que cette espèce s'alimente normalement dans un tissu nourricier dont elle induit la formation. Concernant *Pineus boernerii*, Cardoso (2007) a mis en évidence une phase d'ingestion soutenue. Toutefois, n'ayant pas réalisé d'étude histologique en parallèle, les auteurs n'ont pas pu relier cette phase d'ingestion à un tissu particulier.

### 1.2.2. Mécanismes de résistance affectant le processus de colonisation

La résistance résulte de l'action des certaines caractéristiques de l'arbre sur les préférences et les performances de l'insecte. Selon leur impact sur le comportement et la physiologie de l'insecte, ces caractéristiques agissent selon trois catégories fonctionnelles de résistance (Painter 1951, 1958). La tolérance correspond à la capacité de la plante à compenser les dommages infligés par des niveaux de population d'insecte dommageables pour une plante sensible. Elle implique des caractéristiques telles que la vigueur générale de la plante, la croissance compensatoire et la cicatrisation (Panda & Khush 1995). La non-préférence (renommée antixénose par Kogan & Ortman (1978)) correspond à une altération du comportement de l'insecte conduisant à une faible ou non reconnaissance de la plante comme hôte. Elle est causée par différents caractères morphologiques, physiologiques et/ou phénologiques qui repoussent l'insecte ou dissuadent le comportement de nutrition ou d'oviposition/parturition (Panda & Khush 1995). Enfin, l'antibiose n'affecte pas le comportement et s'exprime par un effet antagoniste des caractéristiques chimiques et/ou de la qualité nutritionnelle de la plante sur la physiologie de l'insecte. Certains effets sont directement mesurables tels que la réduction de la fécondité, de taille/masse ou de longévité, l'augmentation du taux de mortalité ou du temps de développement des larves (Duffey & Stout 1996 ; Tomlin & Borden 1997 ; Kause et al. 1999 ; Nelson & Kursar 1999 ; Awmack & Leather 2002).

### 1.2.2.1. La qualité nutritionnelle de l'arbre

La composition nutritionnelle (surtout l'azote) peut intervenir dans la résistance des arbres puisqu'elle est le principal facteur influençant la croissance et la survie des pucerons (Douglas & van Emden 2007). Ce sont les variations de concentration en métabolites primaires entre saisons, au sein d'une espèce d'arbre (entre variétés ou génotypes), entre les différentes parties d'un même arbre ou encore pour des individus d'âges différents ou soumis à des conditions environnementales différentes qui peuvent intervenir dans les propriétés antibiotiques de l'arbre (Larsson 2002). Par exemple, Sandanayaka et al. (2005) ont suggéré que la mauvaise qualité nutritionnelle de certains génotypes de pommier pouvait être impliquée dans la résistance à *Eriosoma lanigerum*.

### 1.2.2.2. Les mécanismes de résistance des parties non lignifiées

L'acceptation ou le rejet de la plante hôte par les pucerons sur les parties non lignifiées des arbres impliquent non seulement des interactions avec des facteurs localisés dans le phloème, principale site d'alimentation de ces pucerons, mais aussi avec des facteurs rencontrés dans les tissus avant d'atteindre le phloème. Parmi les mécanismes de résistance constitutifs toujours présents et actifs, les trichomes<sup>10</sup> glandulaires ou non et les cires épicuticulaires constituent des premières barrières physiques et chimiques dissuasives efficaces (van Emden 2007). La densité des trichomes foliaires est impliquée dans l'antixénose mécanique, comme dans le cas des feuilles pubescentes de tilleul qui, une fois débarrassées de leurs trichomes, deviennent plus accessibles pour les larves du puceron du tilleul, *Eucallipterus tiliae* (L.) (Aphididae) (Dixon 1998). En revanche, les cires épicuticulaires engendrent une réponse comportementale liée à des composés chimiques dissuasifs (Bernays & Chapman 1994). Ce type d'antixénose chimique a été mis en évidence dans les feuilles de peuplier vis-à-vis de *Chaitophorus leucomelas* Koch (Alfaro-Tapia et al. 2007) et dans les aiguilles d'épicéa face à *Elatobium abietinum* (Walker) (Jackson & Dixon 1996). L'implication des trichomes glandulaires dans la résistance des arbres a été peu étudiée. Toutefois, leurs effets négatifs sur la survie et le comportement d'acceptation des pucerons sont avérés chez les plantes cultivées (Simmons et al. 2005). Enfin, des facteurs constitutifs apoplastiques et phloémiens à activité phagorépulsiive peuvent être impliqués dans les propriétés antixénotiques, comme c'est probablement le cas dans les feuilles du génotype de pêcher 'Rubira' résistant à *Myzus persicae* (Sulzer) (Sauge et al. 1998a, b). Dans le phloème, la présence de composés toxiques ou à action anti-digestive, non détectés par le puceron peut conduire à une antibiose (Dixon 1998).

<sup>10</sup> Trichomes : fines excroissances 'ou poils' présents au niveau des feuilles (Shoonhoven 2005)

Suite à une attaque d'insecte (ou un stress mécanique), l'arbre peut mettre en place des mécanismes de résistance induits locaux et immédiats (réponse hypersensible) ou retardés et systémiques (Mattson et al. 1988). La résistance peut tout d'abord être liée à une difficulté à contrer une réponse rapide de la plante. Ainsi, dans le phloème, le comportement d'acceptation du puceron peut être affecté par une difficulté à prévenir l'occlusion des tubes criblés par les dépôts de callose ou la coagulation de protéines phloémiennes (cf. § 1.2.1.2). Dans ce cas la résistance agit par antixénose. Le développement d'une réponse hypersensible, i.e. la mise en place d'une zone nécrotique résultant d'un processus de mort cellulaire autour des points d'insertion des stylets est une réponse observée chez plusieurs espèces d'arbres fruitiers. Elle est notamment impliquée dans les propriétés antixénotiques de certains génotypes résistants de pêcher vis-à-vis de *Myzus persicae* et de génotypes de pommier vis-à-vis de *Dysaphis plantaginea* (Passerini) (Biggs 1967; Sauge et al. 1998b, 2002 ; Alston & Biggs 1970). Il semblerait que cette réaction résulte de l'interaction entre les composés salivaires et les éléments de la paroi cellulaire (Sauge et al. 1998b). Les pucerons possèdent des pectinases qui pourraient agir sur les pectines de la matrice extracellulaire pour produire des oligosaccharides élicitant la synthèse de substances défensives telles que les composés phénoliques impliqués dans le processus de mort cellulaire (Campbell & Dreyer 1990 ; Ryan et al. 1990). Les composés phénoliques peuvent avoir une action toxique pour le puceron. Ainsi, l'action antixénotique de la réponse hypersensible peut s'accompagner d'un certain niveau d'antibiose comme c'est le cas pour *D. plantaginea* sur pommier (Lyth 1985). En réalisant des expériences de préinfestation, Sauge et al. (2002, 2006) ont mis en évidence une réponse induite dans le génotype de pêcher 'Rubira' vis-à-vis de *M. persicae*. Il s'agit d'une synthèse de métabolites secondaires à forte activité phagorépusive libérés dans l'espace extracellulaire du mésophylle et du phloème; conduisant à un renforcement de l'antixénose constitutive citée précédemment (Sauge et al. 1998b). Enfin, Ramírez et al. (2009) ont mis en évidence, au niveau des feuilles de peuplier, la mise en place d'une réponse systémique suite aux attaques de *Chaitophorus leucomelas*. Elle est liée à l'activation de gènes impliqués dans la synthèse d'inhibiteurs de protéases<sup>11</sup> localisés dans le phloème.

### 1.2.2.3. Les mécanismes de résistance des parties lignifiées

Les facteurs morphologiques tels que la dureté et l'épaisseur générale des tissus de l'écorce constituent une première barrière constitutive pouvant être impliquée dans une antixénose mécanique comme cela a déjà été montré pour les insectes xylophages (Wagner et al. 2002). Les structures présentes dans le cortex peuvent aussi induire une réponse comportementale chez le puceron puisqu'elles constituent une barrière à la pénétration des stylets au cours de la recherche du site

---

<sup>11</sup> Protéases : enzymes digestives des insectes

d'alimentation. Ainsi, des îlots de sclérenchyme bloquant le trajet des stylets du puceron lanigère du pommier, *Eriosoma lanigerum* sont impliqués dans les propriétés antixénotiques de certains génotypes de pommier (Staniland 1924). De même chez les conifères, les agrégats de lignine (ou stone cell masses) disséminés dans le phloème et le cortex, pourraient constituer des barrières rigides à la pénétration des stylets de pucerons.

Les parties lignifiées hébergent des pucerons qui s'alimentent dans le phloème et d'autres qui s'alimentent dans le cortex. Au niveau de l'écorce, les mécanismes de résistance aux pucerons phloémophages ne sont pas étudiés puisque ce sont globalement des espèces non dommageables pour les arbres (cf. § 1.3.2). Toutefois, on peut supposer que certains mécanismes cités précédemment puissent être impliqués. En revanche, il existe des mécanismes de résistance aspécifiques et localisés qui sont induits suite à une blessure mécanique ou à l'infection par un agresseur biotrophe (pathogènes et insectes phytophages) et qui peuvent être impliqués dans la réponse de l'arbre à une infestation par un puceron s'alimentant dans le cortex. Chez les conifères comme chez les feuillus, l'arbre hôte met en place une réaction hypersensible caractérisée par l'accumulation de substances défensives telles que des triterpènes<sup>12</sup>, des composés phénoliques<sup>13</sup> néosynthétisés ou des phytoalexines<sup>14</sup> conduisant à un processus rapide de mort cellulaire générant des lésions nécrotiques autour du point d'infection (Lieutier & Berryman 1988 ; Miles 1989a ; Biggs 1992). Ce type de réaction hypersensible est impliqué dans les propriétés antixénotiques de certains génotypes de pommier vis-à-vis d'*Eriosoma lanigerum* (Miles 1989b), et dans celles du sapin vis-à-vis d'*Adelges piceae* (Balch 1952 ; Balch et al. 1964 ; Müllick 1977). Les composés phénoliques accumulés peuvent être également directement toxiques pour le puceron. Dans ce cas, l'antixénose sera doublée d'une antibiose (Miles 1989b). Le niveau de résistance de l'arbre est relié à sa capacité à mettre en place rapidement ce type de réponse, comme c'est le cas par exemple pour les épicéas résistants aux attaques d'*Adelges abietis* (Rohfritsch 1988). Cette réaction hypersensible peut, dans certains cas, être complétée par la formation plus tardive d'un méristème secondaire traumatique (le 'périoderme de blessure') produisant une barrière subérifiée, comme chez le sapin de Fraser en réponse aux attaques d'*Adelges piceae* (Balch 1952 ; Balch et al. 1964 ; Müllick 1977). Cette zone réactionnelle en forme de demi-lune encadrant la zone de blessure ou le point d'infection vise à isoler l'agresseur et/ou à remplacer les tissus lésés (Biggs 1985 ; Miles 1989 ; Biggs 1992 ; Lieutier et al. 1990). La mise en place de cette zone résulte de la succession de deux événements caractéristiques débutant par la formation d'une barrière subéro-

---

<sup>12</sup> Triterpènes : substances d'origine organique en C30 de la famille des terpènes

<sup>13</sup> Composés phénoliques : composés chimiques aromatiques constitué d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (-OH) (Macheix et al. 2005)

<sup>14</sup> Phytoalexines : Composé antimicrobien de poids moléculaire faible, à la fois synthétisé et accumulé par la plante après avoir été exposé à des microorganismes (Paxton 1981)

lignifiée imperméable directement autour de la blessure qui offre une première protection face à d'éventuelles contaminations (Biggs et al. 1984, Biggs 1992, Oven & Torelli 1994, Weiland & Stanosz 2007). Puis, des divisions se produisent sous cette barrière, suite à une dédifférenciation des cellules du parenchyme cortical pour former le périoderme de blessure formé d'un phellogène<sup>15</sup> générant vers l'extérieur un suber réactionnel et un phelloderme vers l'intérieur permettant la régénération de l'écorce et la protection des tissus vasculaires.

### **1.3. ROLE DES PUCERONS DANS L'ECOSYSTEME FORESTIER**

#### **1.3.1. Interactions mutualistes arbres-pucerons**

Dans les écosystèmes forestiers naturels, les pucerons coexistent avec la communauté végétale via un réseau complexe d'interactions. Eu égard à leur mode de vie parasitaire, ils sont intimement associés à la vie de leurs arbres hôtes mais beaucoup d'incertitudes subsistent quant à leur rôle au niveau des communautés (Dixon 1998). Pour expliquer les possibles interactions mutualistes entre plantes et pucerons, Owen (1978, 1980) et Owen & Wiegert (1976) ont suggéré que la production de miellat par les pucerons pouvait accroître la fertilité du sol en augmentant la quantité d'azote disponible pour l'arbre au niveau de la rhizosphère. Le sucre présent dans le miellat tombant au pied des arbres infestés profiterait en effet à des bactéries fixatrices d'azote libres dans le sol, beaucoup plus nombreuses sous les arbres infestés de pucerons. Cette hypothèse est supportée par des expériences de laboratoire en microcosme dans lesquelles une augmentation significative de la fixation d'azote était observée (Petelle 1980, 1984). Toutefois, Kaye & Hart (1997) ont suggéré que la compétition pour l'azote entre les plantes et les microorganismes du sol pouvait être un mécanisme important dans la limitation de l'azote disponible pour l'arbre.

#### **1.3.2. Dégâts occasionnés par les pucerons en milieu forestier**

Les dégâts que les pucerons infligent à leurs arbres hôtes sont directement liés à leur mode d'alimentation puisqu'ils sont rarement vecteurs de phytovirus (Biddle & Tinsley 1967 ; Blackman & Eastop 1994). Les phytovirus affectent essentiellement les arbres des vergers à fruits qui sont les hôtes primaires des pucerons de la sous-famille des Aphidinae, principalement du genre *Myzus* et *Aphis* (Hullé 1998). On peut citer par exemple les arbres fruitiers à noyaux du genre *Prunus* (e.g. pêcher,

---

<sup>15</sup> Phellogène : cambium cortical mis en place par dédifférenciation de cellules du parenchyme cortical sous-épidermique et parfois par l'épiderme, destiné à produire du phelloderme vers l'intérieur et du suber (liège) vers l'extérieur (Esau 1977)

abricotier, prunier) affectés par le virus (ou potyvirus) de la Sharka (Plum Pox Virus ou PPV) véhiculé par *Myzus persicae*. Ces virus n'affectent pas les arbres mais le rendement et la récolte puisqu'ils rendent les fruits impropres à la consommation (Hullé 1998). En milieu forestier, les pucerons phloémophages induiront plutôt des dommages asymptomatiques ou des toxicoses (e.g. chloroses, nécroses), tandis que les pucerons dont les stylets sont localisés au niveau du cortex induiront plutôt des galles (Blackman & Eastop 1994 ; Quisenberry & Ni 2007)

#### 1.3.2.1. Dégâts asymptomatiques

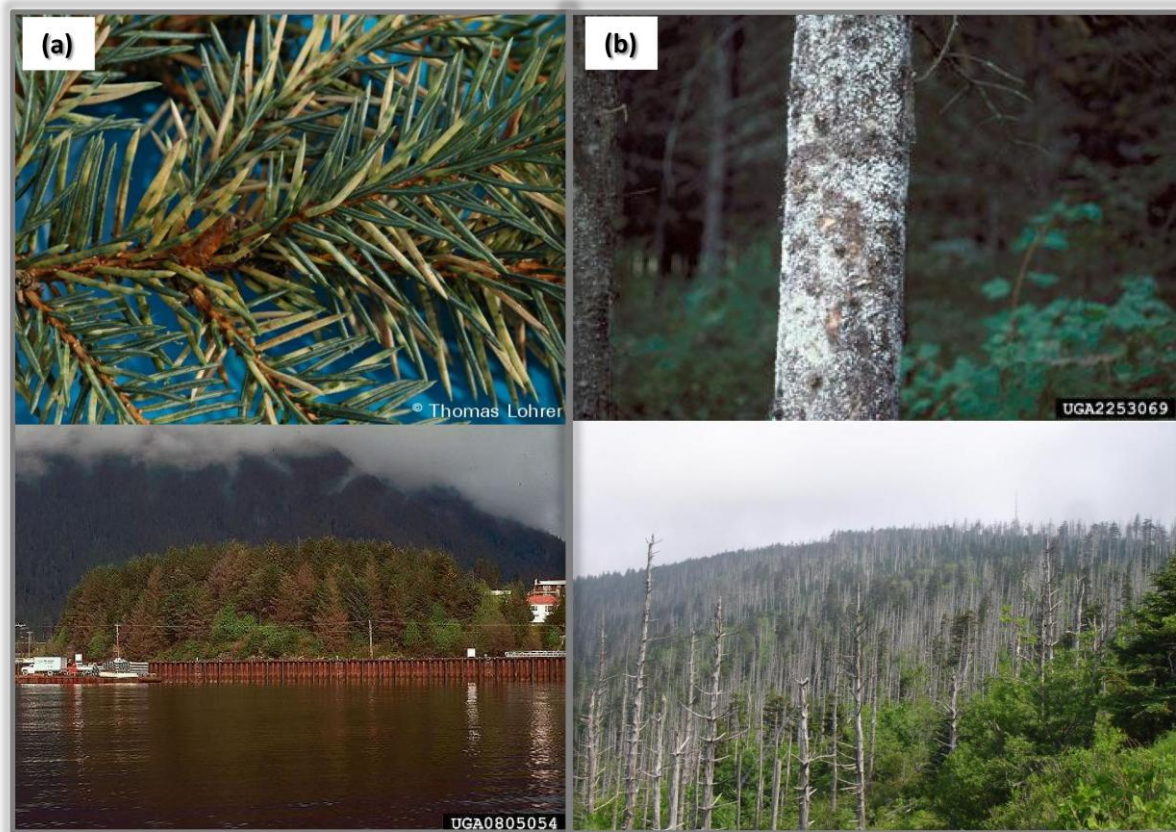
Les dégâts de pucerons sur essence forestière ne sont généralement pas apparents et se traduisent, lorsque les populations de pucerons deviennent très abondantes, par une réduction de la croissance ou de la valeur sélective<sup>16</sup> des arbres jeunes ou matures (Dixon 1971a,b ; Llewellyn 1972 ; Tedders et al. 1981 ; Tedders & Wood 1985 ; Wood & Tedders 1986 ; Wood et al. 1987 ; Collins et al. 2001b ; Smith & Showalter 2001). Ainsi, en observant les cernes d'accroissement d'érables, Dixon (1971a) a montré que les érables non infestés par *Drepanosiphum platanoides* pouvaient avoir une production de bois trois fois supérieur à celle des arbres infestés. Ce type de dégâts est généralement lié au détournement par les pucerons, essentiellement sur les feuilles, d'une grande partie des réserves nutritionnelles de l'arbre. Ainsi, la croissance du tilleul est directement affectée par la perte énergétique liée au prélèvement d'une grande quantité de sève (e.g. *Eucallipterus tiliae* (Dixon 1971b). Dans le cas de (e.g. *D. platanoides*), il semblerait qu'un autre mécanisme soit impliqué puisque les érables seraient capables de compenser cette perte énergétique induite par les pucerons (Dixon 1971a). Il est possible que la salive du puceron contienne une substance toxique pour l'arbre ou que l'alimentation du puceron (i.e. blessure mécanique ou composés salivaires) induise la synthèse d'un composé autotoxique pour l'arbre (Miles 1999). En cas de fortes densités des pucerons sur les feuilles, ce type de dégâts peut être amplifié par le développement de champignon (fumagine) sur le miellat qui réduit la pénétration de la lumière et la photosynthèse avec par exemple une diminution de 25-98 % chez le pacanier (Smith & Tedders 1980 ; Wood et al. 1988). Les réductions de croissance s'accompagnent généralement d'une chute précoce des feuilles ou des aiguilles (Dixon 2005).

---

<sup>16</sup> La valeur sélective correspond aux semences produites par un arbre qui participeront à la génération suivante

### 1.3.2.2. Dégâts symptomatiques

Contrairement aux exemples cités précédemment, certaines espèces de pucerons occasionnent des blessures dont les symptômes sont visibles et les dégâts plus importants telles que des toxicoses ou des déformations d'organes parfois à l'origine de galles (Miles 1989b, 1990 ; Quisenberry & Ni 2007). Les déformations (e.g. enroulement) et les galles induites sur les feuilles, les pétioles et les aiguilles (cf. § 1.1.5 de ce chapitre) ont un impact très négligeable sur les arbres causant essentiellement des problèmes d'ordre esthétique (Dixon 1998, 2005). En revanche, les toxicoses accélèrent la sénescence et sont parfois à l'origine de fortes défoliations ou de la mort des rameaux entraînant une réduction de croissance (Carter 1977 ; Straw et al. 1998, 2000). Par exemple, *Elatobium abietinum* induit des chloroses et l'abscission des aiguilles de l'épicéa de Sitka pouvant conduire à des défoliations de l'ordre de 39 % et des pertes de croissance de 11 à 22 % (Fig. 1.5a) (Miles 1989 ; Straw et al. 1998, 2000). Deux principales hypothèses sont proposées pour expliquer la formation des lésions chlorotiques : (1) l'hypothèse d'une interaction oxydative entre le puceron et la plante qui propose que l'alimentation du puceron perturbe la balance redox de la plante et (2) l'hypothèse d'une augmentation de la concentration en Mg-déchélatase causée par l'alimentation du puceron (Quisenberry & Ni 2007). Plus rarement, les pucerons sont impliqués dans la mort de l'arbre avec des conséquences écologiques ou économiques importantes, comme ce fut le cas avec la disparition du sapin de Fraser dans le Sud des Appalaches suite aux pullulations d'*Adelges piceae* (Fig. 1.5b) (Amman & Speer 1965 ; Alsop & Laughlin 1991 ; Orondo & Day 1994). En cas d'infestation sévères, les modifications tissulaires induites par le puceron provoque la mort de l'écorce profonde du tronc perturbant la translocation de la sève à l'origine de la mort des arbres (Balch 1952 ; Balch et al. 1964 ; Miles 1989b).



**Fig. 1.6** Symptômes et dégâts causés par les deux principales espèces de pucerons ravageuses forestières : (a) le puceron vert de l'épicéa *Elatobium abietinum* (Walker) et (b) le puceron lanigère du sapin *Adelges piceae* (Ratzburg) (sur son hôte secondaire, le sapin)

## 1.4. CONCLUSION

Dans cette première partie, nous avons pu souligner la complexité des interactions arbres-pucerons, liée principalement à la diversité des niches écologiques occupées par ces insectes. Une bonne connaissance des caractéristiques du puceron et de celles de la niche qu'il occupe permet d'appréhender les processus impliqués dans les interactions entre le puceron et son hôte et de comprendre les mécanismes impliqués dans la dynamique de ses populations. Il apparaît notamment primordial de connaître le mode d'alimentation d'un puceron puisque celui-ci conditionne non seulement la nature et l'importance des dommages occasionés par l'insecte mais aussi le type de mécanismes de résistance mis en jeu par l'arbre. A ce sujet, cette synthèse a mis en évidence la nécessité de développer les connaissances sur les interactions entre les arbres et les pucerons se développant sur les parties lignifiées. D'une part on sait relativement peu de choses sur le processus de colonisation de l'arbre par ces pucerons et, d'autres parts, il existe peu d'informations sur les mécanismes de résistance des arbres vis-à-vis de tels pucerons.

# Partie 2.

---

*Le système biologique étudié*



## Chapitre I. ~ Partie 2.

# Synthèse bibliographique : Le système biologique étudié

L'étude des interactions au sein d'un système biologique nécessite de bien connaître un certain nombre de caractéristiques des espèces impliquées. Dans cette seconde partie du chapitre de synthèse, nous présentons l'état des connaissances sur chacun des deux protagonistes de notre modèle d'interaction arbre-puceron : le peuplier et le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret). Plus particulièrement, il convient de resituer le peuplier dans le contexte forestier international et national et de faire l'état des lieux des problèmes entomologiques rencontrés en peupleraies. Sans toutefois détailler toutes les modalités des interactions peuplier-insectes phytophages, il convient d'évoquer les mécanismes physiques et physiologiques de la résistance qui interviennent dans l'interaction entre le peuplier et ses principaux insectes ravageurs. Enfin, le puceron lanigère étant une espèce relativement peu connue, nous faisons la synthèse des connaissances acquises préalablement à ce travail de thèse pour souligner ensuite certaines particularités.

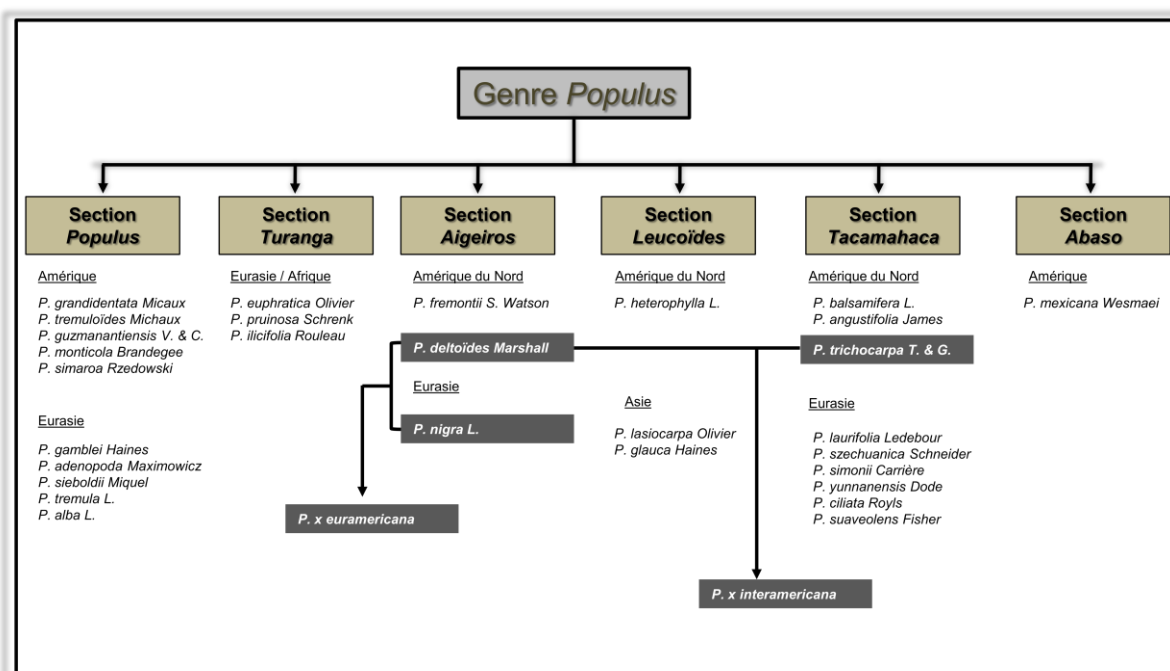
### 2.1. PEUPLIER ET INSECTES ASSOCIES

#### 2.1.1. Peuplier et populiculture

Le peuplier, arbre de lumière à feuilles caduques, se développe à l'état naturel dans les zones de ripisylve (Whitham et al. 1996). Le genre *Populus* comprend 29 espèces regroupées en six sections botaniques délimitées sur la base des caractéristiques écologiques et morphologiques (Fig. 2.1) (Zuffa 1975 ; Eckenwalder 1996). L'aire naturelle du peuplier occupe la quasi-totalité de l'hémisphère nord (Eckenwalder 1996). Trois espèces sont indigènes d'Europe : le peuplier noir (*P. nigra*), le peuplier blanc (*P. alba*) et le peuplier tremble (*P. tremula*). La section *Aigeiros* (peupliers noirs) comporte deux principaux représentants, *P. deltoides* originaire du centre de l'Amérique du Nord et *P. nigra* d'Eurasie. Au 18<sup>ème</sup> siècle, l'introduction de *P. deltoides* en Europe a conduit à des hybridations naturelles avec *P. nigra* indigène, donnant naissance aux premiers hybrides interspécifiques euraméricains (*P. x euramericana*, syn. *P. x canadensis*), parmi lesquels ont été sélectionnés les premiers génotypes plantés. Depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle en Europe, les génotypes commercialisés sont issus d'hybrides interspécifiques euraméricains et interaméricains (*Populus deltoides* x *P.*

*trichocarpa* : *P. x interamericana*, syn. *P. generosa*) issus d'une sélection clonale réalisée dans des instituts spécialisés en Italie, aux Pays-Bas et en France. Les hybrides sélectionnés ont une croissance rapide permettant des rotations inférieures à 20 ans dans les meilleures stations, une forte productivité en biomasse, des fûts rectilignes et présentent un comportement favorable vis-à-vis des contraintes biotiques et abiotiques (Villar et al. 1995).

Le succès du peuplier est lié à la facilité de sa multiplication par voie végétative, à sa croissance rapide et à sa capacité d'adaptation à différents types de sols (Villar 1998). De plus, sa culture présente des intérêts multiples. En plus de la production de bois pour l'industrie (déroulage, sciage, panneaux, pâte à papier, bois énergie et construction), la culture du peuplier est impliquée dans la phytoremédiation pour la protection des sols ou de l'eau et dans la séquestration du carbone (Ball et al. 2005). Toutes fonctions confondues, on compte 5.3 millions d'ha de plantations de peuplier dans le monde. Sa culture est bien développée en Europe, surtout en France (236 000 ha) qui est le 1<sup>er</sup> producteur européen et le 2<sup>ème</sup> producteur mondial derrière la Chine (4 300 000 ha) (source Commission Internationale du peuplier 2008).

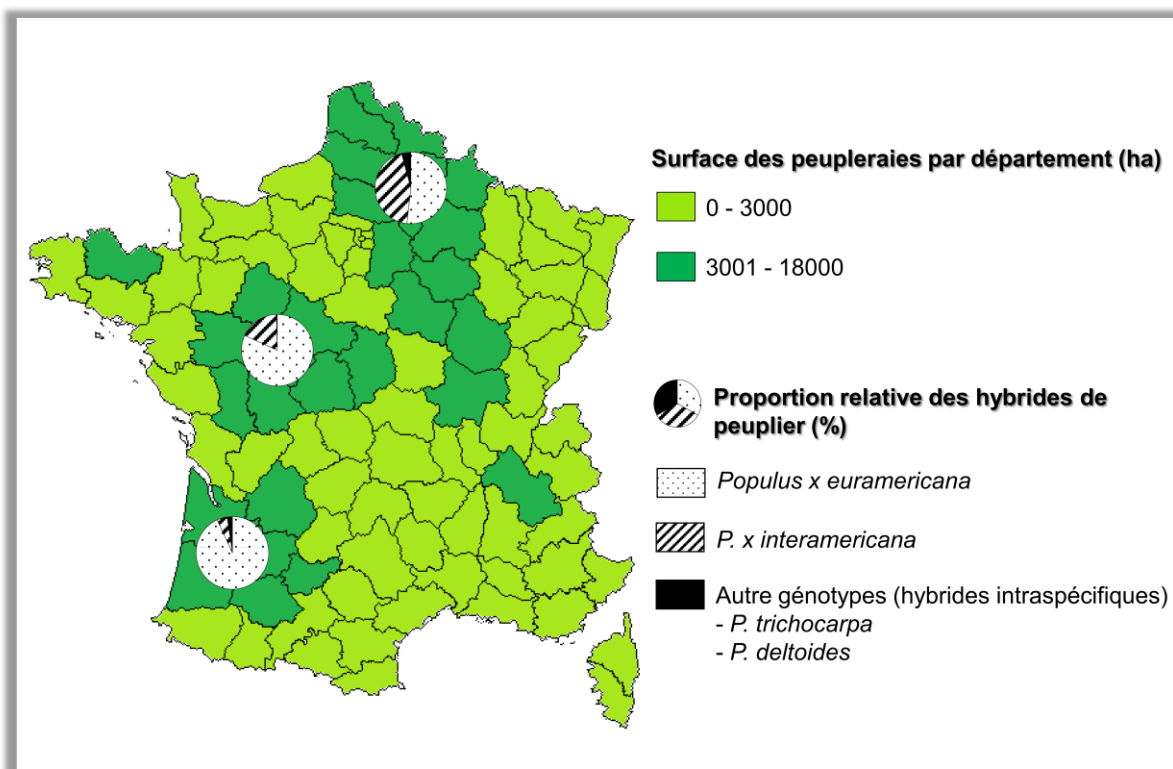


**Fig. 2.1** Classification des 29 espèces de peuplier regroupées en six sections botaniques (d'après Zsuffa 1975 et Eckenwalder 1996)

En France, les plantations de peuplier sont essentiellement des futaies à larges espacements, les taillis à courte rotation étant assez peu développés (Barnéoud et al. 1982). Au cours du dernier siècle, les surfaces de production en futaie sont passées de 100 000 ha en 1939 à près de 235 000 ha (source cadastre 2003) et une production annuelle de 1.5 million de m<sup>3</sup> de bois par an. L'essentiel de la

populiculture est regroupé en trois zones majeures (Fig. 2.2) : (1) la zone Nord-Est regroupant les régions Nord Pas de Calais, Picardie, Champagne-Ardenne et Bourgogne (86 277 ha), (2) la zone Centre-Ouest avec les régions Centre et Pays de la Loire (44 961 ha) et (3) la zone Sud-Ouest regroupant les régions Poitou-Charentes, Aquitaine et Midi-Pyrénées (51 975 ha) (source cadastre 2003).

Les peupleraies françaises présentent une faible diversité clonale, essentiellement constituée d'hybrides F1 *P. x euramericana* et *P. x interamericana*. Les problèmes pathologiques tiennent une place importante dans le choix des génotypes plantés et participent donc à la part relative de ces hybrides dans les plantations françaises. Les hybrides euraméricains, beaucoup moins sensibles aux rouilles foliaires, ont connu un regain d'intérêt malgré leur plus faible productivité et, pour les 20 années à venir, l'institut technologique FCBA (Forêt, Cellulose, Bois-construction, Ameublement) prévoit une forte augmentation de leur utilisation dans les peupleraies françaises (Thivolle-Cazat 2002). Bien que la France dispose d'un catalogue de 32 cultivars, seule une dizaine de génotypes (*P. x euramericana* : 'triplo', 'I214', 'Koster', 'Dorskamp', 'I45/51', 'Flevo', 'Polargo', 'Blanc du Poitou', *P. x interamericana* : 'Raspalje' et *P. trichocarpa* : 'Trichobel', 'Fritzi Pauley') constituent l'essentiel de la production, le génotype 'I214' étant largement majoritaire (Paillassa 2010). De même, selon les zones populières, il existe une variabilité de la composition génotypique des peupleraies (Fig. 2.2).



**Fig. 2.2** Principales zones populières (zones Nord-Est, Centre-Ouest et Sud-Ouest) et proportion relative des différents hybrides de peuplier plantés pour chacune des trois zones populières

### 2.1.2. Problèmes entomologiques du peuplier

A côté de sa sensibilité généralement élevée aux pathogènes (bactéries, virus, champignons) des feuilles, des tiges et des rameaux (Villar 1998), le peuplier possède l'un des cortèges d'insectes phytophages le plus diversifié par rapport aux autres espèces feuillues (Whitham et al. 1996). En Europe, le peuplier compte environ 525 espèces d'insectes et acariens phytophages, dont une grande majorité appartenant aux guildes des défoliateurs et des xylophages mangeurs de pousses ou foreurs. En peupleraie, peu d'espèces sont responsables de dégâts significatifs (Delplanque 1998).

Les espèces défoliatrices sont les plus représentées mais elles ne sont pas considérées comme un grand danger car le peuplier, comme tous les feuillus, peut tolérer la perte d'une partie importante de son feuillage sans que cela n'affecte sa survie ni même sa croissance. Seules les très larges défoliations (en général supérieures à 50 %) peuvent causer une perte significative de biomasse réduisant la productivité des plantations (Harrell et al. 1981 ; Coyle et al. 2002). Les chrysomèles (Coleoptera : Chrysomelidae) représentent l'essentiel des cas de défoliations avec par exemple 60 % des cas en France (Harrell et al. 1981 ; Maugard 2005). Les xylophages sont majoritairement des ravageurs secondaires<sup>17</sup> (Mattson et al. 2001 ; Maugard 2005). Ils créent des perforations dans le bois, le rendant impropre à certains usages (sciage, déroulage) et fragilisant les arbres. Ils augmentent aussi la sensibilité des arbres aux pathogènes (Klepzig et al. 1997 ; Philippe & Bohlmann 2007). Il s'agit principalement de Coléoptères (Cerambycidae et Curculionidae) et de Lépidoptères (Philippe & Bohlmann 2007 ; Maugard 2005). Les infestations d'insectes piqueurs-suceurs sur peuplier ont été jusqu'à ces dernières années très limitées (Leclant 1998 ; Coyle et al. 2005). Sur les 120 espèces de pucerons réparties dans 24 genres associées au peuplier (Blackman & Eastop 1994), seules quelques espèces d'Aphididae appartenant à deux sous-familles - les Pemphiginae (*Pemphigus* spp.) et les Eriosomatinae (*Chaitophorus* spp.) - peuvent causer des dommages occasionnels. Les premiers provoquent des galles sur les pétioles tandis que les seconds se développent sur les feuilles (Leclant 1998). Toutefois, la gestion des populations de pucerons est rarement recommandée puisque leurs ennemis naturels suffisent à maintenir leurs populations à des niveaux tolérables (Coyle et al. 2005).

### 2.1.3. Mécanismes de résistance du peuplier aux insectes

Les espèces et les génotypes de peuplier hybrides présentent des niveaux très variables de sensibilité pour de nombreux insectes (Robison & Raffa 1994 ; Havill & Raffa 1999). Toutefois les mécanismes impliqués dans de telles différences sont peu connus. Les variations de

---

<sup>17</sup> Ravageurs secondaire s: insectes qui s'attaquent à des arbres affaiblis, malades ou dépérissants

préférences/performances des insectes selon les génotypes de peuplier suggèrent une variété de mécanismes de résistance impliqués dans les propriétés antibiotiques et antixénotiques du peuplier. Ramírez et al. (2004) ont testé le niveau de résistance de 12 types de croisements de peuplier vis-à-vis du puceron des feuilles de peuplier *Chaitophorus leucomelas* Koch, montrant que les génotypes de parenté *Populus maximowiczii* étaient résistants. De même, 15 génotypes de peuplier de la section *Leucoïdes* affectent différemment le comportement de choix, le développement, la survie et la fécondité des chrysomèles *Chrysomela populi* L. et *C. tremulae* F. (Augustin 1991, Augustin et al. 1993). Enfin, les stades de vie de l'insecte peuvent être affectés par des mécanismes de résistance différents. Ainsi, les adultes de *Cryptorhynchus lapathi* sont affectés par les propriétés antixénotiques d'un génotype de peuplier de parenté *P. maximowiczii* qui inhibe l'oviposition, tandis que les larves sont affectées par les propriétés antibiotiques d'un autre génotype de parenté similaire qui affecte leur développement (Broberg et al. 2005 ; Broberg et Borden 2005).

Les mécanismes de résistance du peuplier impliquent diverses combinaisons de traits défensifs constitutives et induites impliquant des structures physiques défensives (e.g. structures anatomiques protectrices) et des composés chimiques (métabolites secondaires, enzymes et protéines). La phénologie de l'arbre joue également un rôle important dans la résistance de certains génotypes (Constabel & Major 2005 ; Philippe & Bohlmann 2007).

#### 2.1.3.1. Mécanismes de défense constitutifs

Le peuplier possède une première barrière constitutive formée de caractéristiques défensives physiques et chimiques (Philippe & Bohlmann 2007). Les trichomes foliaires et l'épaisseur de l'écorce constituent une première barrière évidente face aux insectes défoliateurs et xylophages (Philippe & Bohlmann 2007). Les performances des insectes peuvent être affectées par la qualité nutritionnelle des génotypes ou l'action toxique des métabolites secondaires. Les composés phénoliques tels que les phénolglucosides<sup>18</sup> sont les principaux métabolites secondaires impliqués dans la défense constitutive du peuplier (Palo 1984 ; Philippe & Bohlmann 2007). Bien qu'ils soient présents dans les feuilles et l'écorce, l'étude de leur implication dans la défense constitutive concerne principalement les insectes défoliateurs. Ils ont été bien étudiés chez le peuplier tremble qui contient quatre principaux phénolglucosides foliaires: la salicine, la salicortine, la trémuloïdine, la trémulacine (Lindroth et al. 1987a). La quantité et la nature des phénolglucosides fluctuent en fonction des espèces ou génotypes de peuplier, des saisons et des tissus (Palo 1984 ; Lindroth et al. 1987b ; Augustin 1991 ; Lindroth & Hwang 1996 ; Osier et al. 2000a,b ; Osier & Lindroth 2004). Ils ont une action antiappétante

---

<sup>18</sup> Phénolglucosides : composés phénoliques simples liés à une molécule de sucre (Macheix et al.2005)

dissuasive ou toxique et leurs niveaux constitutifs sont généralement corrélés négativement aux performances des insectes défoliateurs spécialistes ou généralistes (Tahvanainen et al. 1985 ; Lindroth & Hemming 1990 ; Augustin 1991 ; Hemming & Lindroth 1995 ; Osier et al. 2000a ; Osier & Lindroth 2001, 2004). En revanche sur certaines espèces, la salicortine peut avoir une action phagostimulante augmentant ainsi la sensibilité des génotypes (Augustin 1991).

La combinaison de caractéristiques défensives physiques et chimiques est souvent à l'origine de la résistance du peuplier. Ainsi, Yiping & Zhangyi (1993) ont montré que la résistance du génotype *Populus deltoides* cv 'Lux 69/55' au développement des larves du capricorne asiatique était lié à la teneur en lignine de l'écorce et à la faible qualité nutritionnelle de ce génotype. De même, les trichomes foliaires de *Populus alba* et les variations inter-génotypiques des niveaux constitutifs en composés phénoliques foliaires affectent directement le comportement de choix et la durée de développement des défoliateurs tels que les chrysomèles (Augustin 1991, Augustin et al. 1993).

#### 2.1.3.2. Mécanismes de défense induits

Les mécanismes de résistance induits chez le peuplier ont principalement été étudiés chez les espèces défoliatrices telles que la livrée des forêts (Robinson & Raffa 1997) et le bombyx disparate (Havill & Raffa 1999). Les défenses induites peuvent être locales ou activées de manière systémique. Elles peuvent agir directement sur l'insecte ou indirectement via l'attraction de ses prédateurs et parasitoïdes (défenses multitrophiques) (Philippe & Bohlmann 2007). Les signaux qui activent les défenses induites ne sont pas bien connus chez le peuplier.

Les composés phénoliques tels que les phénolglucosides et les tannins condensés<sup>19</sup> sont les principaux métabolites secondaires induits par l'alimentation des insectes défoliateurs (Palo 1984 ; Augustin 1991 ; Osier & Lindroth 2001 ; Peters & Constabel 2002 ; Stevens & Lindroth 2005). Les tannins condensés sont présents dans les feuilles et l'écorce et sont connus pour affecter indirectement les performances des insectes par action antigestive en diminuant la disponibilité des acides aminés disponibles par précipitation des protéines (Palo 1984) ou directement par effet toxique (Blytt et al. 1988 ; Hemming & Lindroth 1995 ; Hwang & Lindroth 1997). Enfin, l'émission locale et systémique de composés organiques volatils (COVs) formés de composés phénoliques simples ou de terpénoïdes<sup>20</sup> (mono- et sesqui- terpènes) contribue aux défenses du peuplier, directement par effet répulsif pour

---

<sup>19</sup> Tanins condensés : polymères de flavanols (ou catéchines) (Macheix et al. 2005)

<sup>20</sup> Terpénoïdes : classe large et diverse de composés organiques dérivant d'unités isoprène à cinq carbones assemblées et modifiées de façons variées (Schoonhoven 2005)

l'insecte et/ou indirectement en agissant comme molécules sémiochimiques impliquées dans les défenses indirectes (Havill & Raffa 2000 ; Arimura et al. 2004).

En complément, la synthèse de certaines protéines contribue aux défenses induites. Les inhibiteurs de protéase<sup>21</sup> et polyphénol oxydases<sup>22</sup>, affectent directement le développement des insectes par action antidigestive en réduisant l'absorption des acides aminés (Broadway & Duffey 1986 ; Ryan 1990 ; Felton et al. 1992 ; Constabel et al. 2000 ; Philippe & Bohlmann 2007). Ramírez et al. (2009) ont mis en évidence l'induction d'inhibiteurs de protéase dans les feuilles de peuplier suite à l'alimentation de *Chaitophorus leucomelas*. Toutefois, bien que leur induction ne fasse aucun doute, l'efficacité de ces protéines dans la défense du peuplier reste encore à prouver. D'autres protéines telles que les chitinases peuvent être également induites suite à un stress mécanique (Parsons et al. 1989 ; Clarke et al. 1998).

#### 2.1.3.3. Phénologie de l'arbre

Il existe une variabilité inter-génotypique de la date de débourrement au printemps (Witter & Waisanen 1978). Cette variabilité peut jouer un rôle important dans la résistance de certains génotypes de peuplier aux premiers défoliateurs de la saison de végétation. Ainsi, Donaldson & Lindroth (2008) ont montré que la variation de phénologie du débourrement étudiée sur 30 génotypes de peuplier tremble était particulièrement impliquée dans la variation de sensibilité des génotypes au Lépidoptères *Malacosoma disstria* au cours des années de pullulation de faible intensité.

---

<sup>21</sup> Inhibiteurs de protéase : protéines qui se lient aux enzymes digestive des insectes et les inactivent (Philippe & Bohlmann 2007)

<sup>22</sup> Polyphénol oxydases : enzyme qui catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinone (Philippe & Bohlmann 2007)

## 2.2. LE PUCERON LANIGERE DU PEUPLIER, *Phloeomyzus passerinii*

### 2.2.1. Une sous-famille, un genre et une seule espèce

L'insecte fut décrit pour la première fois en France par Signoret (1875) sur une espèce de peuplier indéterminée (*Populus* sp.) sous le nom de *Schizoneura passerinii*. Le nom de genre fut ensuite modifié en *Löwia* par Lichtenstein (1886), puis en *Phloeomyzus* par Horváth en 1896. Le genre *Phloeomyzus* fut successivement placé au sein de différentes tribus d'Aphididae (Pemphigini, Eriosomatini) avant que Mordvilko (1934) crée spécifiquement la sous-famille des Phloeomyzinae dont le genre *Phloeomyzus* est actuellement l'unique représentant. Plusieurs espèces furent successivement décrites [*Phloeomyzus redelei* Hille Ris Lambers (Hille Ris Lambers 1931) et *P. dubius* (Boerner) (Boerner & Schilder 1932) sur *P. nigra*, *P. dearborni* (Smith) (Smith 1974) sur *P. tremuloides*] mais finalement placées en synonymie avec *P. passerinii* (Doom & Hille Ris Lambers 1962 ; Smith 1974). Le genre *Phloeomyzus* ne semble donc comporter qu'une seule espèce (Blackman & Eastop 1994 ; Nieto-Nafría & Mier-Durante 1998). Une sous-espèce, *P. passerinii zhangwuensis* a néanmoins été décrite sur *Populus* sp. par Zhang en Chine (Zhang & Zhong 1982).

### Position systématique :

Ordre : Hemiptera

Sous-ordre : Sternorrhyncha

Superfamille : Aphidoidea

Famille : Aphididae

Sous-famille : Phloeomyzinae

Genre : *Phloeomyzus*

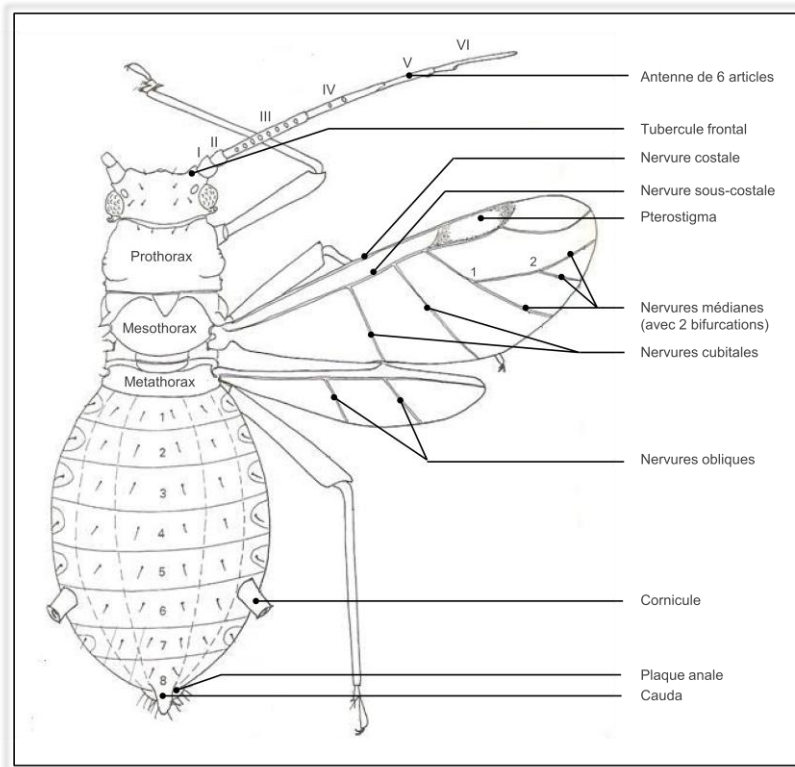
Espèce : *Phloeomyzus passerinii* (Signoret, 1875)

### 2.2.2. Identification taxonomique : singularité des caractères morphologiques

*Phloeomyzus passerinii* présente les critères d'identification taxonomiques spécifiques aux Aphididae (*sensu* Remaudière & Stroyan 1984) (Fig. 2.3), c'est-à-dire une viviparité lors de la phase de parthénogenèse, une rhinarie<sup>23</sup> primaire subterminale sur l'avant dernier segment antennaire et une autre sur le dernier segment, des stigmates sur les segments abdominaux I à IV, deux nervures

<sup>23</sup> Rhinaries : sensilles olfactives impliquées dans la perception des molécules sémiochimiques (Pickett et al. 1992)

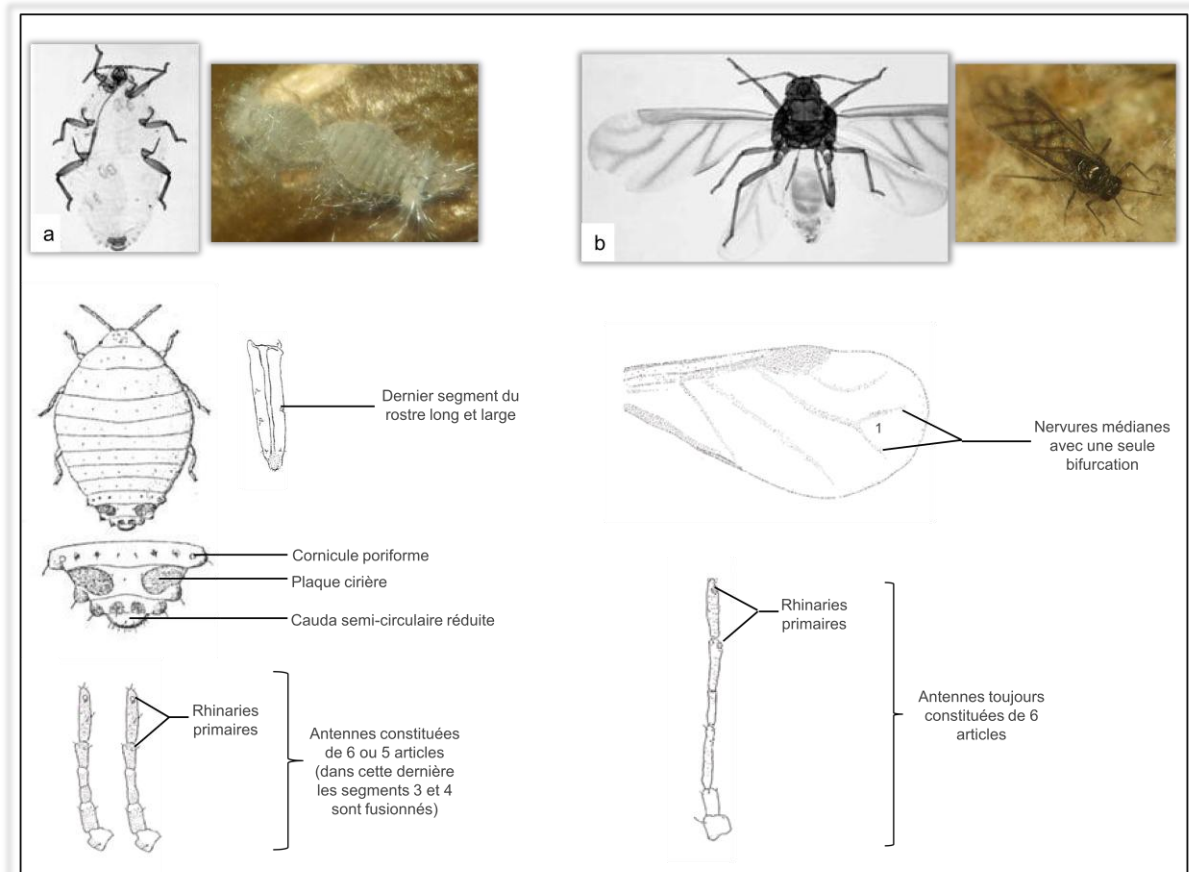
cubitales sur les ailes antérieures ainsi que deux nervures obliques sur les ailes postérieures et enfin un abdomen plus volumineux que l'association tête-thorax (Fig. 2.4a) (Nieto-Nafría & Mier-Durante 1998). Contrairement aux Aphididae toutefois, une seule bifurcation (au lieu de 2) est visible sur la nervure médiane des ailes antérieures (Fig. 2.4b).



**Fig. 2.3** Morphologie généralisée d'un puceron Aphididae femelle parthénogénétique ailée (d'après Blackman & Eastop 1994)

D'après Nieto-Nafría & Mier-Durante (1998), la principale caractéristique des Phloeomyzinae et de l'espèce *P. passerinii* est la présence de femelles virginipares toujours aptères et de sexués mâles et femelles ovipares tous ailés (Fig. 2.4). Conformément au polyphénisme des pucerons des arbres, *P. passerinii* présente donc trois morphes. Toutefois ces morphes diffèrent de la situation standard puisqu'ils incluent des femelles parthénogénétiques toutes aptères, des femelles ovipares toutes ailées et des mâles ailés. Il mesure 1.2 à 1.9 mm et présente plusieurs critères morphologiques archaïques comme la présence de cornicules<sup>24</sup> poriformes, une cauda semi-circulaire réduite et une plaque anale arrondie (Fig. 2.4a). Il possède deux larges plaques cirières sur la partie dorsale postérieure de l'abdomen (urite post-corniculaire 7) d'où le nom de lanigère (Fig. 2.4a). Le morphe aptère présente une fusion de la tête et du thorax, des antennes à cinq ou six articles, tandis que les morphes ailés présentent des ailes à plat aux repos et des antennes composées toujours de six articles qui manquent de rhinaries secondaires (Fig. 2.4b).

<sup>24</sup> Cornicules : appendices émettant la phéromone d'alarme, E-β-farnésène (Pickett et al. 1992)



**Fig. 2.4** Caractéristiques morphologiques des (a) femelles virginipares aptères et des (b) sexués ailés de *Phloeomyzus passerinii* (d'après Nieto-Nafría & Mier-Durante 1998). Photos: Blackman & Eastop (1994) (noir et blanc) et S. Pointeau (couleur)

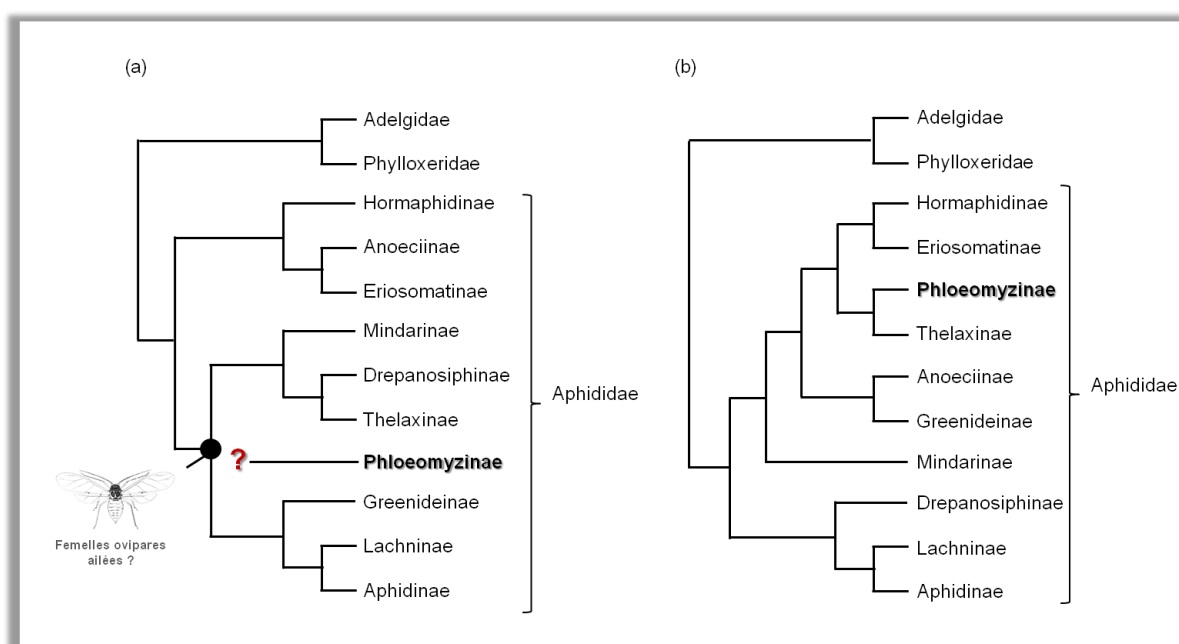
### 2.2.3. Position systématique : une histoire évolutive ponctuée d'interrogations...

Bien qu'il existe dans la littérature plusieurs reconstructions phylogénétiques comparant les caractères morphologiques ou génétiques des diverses sous-familles de puceron Aphididae, le lien phylogénétique entre la sous-famille Phloeomyzinae et les autres sous-familles n'a jamais été élucidé.

#### 2.2.3.1. Reconstructions phylogénétiques basées sur la morphologie

Deux reconstructions phylogénétiques basées sur l'analyse cladistique des données morphologiques paléontologiques ont été réalisées (Fig. 2.5). Elles diffèrent par un certain nombre de critères morphologiques et une interprétation différente de l'homologie de certains caractères. En basant sa reconstruction phylogénétique sur l'analyse de 18 caractères morphologiques et un biologique (alternance d'hôte : retour des sexupares sur l'hôte primaire), Heie (1987) qualifie la sous-

famille des Phloeomyzinae de très particulière et spécialisée (Fig. 2.5a). La présence de femelles ovipares toujours ailées chez les Phloeomyzinae, associée aux caractères archaïques rapportés plus haut, n'a en effet pas permis de définir un lien évolutif avec l'une ou l'autre des deux lignées sœurs Mindarinae + Thelaxinae + Drepanosiphinae et Greenideinae + Aphidinae + Lachninae. La femelle ovipare de l'espèce ancestrale de ces deux lignées était pourtant probablement ailée, comme chez *P. passerinii*, puisque ce caractère est présent à la fois chez les Drepanosiphinae et les Greenideinae. La seconde reconstruction proposée par Wojciechowski (1992), basée sur l'analyse de 19 caractères tous morphologiques, diverge de l'hypothèse de Heie (1987) et relie les Phloeomyzinae aux Thelaxinae (Fig. 2.5b).



**Fig. 2.5** Reconstructions phylogénétiques basées sur l'analyse cladistique des données morphologiques paléontologiques selon (a) Heie (1987) et (b) Wojciechowski (1992)

### 2.2.3.2. Reconstructions phylogénétiques basées sur les caractères génétiques

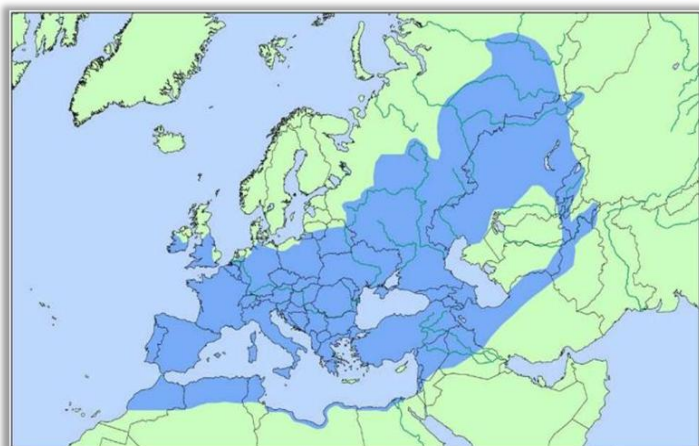
Les deux premières reconstructions phylogénétiques globales des Aphididae ont été réalisées en utilisant des séquences d'ADN mitochondrial ou d'ADN de l'endosymbionte bactérien *Buchnera* (von Dolen & Moran 2000 ; Martínez-Torres et al. 2001). Seule celle de von Dohlen & Moran (2000) a inclus la sous-famille des Phloeomyzinae. Toutefois, la faible résolution pour des niveaux taxonomiques supérieurs à la tribu, probablement liée à une rapide radiation évolutive des pucerons parallèle à celle des angiospermes, n'a pas permis d'élucider la position systématique de cette sous-famille. Enfin, la récente reconstruction phylogénétique d'Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010)

basée sur l'analyse séparée mais également combinée de gènes nucléaires et mitochondriaux n'a pas considérée la sous-famille des Phloeomyzinae.

#### 2.2.4. Distribution géographique et arbres hôtes

L'aire naturelle du puceron lanigère du peuplier, *P. passerinii* est située en zone paléarctique et recouvre approximativement celle du peuplier noir *Populus nigra*, son hôte de prédilection et l'une des trois espèces européennes de peuplier (Tableau 2.1, Fig. 2.6) (Lapietra & Allegro 1990 ; Blackman & Eastop 1994). L'espèce a été introduite dans plusieurs pays d'Amérique (Tableau 2.1). *Phloeomyzus passerinii* est monoécique sur le genre *Populus*. En conditions naturelles et faible densité, il se développe dans les zones de ripisylve privilégiées par le peuplier noir (Source : crop protection compendium-cabi.org). La présence de l'espèce est également citée sur *P. suaveolens*, *P. ciliata* *P. maximowiczii*, *P. deltoides* (Habib & Ghani 1970 ; Blackman & Eastop 1994). En revanche, le signalement de *P. passerinii* par Theobald (1929) sur *P. alba* serait à prendre avec précaution car pouvant provenir d'une confusion dans la nomenclature des pucerons (Doom & Hille Ris Lambers 1962), ce qui semble confirmé par les tests de sensibilité effectués sur les génotypes de *P. alba* (Lapietra & Allegro 1990 ; Rajabi Mazhar et al. 2003 ; Karahroodi et al. 2006). Quant aux rares observations sur *P. tremuloides* en Amérique du Nord (dans le Maine et au Canada), elles sont très probablement liées à une introduction (Smith 1974) (Tableau 2.1).

Les espèces de peuplier et les génotypes de peuplier cultivés montrent une sensibilité variée aux attaques de *P. passerinii*. Par exemple, *Populus nigra* montre une grande variabilité de sensibilité, tandis que celle de *P. deltoides* est généralement faible et *P. alba* semble exempt d'attaque (Lapietra & Allegro 1990 ; Allegro & Cagelli 1996 ; Allegro 1997 ; Rajabi Mazhar et al. 2003 ; Karahroodi et al. 2006). En peupleraie, les peupliers hybrides euraméricains *P. x euramericana*, présentent une sensibilité variée selon les génotypes (Lapietra & Allegro 1990 ; Allegro et al. 1996 ; Allegro 1997). En Italie, la sensibilité des espèces parentales de *P. x euramericana* que sont *P. deltoides* (Arru & Lapietra 1979) et *P. nigra* (Allegro & Cagelli 1996) a été évaluée dans le but d'obtenir des génotypes hybrides résistants. Allegro et al. (1995) ont recherché des marqueurs biochimiques de la résistance dans trois groupes de *P. nigra* qui se distinguaient par leur niveau de sensibilité contrasté au puceron lanigère. Cette étude a montré que les composés phénoliques permettaient de discriminer les groupes de résistance, en particulier l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque. Enfin, la résistance des génotypes de peuplier est généralement constante au cours de l'année ; bien que pour un petit nombre de génotypes elle semble varier selon la saison (Allegro et al. 1996).



**Fig. 2.6** Aire de répartition de l'hôte naturel (*Populus nigra*) de *Phloeomyzus passerinii* (source EUFORGEN)

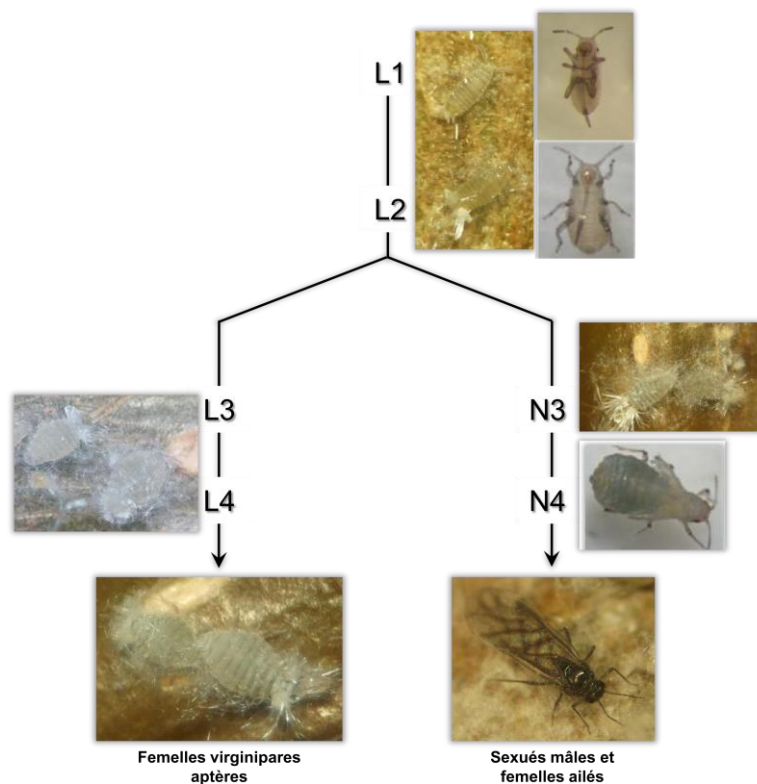
**Tableau 2.1** Signalements de *Phloeomyzus passerinii* dans son aire géographique naturelle et zones d'introduction (d'après crop protection compendium-cabi.org)

Pays	Origine	Référence
<b><i>Europe</i></b>		
Belgique	Indigène	Nef & Menu (1994)
France	Indigène	Signoret (1875)
Allemagne	Indigène	Della Beffa (1936)
Grèce	Indigène	Garuphalos & Tsitsones (1965)
Hongrie	Indigène	Nef & Menu (1994)
Italie	Indigène	Della Beffa (1936)
Hollande	Indigène	Doom & Hille Ris Lambers (1962)
Espagne	Indigène	Aparisi (1971)
Royaume-Uni	Indigène	Theobald (1929)
<b><i>Asie / Moyen-Orient</i></b>		
Chine	Indigène	Zhang & Zhong (1982)
Russie	Indigène	Cholodkovsky (1921)
Iran	Indigène	Chodjai (1977)
Israël	Indigène	Halperin (1981)
Pakistan	Indigène	Habib & Ghani (1970)
Turquie	Indigène	Remaudière et al. (2006)
Syrie	Indigène	Nef & Menu (1994)
<b><i>Afrique</i></b>		
Egypte	Indigène	Hall (1928)
Maroc	Indigène	Roberti (1939)
<b><i>Amérique</i></b>		
Etats-Unis	Introduite	Smith (1974)
Canada	Introduite	Smith (1974)
Argentine	Introduite	Ortego et al. (2004)
Pérou	Introduite	Delfino (2005)
Chili	Introduite	Ramírez (com. pers.)

### 2.2.5. Cycle de vie de *Phloeomyzus passerinii*

#### 2.2.5.1. Stades de développement

Arzone & Vidano (1984) ont décrit quatre stades larvaires (L1 à L4) pour la phase parthénogénétique (Fig. 2.7). Les larves L1 sont fines et très mobiles et possèdent un rostre très long dépassant de l'abdomen. Les quatre mues successives se traduisent par un allongement du corps et un élargissement progressif de l'abdomen pour aboutir à la forme ovoïde caractéristique des femelles parthénogénétiques aptères. La taille des stylets est constante pour tous les stades. La succession des stades larvaires de la phase sexuée est différente (Fig. 2.7) (Arzone & Vidano 1984). Aux stades L1 et L2 succèdent deux stades nymphaux N3 et N4 caractérisés par l'apparition des ébauches alaires qui donneront les sexués ailés mâles et femelles ovipares à l'issue de la mue imaginale.

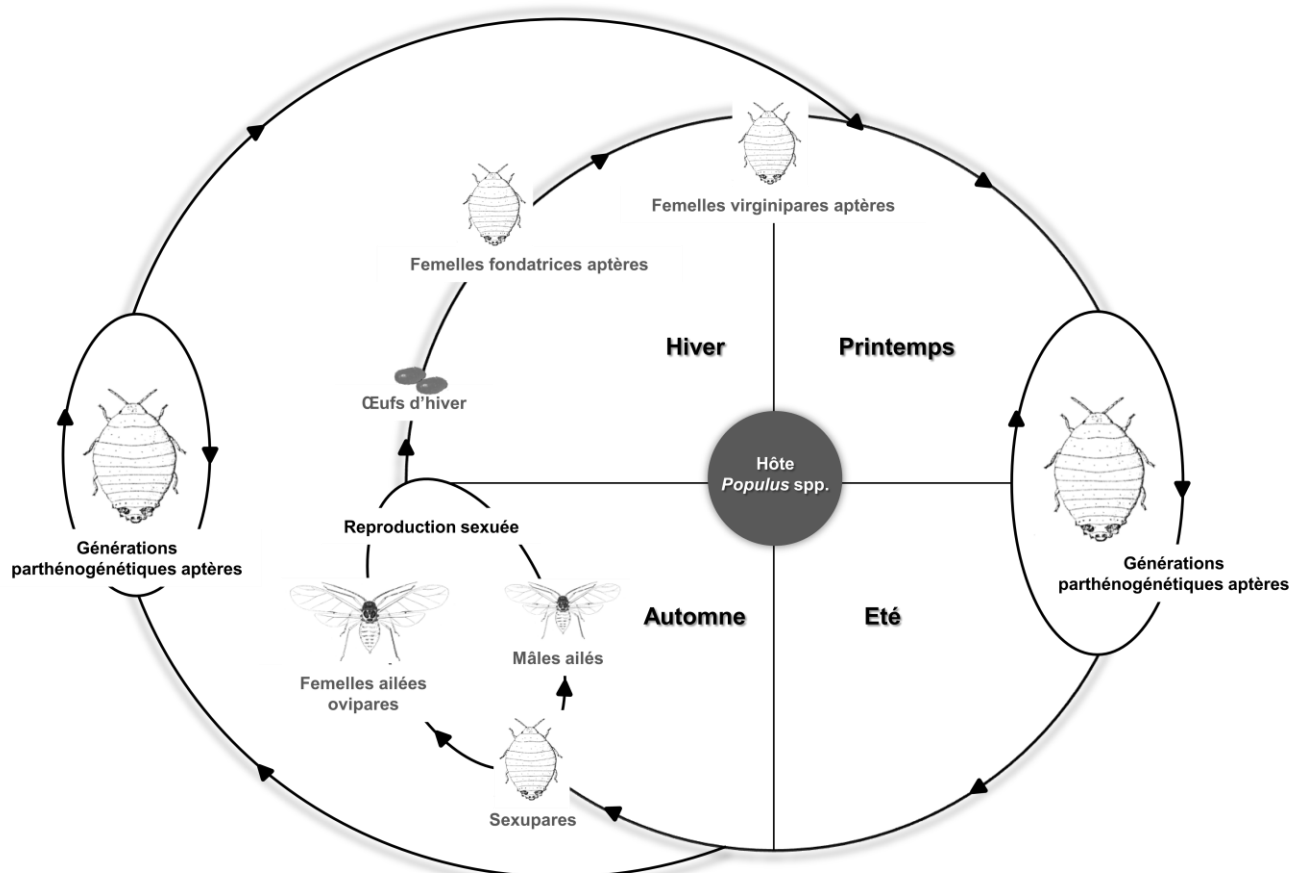


**Fig. 2.7** Représentation schématique de la succession des stades de développement des phases asexuée et sexuée du cycle de vie de *P. passerinii*

#### 2.2.5.2. Déroulement du cycle de vie

*Phloeomyzus passerinii* effectue tout son cycle de vie dans les crevasses de l'écorce du tronc et de la base des branches du peuplier, préférentiellement au niveau du tiers supérieur de l'arbre (Della Beffa 1936 ; Arzone & Vidano 1984 ; Blackman & Eastop 1994) (Fig. 2.8). Au cours de son cycle, plusieurs générations parthénogénétiques constituées uniquement de femelles virginipares aptères se

reproduisant par parthénogenèse thélytoque se succèdent, généralement de mars à novembre. Leur nombre dépend des conditions climatiques, principalement de la température (Arzone & Vidano 1984). A l'automne, il y a apparition des sexués mâles et femelles ovipares tous ailés. Toutefois pendant l'hiver, *P. passerinii* maintient en parallèle une phase parthénogénétique constituée de femelles virginipares aptères en quiescence (Della Beffa 1936 ; Arzone & Vidano 1984). La phase parthénogénétique peut même prédominer pendant l'hiver dans les régions à hiver doux (Arzone & Vidano 1984 ; Blackman & Eastop 1994). Après accouplement à l'automne, les femelles ovipares ailées déposent directement leurs œufs sur l'écorce du tronc des peupliers (Arzone & Vidano 1984). Lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables, les larves et les femelles parthénogénétiques aptères en quiescence dans les crevasses de l'écorce reprennent leur développement et les fondatrices aptères issues des œufs d'hiver (morphologiquement identiques aux femelles virginipares aptères) donnent naissance à la première génération de femelles virginipares aptères. Les variants de cycle de vie correspondant à différentes stratégies de reproduction et d'hivernation, c'est-à-dire la présence de clones holocycliques, anholocycliques, intermédiaires, androcycliques ou une combinaison de ces derniers, n'ont jamais été décrits chez *P. passerinii*.



**Fig. 2.8** Schéma du cycle de vie du puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (d'après Arzone & Vidano 1984 ; Blackman & Eastop 1994)

### 2.2.5.3. Modes de dispersion

Le mode de dispersion de *P. passerinii* n'est pas connu et n'a jamais été étudié. La dispersion des individus sur l'arbre et entre arbres dans une peupleraie pourrait s'effectuer par le premier stade larvaire très mobile, comme cela est le cas pour d'autres pucerons des arbres comme *Eriosoma lanigerum* dans les vergers de pommiers (Hoyt & Madsen 1960 ; Alspach & Bus 1999). L'observation d'individus au niveau des racines est courante (Vala et al. 2011) et ces dernières pourraient constituer un couloir pour coloniser de nouveaux arbres. Il est également possible que la dispersion par le vent en lien avec la sécrétion de cire contribue à la dissémination des premiers stades larvaires, les stades adultes étant moins mobiles. Comme pour tous les pucerons, on suppose également que la dispersion à courte, moyenne et longue distance des individus ailés de *P. passerinii* s'effectue de manière active et passive avec les courants atmosphériques (Dixon 1998 ; Lombaert et al. 2006). Comparativement aux autres espèces d'Aphididae, la dispersion des individus est réalisée par des ailés tous sexués (Hille Ris Lambers 1966), ce qui est une particularité intéressante du genre *Phloeomyzus*. La contribution relative des formes sexuées et asexuées à la dispersion n'est pas connue.

### 2.2.6. Alimentation du puceron

En condition endémique, *Phloeomyzus passerinii* se développe sur le tronc des peupliers matures et à la base des branches basses, préférentiellement au niveau du tiers supérieur de l'arbre. En cas d'épidémie, les individus sont capables de s'alimenter sur l'ensemble du tronc. Arzone & Vidano (1984) suggèrent une alimentation du puceron dans le parenchyme cortical sans toutefois réaliser d'étude pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Comparativement à d'autres pucerons se développant sur les parties lignifiées des arbres, *P. passerinii* est une espèce relativement petite, il est donc possible que la taille de ses stylets ne lui permette pas d'atteindre le phloème situé en profondeur sous l'écorce. Toutefois, les pucerons mangeurs de parenchyme, comme le puceron lanigère du pommier *Eriosoma lanigerum*, induisent généralement des galles, or *P. passerinii* ne cause pas de galle apparente. Enfin, Heie (1987) suggère que la présence d'une cauda rudimentaire caractérise les espèces primitives s'alimentant dans le parenchyme ou les espèces inductrices de galles ; la cauda ayant évolué suite au développement d'un mode d'alimentation phloémophage, afin de dégager les grandes quantités de miellat produites en raison de ce mode d'alimentation. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre le mode d'alimentation de *P. passerinii*.

### 2.2.7. Ennemis naturels

Les études recensant les ennemis naturels de *P. passerinii* concernent uniquement les prédateurs. Par exemple en Italie, Arzone (1987) a répertoriés 30 espèces de prédateurs Acariens, Héteroïptères, Névroptères, Diptères et Coléoptères (Tableau 2.2), mais bien qu'il existe une corrélation significative entre le degré d'infestation des peuplements et l'abondance de ces auxiliaires naturels, ces derniers n'exercent apparemment pas de régulation efficace des populations de *P. passerinii* en peupleraie.

## 2.3. CONCLUSION

La populiculture tient une place très importante dans la production forestière en France. Elle était jusqu'à ces dernières décennies relativement épargnée par les problèmes entomologiques. L'importance et l'originalité des dégâts de puceron constituent donc une première particularité. De plus, le puceron lanigère du peuplier est une espèce très spécialisée présentant de nombreuses particularités biologiques. Premièrement, c'est une espèce unique du point de vue de sa morphologie qui présente de nombreuses caractéristiques archaïques. Toutefois, l'histoire évolutive de cette espèce et son lien phylogénétique avec les autres espèces d'Aphididae ne sont pas résolus à ce jour. Les caractéristiques morphologiques du puceron et la niche écologique qu'il occupe soulèvent des interrogations quant à son mode d'alimentation et ses interactions avec son arbre hôte. Deuxièmement, l'espèce présente la particularité de posséder des morphes sexués uniquement ailés au cours de son cycle biologique, or cette caractéristique peut avoir un impact important sur la capacité de dispersion, la dynamique et la composition génétique des populations de cette espèce. Il y a également une coexistence des deux modes de reproduction pendant l'hiver et une apparente prédominance de la reproduction asexuée dans les zones tempérées à hivers doux, ce qui peut aussi avoir un impact important sur la composition génétique des populations de puceron mais également sur le potentiel ravageur de l'insecte.

**Tableau 2.2** Prédateurs répertoriés de *Phloeomyzus passerinii*. (d'après crop protection compendium-cabi.org).<sup>a</sup> Arzone (1987),<sup>b</sup> Raspi (1996),<sup>c</sup> Vidotti (1960).

Classification	Espèce
<b>Insectes</b>	
Coleoptera: Coccinellidae	<i>Adalia bipunctata</i> (L.) <sup>a</sup>
Coleoptera: Coccinellidae	<i>Coccinella septempunctata</i> L. <sup>a</sup>
Coleoptera: Coccinellidae	<i>Exochomus 4-pustulatus</i> (L.) <sup>a</sup>
Coleoptera: Coccinellidae	<i>Propylaea 14-punctata</i> (L.) <sup>a</sup>
Coleoptera: Coccinellidae	<i>Synharmonia globata</i> (L.) <sup>a</sup>
Coleoptera: Coccinellidae	<i>Scymnus ferrugatus</i> (Muls.) <sup>a</sup>
Diptera: Chamaemyiidae	<i>Leucopis annulipes</i> (Zett.) <sup>b</sup>
Diptera: Chloropidae	<i>Thaumatomyia elongatula</i> (becker) <sup>b</sup>
Diptera: Chloropidae	<i>Thaumatomyia</i> sp. <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Episyrphus balteatus</i> (Deg.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Melanostoma mellinum</i> (L.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Metasyrphus corollae</i> (F.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Meliscaeva auricollis</i> (Meig.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Neocniprocton</i> sp. <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Platycheirus clypeatus</i> (Meig.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Platycheirus manicatus</i> (Meig.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Postosyrphus luniger</i> (Meig.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Scaeva pyrastris</i> (L.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Sphaerophoria scripta</i> (L.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Syrphus ribesii</i> (L.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Syrphus venustus</i> (Meig.) <sup>a</sup>
Diptera: Syrphidae	<i>Syrphus vitripennis</i> Meig. <sup>a</sup>
Hemiptera: Anthocoridae	<i>Anthocoris confusus</i> (Reut.) <sup>a</sup>
Hemiptera: Anthocoridae	<i>Lyctocoris campestris</i> (F.) <sup>a</sup>
Hemiptera: Anthocoridae	<i>Orius minutus</i> (L.) <sup>a</sup>
Hemiptera: Miridae	<i>Pilophorus clavatus</i> (L.) <sup>a</sup>
Hemiptera: Pentatomidae	<i>Arma custos</i> (F.) <sup>c</sup>
Neuroptera: Chrysopidae	<i>Anysochrysa prasina</i> (Burm.) <sup>a</sup>
Neuroptera: Chrysopidae	<i>Chrysopa flava</i> (Scop.) <sup>a</sup>
Neuroptera: Chrysopidae	<i>Chrysopa perla</i> (L.) <sup>a</sup>
Neuroptera: Chrysopidae	<i>Chrysopa septempunctata</i> (Wesm.) <sup>c</sup>
Neuroptera: Chrysopidae	<i>Chryoperla carnea</i> (Steph.) <sup>a</sup>
Neuroptera: Hemerobiidae	<i>Symphorobius pygmaeus</i> (Ramb.) <sup>a</sup>
<b>Acariens</b>	
Acarina: Trombiidae	<i>Allothrombium fuliginosum</i> (Herm.) <sup>a</sup>

# Chapitre II.

---

## Mode d'alimentation & Position systématique

“The student of aphids is requested never to generalize”...

**Bodenheimer FS & Swirski E (1957)**

The Aphidoidea of the Middle East. *Weizmann Science Press of Israel*



## Chapitre II.

# **M**ode d'alimentation & position systématique

### 1. PRESENTATION DE L'ETUDE

Compte tenu de l'importance du mode d'alimentation des insectes dans les interactions avec leurs plantes hôtes et du manque de connaissances sur cet aspect chez *P. passerinii*, il était indispensable d'étudier les processus fondamentaux de l'alimentation de ce puceron. Ces informations sont essentielles pour comprendre comment l'insecte exploite son hôte, les conséquences de son alimentation sur les tissus de la plante, mettre en évidence une éventuelle réaction de la plante et évaluer leur implication dans le dépérissement des peupliers. Le site d'alimentation conditionne également les mécanismes de résistance mis en jeu. Son étude représente donc une première étape à l'étude des mécanismes de résistance. Ces travaux ont donné lieu à la rédaction d'un article qui sera prochainement soumis pour publication. D'un point de vue plus fondamental, il apparaissait aussi intéressant d'élargir la base taxonomique des comportements alimentaires caractérisés chez les pucerons se développant sur organes lignifiés. Cette approche est complétée par une étude phylogénétique visant à établir les liens entre la sous-famille des Phloeomyzinae et les autres sous-familles d'Aphididae, du point de vue de l'évolution du mode d'alimentation. Elle est donc présentée dans ce chapitre à la suite de l'étude du comportement alimentaire. Toutefois, elle sera incluse pour publication dans un des articles de génétique présentés dans le chapitre IV.

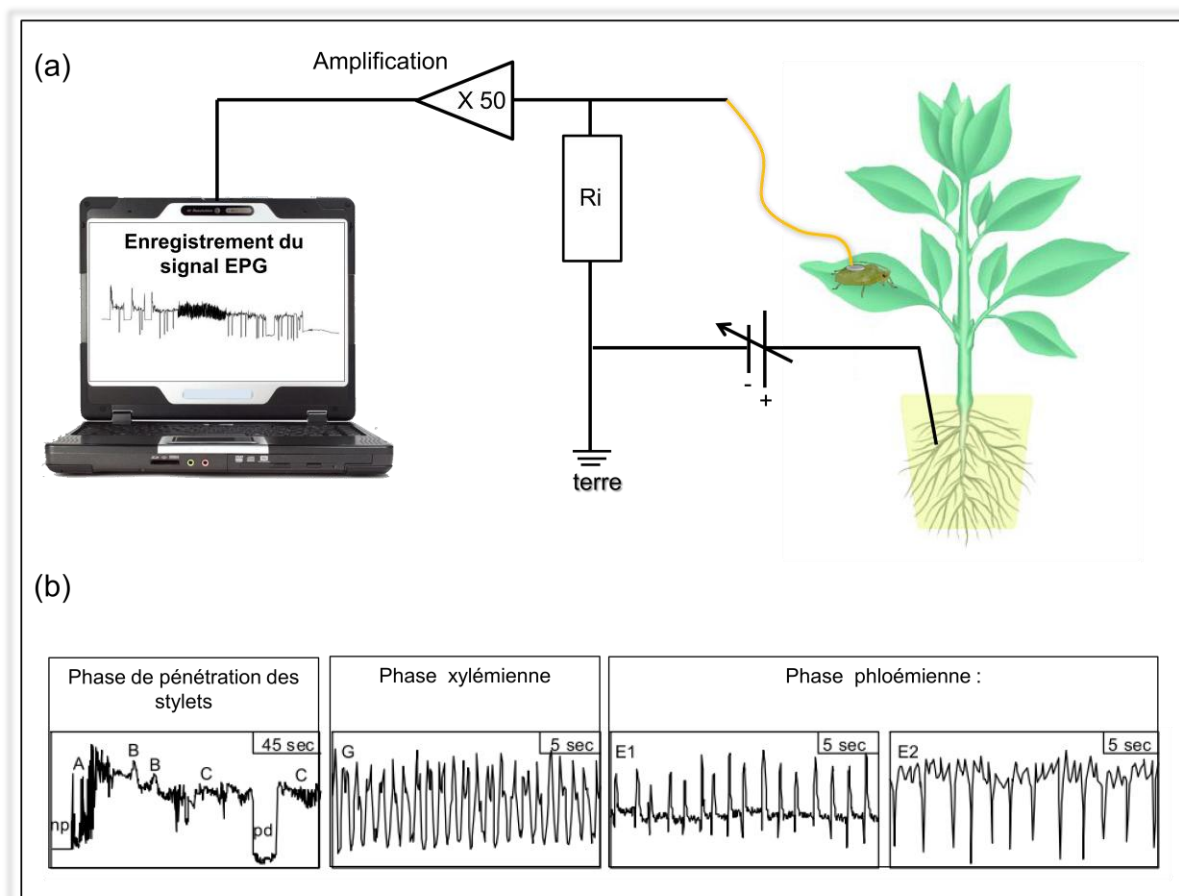
### 2. MODE D'ALIMENTATION DE *P. PASSERINII*

#### ❖ Présentation de l'article n°1 et principaux résultats

Les dommages directs infligés par les pucerons à leurs arbres hôtes sont liés à leur mode d'alimentation. Sur les parties lignifiées, les stylets des espèces phloémophages pénètrent les tissus végétaux de manière intercellulaire en produisant des sécrétions salivaires qui réduisent les perturbations et conduisent à des symptômes à peine perceptibles (Tjallingii & Hogen Esch 1993 ; Miles 1999 ; Walling 2008). De cette manière, ils endommagent peu les tissus et conduisent essentiellement à un ralentissement de la croissance de l'arbre, résultat d'un détournement des réserves

nutritionnelles. Les dégâts les plus visibles et importants sont infligés par les pucerons qui se nourrissent au niveau du cortex et pénètrent les tissus de l'écorce de manière inter- et/ou intracellulaire (Pollard 1973 ; Miles 1989b ; Blackman & Eastop 1994). Leurs sécrétions salivaires induisent en effet des déformations tumorales qui aboutissent parfois à la mort de l'arbre. Ces déformations sont le plus souvent visibles extérieurement [e.g. *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) sur pommier ou *Adelges piceae* (Ratzburg) sur tiges d'épicéa] sauf dans quelques cas comme celui d'*A. piceae* sur le tronc d'*Abies fraseri* (Balch 1952 ; Balch et al. 1964 ; Jeanneau 1968 ; Müllick 1977 ; Miles 1989b). En conditions naturelles, *P. passerinii* induit des nécroses corticales sur le tronc des peupliers sans apparemment initier de structures externes semblables à des galles et conduit au dépérissement des arbres en cas d'infestation sévère. Bien que Arzone & Vidano (1984) suggèrent une alimentation dans le parenchyme cortical, aucune étude n'a porté spécifiquement sur le mode d'alimentation de *P. passerinii* et on ne sait pas réellement si ce tissu est bien celui visé par le puceron. On ne connaît pas non plus les processus fondamentaux mis en jeu au cours de la pénétration des stylets.

Les recherches sur le mode d'alimentation des pucerons ont montré que les stylets buccaux atteignent leur site alimentaire après une phase exploratoire à l'intérieur des tissus végétaux. L'observation directe du mode d'alimentation étant impossible, ces études sont fondées sur le couplage de méthodes expérimentales indirectes : l'électropénétrographie (EPG), la stylectomie, l'histologie. L'EPG permet de réaliser un suivi temporel du comportement alimentaire et de déterminer avec précision la localisation des stylets et l'activité de l'insecte dans les tissus végétaux (salivation, ingestion) (McLean & Kinsey 1964 ; Tjallingii 1978, 1988, 2000). Cette technique consiste à insérer le puceron et sa plante hôte dans un circuit électrique, à l'aide d'électrodes reliées directement à l'insecte (fixé sur la plante) et au sol dans lequel est enracinée la plante. Le circuit est fermé dès que le puceron met ses stylets en contact avec les tissus végétaux. La pénétration des stylets génère alors des fluctuations de tension formant un 'signal EPG' qui est amplifié et enregistré sur ordinateur (Fig. II.1a). Ces fluctuations de tension sont la résultante de deux composantes électriques concurrentes qui incluent des informations biologiques importantes : la "résistance" liée à l'insecte (R), et la tension 'ou biopotential' générée à l'interface plante-insecte nommée 'force électromotrice' (emf) (Tjallingii 1985a). La première composante est liée à l'activité des valves présentes au niveau des stylets dans le canal alimentaire et le canal salivaire, tandis que la seconde est liée au potentiel électrique membranaire des cellules végétales. Le 'signal EPG' permet de distinguer différentes phases comportementales constituées de une ou plusieurs ondes électriques distinctes, chacune corrélée à une localisation et une activité précise des stylets dans les tissus végétaux (van Helden & Tjallingii 2000) (Fig. II.1b). C'est le couplage de la méthode EPG avec les techniques de stylectomie et d'histologie (microscopie optique et électronique à transmission) qui a permis aux auteurs de déterminer ces corrélations (Kimmins & Tjallingii 1985 ; Tjallingii 1988 ; Tjallingii & Hogen Esch 1993).



**Fig. II.1** (a) Représentation schématique du dispositif d'électropénétration (EPG) et (b) représentation des trois phases comportementales principales, avec les ondes électriques associées : np, non pénétration ; A et B, établissement du contact électrique et initiation de la gaine salivaire ; C, activité extracellulaire des stylets lors de la phase de pénétration au sein des tissus de la plante ; pd, piqûre intracellulaire (potential drop) ; G, ingestion active de xylème ; E1, salivation dans le phloème et E2, ingestion passive de phloème (d'après Tjallingii 1978 et Prado & Tjallingii 1994)

Depuis son développement dans les années 1980, le système EPG s'est avéré une méthode fiable de caractérisation du comportement alimentaire et a été utilisée chez un grand nombre d'insectes piqueur-suceurs Sternorrhynches tels que pucerons, aleurodes (Janssen et al. 1989 ; Walker & Janssen 2000), cochenilles (Calatayud et al. 1994), ou psylles (Bonani et al. 2010) et Auchénorrhynches (Lett et al. 2001 ; Miranda et al. 2009). Parmi les pucerons, l'essentiel des études utilisant cette méthode a porté sur les espèces phloémophages d'Aphididae ravageuses des grandes cultures (Sauvion & Rahbé 1999). Il n'y a que quelques exemples très limités d'application à des pucerons des parties lignifiées parmi lesquels on trouve *Eriosoma lanigerum* sur pommier (Sandanayaka & Hale 2003), *Cinara atlantica* (Wilson) (Penteado 2007) et *Pineus boernerii* Annand (Cardoso 2007) sur le pin,

*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch sur la vigne (Kingston & Powell 2007) et *Phylloxera coccinea* (von Heyden) sur le chêne (Harrewijn et al. 1998). Hormis celui de *P. boernerii* le comportement, décrit chez ces espèces, présente cependant de nombreuses similitudes avec les phases caractérisées chez les pucerons phloémophages, bien que certaines ondes présentent des variations spécifiques des tissus ligneux. Dans ce contexte, le travail réalisé sur *P. passerinii* est tout à fait original.

Nos objectifs étaient de localiser le site de nutrition de *P. passerinii* et de caractériser son comportement alimentaire en couplant l'histologie classique avec l'EPG. L'étude histologique a été réalisée en collaboration avec l'Unité d'Amélioration Génétique et de Physiologie Forestière de l'INRA d'Orléans et l'étude EPG lors d'un séjour au Laboratoire de Biologie des Entomophages de l'Université de Picardie Jules Verne. Dans les deux expériences, des femelles virginipares aptères ont été placées sur l'écorce de jeunes plants de peuplier et le comportement alimentaire de 20 individus a été analysé. L'observation histologique des gaines salivaires du puceron nous a d'abord permis de visualiser la pénétration des stylets et le site de nutrition, suggérant une alimentation dans le cortex végétal. Nous avons alors réalisé un suivi en temps réel du comportement alimentaire de l'insecte à l'aide de la méthode EPG. L'ensemble du comportement alimentaire se déroulant dans le cortex (hormis la phase de pénétration du suber), il n'était pas nécessaire de corrélérer chaque onde à un tissu particulier et donc nous n'avons pas eu besoin de réaliser des coupes histologiques concomitantes à l'observation des différentes ondes EPG.

Les résultats d'analyse des gaines salivaires et des enregistrements EPG montrent un comportement alimentaire atypique chez les Aphididae, caractérisé par trois ondes : A, C et une nouvelle onde Icp. Les ondes A et C sont des variantes de celles des pucerons phloémophages. L'onde Icp, décrite sur la base des résultats histologiques et des précédentes descriptions d'ondes EPG chez les Sternorrhynches, a été corrélée à une activité intracellulaire dans les cellules du parenchyme cortical. Le mode d'alimentation de *P. passerinii* se caractérise finalement par une phase de transit intra- et extracellulaire droite des stylets au sein du suber et du parenchyme cortical, suivie d'une phase intracellulaire soutenue dans les cellules du parenchyme cortical. Chez *P. passerinii*, la phase de transit des stylets est dépourvue de piqûres intracellulaires brèves (potential drop, pd) ce qui s'explique par le fait que le puceron traverse de part en part les cellules du parenchyme cortical.

ARTICLE N°1

Exceptional plant penetration and feeding upon cortical  
parenchyma cells by the woolly poplar aphid

Pointeau S, Ameline A, Laurans F, Rahbé Y, Sallé A, Bankhead-Dronnet S & Lieutier F

*Soumis pour publication*

## Résumé

Quarante pourcent des espèces de pucerons effectuent la totalité ou une partie de leur cycle de vie sur les arbres, essentiellement sur les feuilles et les pétioles. Les espèces capables d'exploiter les parties lignifiées présentent soit des adaptations spécifiques, telles que des stylets très longs leur permettant d'atteindre le phloème ou la capacité d'induire des galles. Le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Hemiptera: Aphididae) qui colonise les troncs et la base des branches des peupliers matures induit des nécroses corticales conduisant à la mort des arbres en cas d'infestations sévères. A l'heure actuelle, le mode d'alimentation de ce puceron est inconnu. Nous avons examiné le mode d'alimentation de *P. passerinii* sur des boutures de *Populus x canadensis* Moench en utilisant: (i) des analyses histologiques du site d'alimentation et du cheminement des stylets et (ii) des analyses par électropénétrographie (EPG, DC-system) enregistrées à partir de femelles parthénogénétiques aptères placées sur les tissus ligneux. Les résultats d'histologie et d'EPG ont montré que les stylets de *P. passerinii* pénétraient dans les tissus de la plante en suivant un tracé intra- et extracellulaire droit avec pour destination le parenchyme cortical. Comparé aux EPGs des pucerons phloémophages, des divergences ont été trouvées pour les deux ondes A et C ; et une nouvelle onde Icp a été décrite. En se basant sur les analyses histologiques et les précédentes descriptions d'ondes EPG, nous discutons la corrélation entre les ondes EPG produites par *P. passerinii* avec la position de l'extrémité des stylets et les activités du puceron dans les tissus de l'écorce. Cela a permis de distinguer une phase de cheminement et une phase intracellulaire soutenue, se déroulant toutes deux dans le parenchyme cortical. Le mode d'alimentation sur écorce est discuté en relation avec les dommages occasionnés par l'insecte et en termes d'évolution du mode d'alimentation du puceron.

## Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid

Sophie Pointeau<sup>1</sup>, Arnaud Ameline<sup>2</sup>, Françoise Laurans<sup>3</sup>, Yvan Rahbé<sup>4</sup>, Aurélien Sallé<sup>1</sup>, Stéphanie Bankhead-Dronnet<sup>1</sup> & François Lieutier<sup>1</sup>

1 UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres, BP 6759, FR-45067 Orléans Cedex, France.

2 Unité de Recherche EA 3900 – BioPI, Biologie des Plantes et contrôle des insectes ravageurs, Laboratoire de Biologie des Entomophages, Université de Picardie Jules Vernes, 33 rue St Leu, FR-80039 Amiens Cedex, France.

3 Equipe Formation des parois Lignifiées, Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, INRA Orléans, Avenue de la Pomme de Pin, BP 20619 Ardon, FR-45166 Olivet Cedex, France.

4 Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions (BF2I) INRA : UR0203 – Institut National des Sciences Appliquées de Lyon INSA Bat. L. Pasteur 20 avenue Albert Einstein, FR-69621 Villeurbanne cedex, France.

### Abstract

Forty percent of aphids live wholly or partly on trees, most species being associated with leaves or petioles. Species able to exploit woody parts have either specific adaptations, such as extra long stylets that allow them to reach the phloem, or the ability to induce galls. The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Hemiptera: Aphididae), colonizes the trunks and base of the lower branches of mature poplars and causes cortical necrosis leading to the death of trees where infestation is heavy. Very little is known about the mode of feeding of *P. passerinii*. This study looked at the feeding behavior of *P. passerinii* on stem-cuttings of *Populus x canadensis* Moench using: (i) histological analyses of the feeding site and stylet pathway and (ii) electrical penetration graphs (EPG, DC) based on parthenogenetic apterous females on woody tissues. The histological and EPG results showed that stylets of *P. passerinii* penetrated into the plant tissues following a straight unbranched extracellular and intracellular pathway to reach the cortical parenchyma. Compared to EPGs for phloem sap feeding aphids, there were differences in the waveforms A and C whereas a new waveform Icp was described. Based on histological analyses and previous descriptions of EPG waveforms, correlations with the stylet tip position and aphid activities within bark tissues are discussed. A pathway and a sustained intracellular phase were distinguished, both occurring in the cortical parenchyma cells. The bark aphid feeding mode is discussed in relation to the damage caused and in terms of changes in the aphid's diet.

**Keywords** Tree-aphid interaction · *Phloeomyzus passerinii* · Trunk feeder · Bark tissue · cortical parenchyma · Electrical penetration graph

## Introduction

Aphids living on trees account for approximately 40% of aphid species throughout the world. They belong to the three families of the Aphidoidea: Aphididae, Adelgidae and Phylloxeridae (Blackman and Eastop 1994). Tree-dwelling aphids generally feed on leaves or petioles but some are able to exploit the trunks, branches and roots (Blackman and Eastop 1994; Pollard 1973). Some of the aphids that feed on woody tissues are able to reach the phloem either because they are large and feed on young stems, branches or large shrubs (e.g. *Tuberolachnus salignus* (Gmelin)) or, if they feed on the trunk (e.g. *Stomaphis* sp.), because they are large and have long stylets with a proboscis of approximately twice the length of the body (Pollard 1973; Dixon 1997, 1998). Other aphids that feed on woody tissues are mainly gall-forming insects living on roots or stems, such as the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) and the grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch) (Pollard 1973; Miles 1989; Brown et al. 1991; Kellow et al. 2004; Kingston and Powell 2007). Phloem sap feeding aphids usually cause limited symptoms on trees whereas more profound species-specific effects such as galls are produced by parenchyma feeding aphids (Miles 1989). Adelgidae induce galls that are visible on the outside of conifer shoots but some morphs within the *Adelges* species feed on the cortical parenchyma cells of the trunk of their secondary host without causing visible galls (e.g. *Adelges piceae* (Ratzeburg) on fir trunks) (Balch 1952; Balch et al. 1964; Müllick 1977; Rohfritsch 1990; Miles 1989).

Tree-dwelling aphids generally cause little damage to forest ecosystems. However, severe outbreaks of aphids living on woody tissues have been reported to cause extensive tree mortality that leads to significant economic and ecological damage, such as the dieback of North American Fraser firs owing to outbreaks of *A. Piceae* (Müllick 1977; Miles 1989). The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret), the only known species in the subfamily Phloeomyzinae (Aphididae) (Blackman and Eastop 1994), is a monoecious aphid that feeds on poplar trunks. Firstly described in France (Signoret 1875), this species is native from the Palearctic area (Blackman and Eastop 1994). Its life cycle is characterized by an autumnal production of sexual alates, occurring while parthenogenetic reproduction through apterous individuals continues (Blackman and Eastop 1994). Colonies develop in bark crevices of young or mature trees. During outbreaks in poplar stands, the aphids can colonize whole trunks, causing extended necroses of cortical cells resulting in cracks, mortality of lower branches and inhibition of bud break (Della Beffa 1936; Arzone and Vidano 1984). Aphid outbreaks lead to a reduction in tree growth and even to massive tree mortality, which causes considerable damage to poplar stands in southern Europe, North Africa and the Near East (Arzone and Vidano 1984; Lapietra and Allegro 1990; Sadeghi et al. 2007). Although *P. passerinii* is a widespread pest, little is known about its feeding strategy. This lack of knowledge prevents the development of effective control.

The feeding of insects with piercing mouthparts has mainly been observed indirectly because it occurs inside plant tissues. Light or transmission electron microscopy can provide such partial and indirect information about the location of the tissues involved in feeding and the stylet pathways of these insects (Pollard 1973; Tjallingii 1988). In contrast, since several decades, electrical Penetration Graph (EPG) is used to acquire direct temporal information on stylet penetration. Probing behavior is generally described by the characterization of EPG waveforms (or waveform patterns) correlated with both stylet tip positions inside plant tissues and insect activities (Tjallingii 1978, 1988, 2000). EPGs have been used to study plant resistance and plant virus transmission and have mainly been applied to crop pests such as phloem sap feeding Aphididae (Alvarez et al. 2006; Fereres and Moreno 2009) and other piercing-sucking insects such as sharpshooters, thrips, whiteflies, psyllids and mealybugs (Janssen 1989; Calatayud et al. 1994; Harrewijn et al. 1996; Miranda et al 2009; Bonani 2010). A few EPG studies have investigated the probing behavior of tree-dwelling aphids feeding on woody stem tissues (Sandanayaka and Hale 2003; Cardoso 2007; Kingston and Powell 2007; Penteadó 2007).

This study investigated the feeding behavior of the woolly poplar aphid by combining histology and EPG recording. First, the tissues penetrated and fed upon by apterous parthenogenetic *P. passerinii* were identified by light (LM) and transmission electron microscopy (TEM). Then, EPG waveforms were described and correlated with histological observations of salivary sheaths. Together with comparisons with earlier EPG studies on other plant-sucking insects the probing behavior of *P. passerinii* on poplar stems was characterized.

## Materials and methods

### *Insects and plants*

A *P. passerinii* colony was established from an apterous parthenogenetic aphid collected in October 2008 from a poplar stand in Reboursin (France). This clonal colony belonged to the most common haplotype that has so far been identified in France (Pointeau et al. unpublished data from combined analyses of three mitochondrial DNA fragments, Cytochrome oxidase I and II and Cytochrome b genetic fragments). The colony was maintained under the breeding conditions developed by Arru (1974), in a climate controlled chamber ( $20 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10$  % RH and 16L:8D photoperiod), on *Populus x canadensis* Moench cv. 'I214' stem-cuttings (25 cm long and 1.5 to 2 cm diameter), which provide an optimal rearing host for this aphid (Arru 1974; Lapietra and Allegro 1990). Stem-cuttings were one-year old poplar stump sprouts cut from mature trees using a pair of secateurs. They were collected in the experimental nursery of Guéméné-Penfao (France) in late autumn when winter buds were present. The laboratory colony was transferred every 15 days onto new stem-cuttings.

Experiments were performed on the poplar genotype 'I214' for both histological and EPG studies. Poplar stem-cuttings (1.5 to 2 cm diameter) were collected as described above in late autumn 2008. The stem-cuttings were kept at 2°C in dry conditions until use. Prior to the experiments, the stem-cuttings were trimmed to 20 cm in length and, to simplify their use in experiments, all buds except the terminal bud were removed. The stem-cuttings were put in water for one week to rehydrate the plant tissues and initiate bud break and root formation. They were then placed in 0.53 liter pots containing compost (Klasmann substrate 4, recipe no. 267). Bud break and leaf formation indicated that the potted stem-cuttings were in a good physiological condition.

As the aphids prefer the upper part of mature trees (Della Beffa 1936; Arzone and Vidano 1984), histological observations were also performed on one log from a 10 year old tree. The tree was cut in July 2009 and one 1.50 m long (20 cm diameter) log from the upper part of the trunk was retained. Infestations for histological preparations were performed soon after the log cutting without specific log treatment.

### *Histology of stylet tracks*

*Aphid settling and sample collection:* sets of two apterous parthenogenetic adult females were placed on the bark of eight stem-cuttings and one 1.5 m log (two sets 10 cm apart per stem-cutting and ten sets 10 cm apart for the log) and allowed to feed for 48 h. Each set was caged under half of a transparent gelatin capsule (half a cylinder) (size 000, LGA, La Seyne-sur-Mer) covered by a band of Parafilm<sup>®</sup> to hold the capsule on the bark. Plant tissues were pre-fixed for 2 h, with the aphids *in situ*, by injecting a glutaraldehyde solution [2.5 % in a 0.2 M, pH: 6.8, McIlvain citrate/phosphate buffer (Pépin and Boumendil 1982)] into the gelatin capsules. The capsules were then removed and block samples of approximately 1 mm<sup>3</sup>, including a zone from the cork layer on the superficial area of xylem, were carefully cut using a razor blade around the probing site, with the aphid *in situ*.

*Sample preparation and staining for light microscopy:* block samples were fixed in 2.5 % glutaraldehyde and dehydrated at room temperature in a graded ethanol series (25-100%) They were then embedded in historesin Technovit 7100<sup>®</sup> (Kulzer & Co, Wehrheim, Germany), allowing 3 µm thick serial transverse sections (microtome RM 2155, Leica Microsystems, Vienna, Austria). To view and measure the salivary sheaths, thirteen stem-cutting sections and four log sections containing the salivary sheaths were stained with 0.2 % (wt:vol) acid fuchsin in 1:1 (vol:vol) mixture of 95 % ethanol and glacial acetic acid (Backus et al. 1988), cleared with distilled water and stained with 0.1 % malachite green in distilled water (wt:vol).

All sections were mounted on slides using Canada balsam and examined using a light microscope (Leica DMR, Leica Microsystems, Vienna, Austria) with a Leica DFC 320 digital camera.

The area round the end of the stylet pathway (cell layer) and salivary sheath typology (“branched” or “unbranched” salivary sheaths and stylet pathway) were characterized. The mean and maximum stylet penetration depths were measured on the poplar stem-cuttings and the mature log using ImageJ 1.40 (National Institutes of Health). The thickness of the cork and cortical parenchyma was also calculated based on three measurements per section. The stylets of five parthenogenetic females were examined using light microscopy and their total length was measured using ImageJ 1.40.

*Sample preparation for transmission electron microscopy:* samples were fixed, dehydrated and embedded in LR-White resin as described above. Series of ultra thin adjacent sections (150 nm) were cut using an ultramicrotome (Leica Ultracut R, Leica Microsystems, Vienna, Austria), mounted on 400-nickel wire mesh grids and counterstained with uranyl acetate (20 min) and lead citrate (30 min). Sections were viewed using a transmission electron microscope (CM 10 Philips, Eindhoven, Netherlands). In order to monitor serial section progression, some thin sections (1.25 µm) and ultra thin sections were stained using the Richardson azure II and methylene blue staining method (Richardson et al. 1960), mounted on slides using Canada balsam and examined using light microscopy (Leica DMR, Leica Microsystems, Vienna, Austria).

### *Electrical penetration graph (EPG) recording*

The stylet penetration was EPG recorded using a Giga-4 EPG system (EPG systems, Wageningen, The Netherlands) (Tjallingii 1978, 1988), adjusted to about 70x gain. Three to five day old apterous adult females of *P. passerinii* were collected from the laboratory colony and immediately immobilized on the tip of an Eppendorf cone connected to a vacuum device. The waxy wool covering the apterous parthenogenetic aphid dorsum was gently removed with a fine paintbrush and then a thin gold wire (20 µm diameter and 2 cm length) was stuck onto the aphid's dorsum using water-based conductive silver glue (EPG systems, Wageningen, The Netherlands). The electrode was then attached to the amplifier input of the EPG system and the aphid was carefully placed in contact with the bark at mid-height of the potted stem-cuttings. Another electrode (10 cm copper wire, 2 mm diam.) was inserted into the soil of the potted stem-cuttings. Twenty aphids were monitored from 8.00 h. to 16.00 h. The connected aphid-plant system was placed inside a Faraday cage in a climate-controlled room at  $20 \pm 1$  °C under electric fluorescent light. The EPG data acquisition and analysis were performed using Probe 3.4 software for Windows (EPG systems, Wageningen, The Netherlands).

Different EPG waveforms were distinguished and described based on standard characteristics: relative amplitude, frequency, voltage level, and electrical origin. The relative amplitude of the waveform was the ratio between the measured amplitude (minimum to maximum deflection) and the highest recorded amplitude (only waveforms with a main R origin). The frequency (Hz) was estimated

from 40 observations for each waveform (two observations per aphid). The voltage level of the waveform (positive or negative) reflected an intracellular or extracellular position of the stylet tips (Tjallingii 1985b). The main electrical origin was due to resistance fluctuation (R), electromotive force (emf) or both (Tjallingii 1985a, 2000). To determine the electrical origin of each waveform, the system voltage was set to positive and negative levels during typical periods in each waveform (Tjallingii 2000). The stylet activities and position of the stylet tips in the plant tissues were inferred from histological observations and similarities to other aphids and Sternorrhyncha (van Helden and Tjallingii 2000, Sandanayaka and Hale 2003).

After waveform characterization, the occurrence and duration of some EPG parameters were calculated using EPG-Calc 4.9 (Giordanengo 2009). Some non-sequential parameters were calculated: (1) % of aphids showing a waveform, (2) number of waveform periods and (3) their mean duration per aphid (Table 2). Some sequential parameters were also calculated to characterize the probing behavior of *P. passerinii* such as: (4) time from the beginning of experiment to the first probe, (5) time from the start of the first probe to initiate each specific period (i.e. pathway and sustained ingestion (> 10 min)), (6) total duration of non-probing period from the start of the first probe to the end of the recording, (7) total duration of penetration before the first sustained ingestion within a probe, and (8) mean number of intracellular phases before the first sustained ingestion.

Typical sequences of waveform events occurring during stylet penetration were studied to characterize *P. passerinii* probing behavior. The likelihood of a specific waveform being followed by another waveform type was calculated on the basis of 160 h (8 h per aphid) of EPG recording (Wayadande and Nault 1996; Almeida and Backus 2004; Miranda et al. 2009).

### *Data analysis*

Statistical analyses were performed using R 2.7.2 (R Development core team 2007). Comparisons between depths of the cortex layers in stem cuttings and those in the log were performed using the Wilcoxon rank sum test. The significance level,  $\alpha$ , was set at 5 % in all statistical analyses. Mean values in the text and tables are given with their standard error.

## **Results**

### *Histology of stylet tracks*

The transverse thin sections (1.25  $\mu\text{m}$  thick) of stem tissues showed that stylets followed a straight route through the bark tissues, not extending deeper than the cortex cell layer, i.e. the ground tissue

region between the vascular system and the epidermis (Fig. 1a). Likewise, all salivary sheaths observed, in both the stem-cuttings and the log, were unbranched and ended in the cortical parenchyma. For both the poplar stem-cuttings and the log, the thickness of the cork layer averaged  $74 \pm 2 \mu\text{m}$  (avg  $\pm$  SE;  $n = 39$  and  $n = 12$ , respectively). However, the cortical parenchyma layer was significantly thicker on the log ( $1685 \pm 96 \mu\text{m}$ ;  $n = 12$ ) than on the poplar stem-cuttings ( $692 \pm 15 \mu\text{m}$ ;  $n = 39$ ) ( $W = 468$ ;  $P < 0.001$ ). The mean penetration depth of the salivary sheaths into the cork and cortical parenchyma was  $390 \pm 46 \mu\text{m}$  ( $n = 13$ ; maximum  $602 \mu\text{m}$ ) on the poplar stem-cuttings and  $302 \pm 85 \mu\text{m}$  ( $n = 4$ ; maximum  $531 \mu\text{m}$ ) on the log. The total length of stylets of *P. passerinii* was  $760 \pm 17 \mu\text{m}$  ( $n = 5$ ).

Light microscopy of transverse thin sections also showed that stylets may follow an intercellular pathway, but crossing right through cell walls may indicate that they probably also follow an intracellular pathway (Fig. 1b). Intracellular stylet penetration was confirmed by LM on ultra thin sections (150 nm thick) (Fig. 1c) and TEM on ultra thin sections that showed punctured cell with cell remnants (Fig. 1d).

### *Electrical penetration graph (EPG) recording*

*Characterization of EPG waveforms.* The woolly poplar aphid produced EPG signals at two clearly distinct voltage levels, suggesting both intracellular and extracellular stylet penetration. Three distinct waveforms were distinguished and named A, C and Icp (Fig. 2a, Table 1). Despite a few differences in waveform characteristics when compared to phloem sap feeding aphids (Tjallingii 1988; Prado and Tjallingii 1994; van Helden and Tjallingii 2000), waveforms A and C were labeled using the canonical terminology for EPG waveforms of phloem sap feeding Aphididae, waveform A being the initial electric contact of stylets with plant tissues, and waveform C being the salivary sheath secretion and extracellular activities during the stylet penetration of the cortical parenchyma (Tjallingii 1988, 2000). A new term was created for a new intracellular phase, “waveform Icp” (Intracellular cortical parenchyma), because this type of waveform has not previously been described.

During an 8 h period, *P. passerinii* performed an average of  $2.2 \pm 0.5$  probes ( $n = 20$ ) with a mean duration of  $115 \pm 24$  min per probe ( $n = 20$ ). Waveform A was always recorded at the start of probes for the 20 aphids, with a mean duration of  $4.5 \pm 0.4$  min ( $n = 20$ ) (Fig. 2a, Table 2). This waveform was characterized by one to three stepwise increases in voltage levels, each starting with irregular signal at a high maximum frequency (1-11 Hz) and followed by a low amplitude period. Electrical resistance appeared its main electrical origin (Table 1).

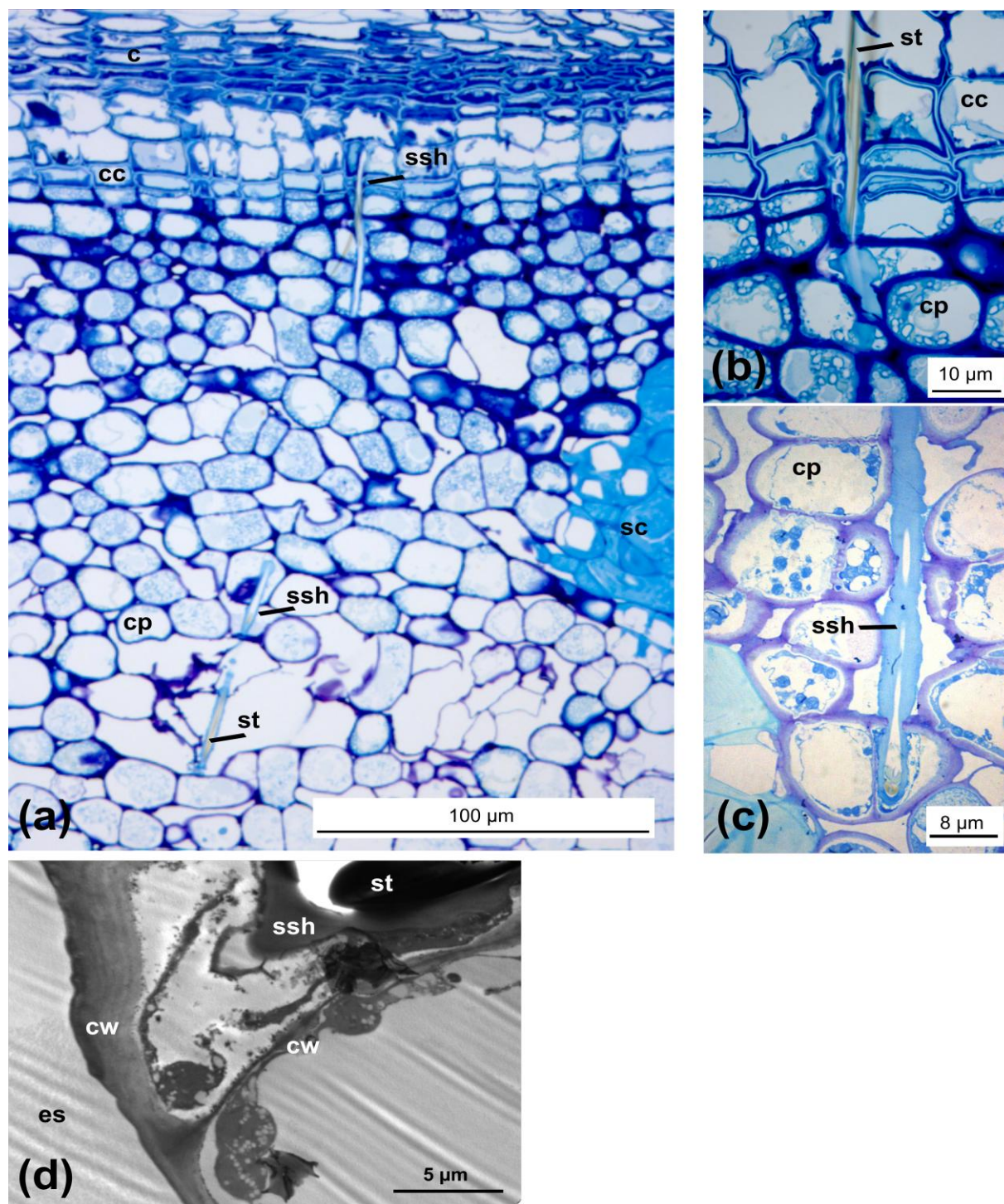
Waveform C occurred in every recording, always at extracellular voltage level with a mean duration of  $3.2 \pm 0.3$  min ( $n = 20$ ) for each uninterrupted period, and an average occurrence of  $18.8 \pm 2.0$  ( $n = 20$ ) periods per aphid (Fig. 2a, Table 2). The signal was irregular, with a pattern of frequently

occurring sub-waveforms C-I and C-II, and occasionally occurring sub-waveforms C-III or C-IV, all with a high amplitude, a frequency range of 1-7 Hz, and resistance as the main electrical origin (Fig. 2c, Table 1). Occurrence and duration of the sub-waveforms in waveform C are not given because of a more or less distinct repetitive pattern depending on the EPG recordings. Contrary to other aphids, no clear B waves were shown during waveform C.

**Table 1** Characteristics of electrical penetration graph (EPG) waveforms of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* during an 8 h access period to the bark of *Populus x canadensis* cv. 'I214' stem-cuttings. Correlations with stylet activities in *P. passerinii* were made using light microscopy of *P. passerinii* salivary sheaths and feeding sites, comparisons with stylet activities from phloem sap feeding aphids (van Helden and Tjallingii 2000) and from *Eriosoma lanigerum*, a tree-dwelling aphid that feeds on lignified plant tissue (Sandanayaka and Hale 2003).

EPG waveform	Waveform characteristics				Correlations	
	Amplitude (%)	Frequency (Hz)	Voltage level	Electrical origin	Stylet tips in plant tissue	Stylet activities
Np	0	-	-	-	Not in plant	Non-probing
A	0-50	1-11	Extrac.	R	Epidermis/cork	Initial electric contact of stylet-plant
C					Cortical parenchyma	Salivary sheath
C-I	100	1-7	Extrac.	R		secretion and
C-II	20-300	1-7	Extrac.	R		extracellular activities
C-III	20-150	1-7	Extrac.	R		during stylet pathway
C-IV	150-500	1-7	Extrac.	R		
Cpi					Cortical parenchyma	Ingestion?
Icp-I (+)	-	1-7	Intrac.	emf		[Correlation work is
Icp-I (-)	-			emf		needed to verify that
Icp-II	-	3-8	Intrac.	emf		waveform Icp (or a
Icp-III	-	0.1-0.5	Intrac.	emf		specific Icp sub-
						waveform(s) actually
						represents ingestion]

*Note:* Relative amplitude (minimum to maximum deflection) only for R components; compared to sub-waveform I of waveform C (C-I); voltage level extracellular (extrac.) or intracellular (intrac.); main electrical origin (R) resistance fluctuation or (emf) electromotive force; Np, Non probing; Icp-I (+), positive peak of sub-waveform Icp-I; Icp-I (-), negative peak of sub-pattern Icp-I.

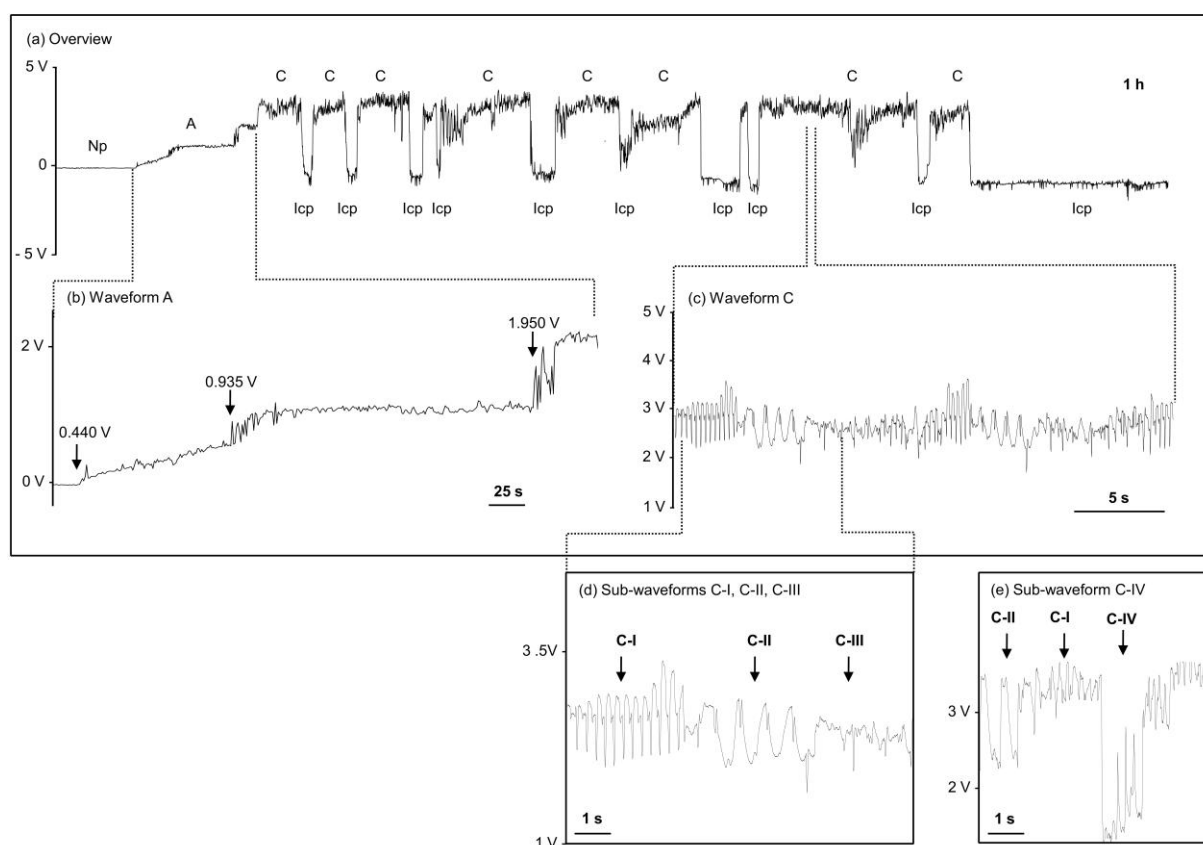


**Fig. 1** Sections of stylet pathways of *Phloeomyzus passerinii* adult parthenogenetic females feeding on the poplar bark of *Populus x canadensis* cv. 'I214'. (a) Light microscopy of transversal section (1.25 µm thick) of poplar stem-cutting showing a straight stylet pathway ending in the cortical parenchyma (b) details of break in cell wall and (c) Light microscopy of ultra thin transversal section (150 nm thick) of stylet tips in cortical parenchyma. (d) Transmission electron microscopy (TEM) of transversal sections (150 nm thick) of stylet in a cortical parenchyma cell showing presence of cell remnants. The neighboring cell without stylets didn't show such remnants. c, cork; cc, cork cambium; cp, cortical parenchyma; sc, sclerenchyma; st, stylets; ssh, salivary sheath; cw, cell wall; es, extracellular space.

**Table 2** Occurrence (% and numbers) and duration (min) of EPG waveforms in the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* during 8 h recordings on the bark of *Populus x canadensis* cv. 'I214' stem-cuttings. Np, non-probing.

EPG waveforms & sub-waveforms	% aphids showing	Periods / aphid			Period duration / aphid				
		Mean	±	SE	(Min-Max)	Mean	±	SE	(Min-Max)
Np	100	2.6	±	0.5	(1-11)	176.5	±	24.7	(32.1-431.4)
A	100	2.2	±	0.5	(1-10)	4.5	±	0.4	(1.6-8.4)
C	100	18.8	±	2.0	(8-39)	3.2	±	0.3	(1.7-6.6)
b-Icp <sup>1</sup>	100	16.2	±	1.6	(7-29)	1.0	±	0.1	(0.3-2.7)
s-Icp <sup>2</sup>	65	1.3	±	0.2	(1-3)	106.4	±	28.8	(20.1-377.0)
Icp-I	100	34.5	±	1.7	(26-44)	0.67	±	0.02	(0.59-0.84)
Icp-II	100	256.5	±	23.4	(128-396)	0.31	±	0.04	(0.09-0.48)
Icp-III	65	216.3	±	30.4	(91-369)	0.16	±	0.02	(0.12-0.28)

Note: <sup>1</sup> b-Icp are the brief Icp events (Icp < 10min) that occurred during stylet pathway; <sup>2</sup> s-Icp are the sustained Icp events (Icp > 10 min), Icp-I, -II, and -III are waveform Icp sub-waveform. Occurrence and duration of waveform C sub-waveforms are not given because of a more or less distinct repetitive pattern depending on recordings.



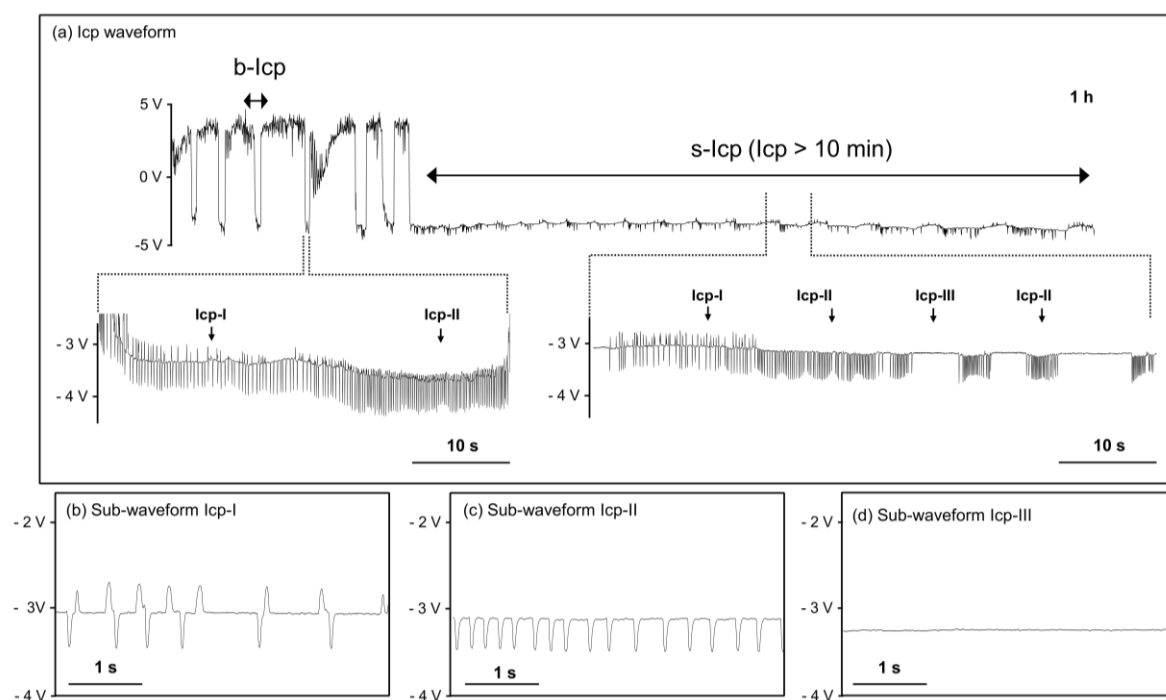
**Fig. 2** Electrical penetration graph (EPG) signals of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* probing on the bark of *Populus x canadensis* cv. 'I214' stem-cuttings. (a) 1 h general scheme of a typical EPG recording. (b) Waveform A, representative trace of the starting point of an EPG recording showing three main voltage levels (shown by arrows). (c) Waveform C, typical succession of several sub-waveforms C: C-I, C-II, C-III (d) and C-IV (e). Sub-waveforms C-III and C-IV, occasionally occurring.

Waveform Icp also occurred in all recordings at a distinctly lower voltage level than the other waveforms, which suggests that the stylets had punctured a membrane of a living plant cell (Fig. 2a) (Tjallingii 1985b). The Icp waveform showed three sub-waveforms, Icp-I, Icp-II and Icp-III, the characteristics of which are given in Table 1. Two distinct Icp periods occurred (Fig. 3), brief Icp periods (b-Icp) of about 0.3-2.7 min and sustained Icp (s-Icp) that lasted longer than about 20 min (Table 2). Brief Icp periods were found in all recordings embedded in waveform C (Fig. 2a). They occurred  $16.2 \pm 1.6$  times on average per individual with a mean duration of  $1.0 \pm 0.1$  min ( $n = 20$ ) per period (Fig. 3a, Table 2). During a b-Icp period, Icp-I was followed by Icp-II (only one period of each). The sustained Icp periods were observed in 65% of the 8 h recordings (Table 2) and occurred  $1.3 \pm 0.2$  times per individual with a mean duration of  $106.4 \pm 28.8$  min ( $n = 13$ ) (Table 2). The s-Icp periods showed all three sub-waveforms, Icp-I, Icp-II and Icp-III (Fig. 3a). High-resolution graphs (Fig. 3) showed that Icp-I has two types of peaks, positive and negative, which seem independent from each other (Fig. 3b). The positive peaks showed somewhat smaller amplitude than the negative ones, those later being very similar to those in Icp-II. This suggests that Icp-I and -II have these negative peaks in common, although in Icp-II they are occurring at a higher frequency than in Icp-I (3-8 Hz vs. 1-7 Hz; Fig. 3a, insets). Icp-I occurred  $34.5 \pm 21.7$  times per individual with a mean duration of  $0.67 \pm 0.02$  min, whereas Icp-II occurred  $256.5 \pm 23.4$  times with a mean duration of  $0.31 \pm 0.04$  min ( $n = 20$ ). The last sub-waveform Icp-III showed a nearly flat signal (low amplitude and no distinguishable frequency) and occurred  $216.3 \pm 30.0$  times on average per individual, usually between two Icp-II sub-waveforms, with a mean duration of  $0.16 \pm 0.02$  min ( $n = 13$ ). The main electrical origin of each Icp sub-waveform was emf (Table 1).

*Time partitioning and sequence of waveforms.* During 8 h of EPG recording, *P. passerinii* spent on average 26.5 % of the time non-probing (Np) from the start of the first probe ( $n = 20$ ). During probing activities in the cortical parenchyma, it spent more time in intracellular than in extracellular activities (62% vs. 38%,  $n = 20$ ). Several EPG parameters were selected to describe the probing behavior of *P. passerinii* (Table 3). On average, the first probe occurred after 3 h of non-probing activity ( $192.5 \pm 29.0$  min). The first C + b-Icp period occurred soon after the onset of the first probe, while the first s-Icp after the onset of the first probe was 2 h ( $123.0 \pm 34.5$  min). Within a probe, the total time spent in waveforms A + C + b-Icp before the first s-Icp was  $49.2 \pm 3.8$  min, including on average  $14.1 \pm 1.8$  b-Icp periods.

Sequence analysis of waveforms during all 160 h of EPG recording (20 recordings of 8 h each) showed that all individuals began probing with waveform A which was followed by waveform C (Fig. 4). The general scheme that came after the A and the first C periods consisted in alternate b-Icp patterns and waveform C. 86.9% of waveforms C were followed by b-Icp patterns that all returned to waveform C. Only 4.5% of all waveforms C initiated were followed by a sustained Icp pattern (s-

Icp). More than half of the initiated s-Icp (58.8 %) was maintained until the end of the recording, while the others returned to waveform C. Finally, 8.5% of waveforms C were followed by non-probing activity, which was maintained until the end of recording in 22.6% of cases and returned to waveform A in the other cases.



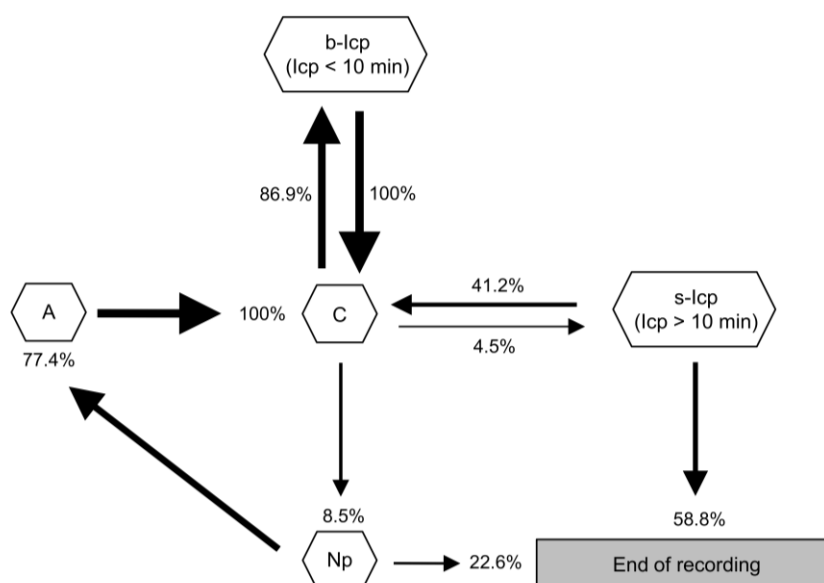
**Fig. 3** (a) Waveform Icp found in a 1 h *Phloeomyzus passerinii* EPG recording on the bark of *Populus x canadensis* cv. 'I214' stem-cuttings: (1) b-Icp: brief Icp events (Icp < 10 min) observed during stylet pathway and composed of sub-waveform Icp-I followed by sub-waveform Icp-II, (2) s-Icp: sustained Icp events (Icp > 10 min) composed of a typical succession of sub-waveforms Icp-I, Icp-II and Icp-III. Higher resolution views of representative sub-waveforms; (a) Icp-I, (b) Icp-II and (c) Icp-III

**Table 3** Electrical penetration graph (EPG) parameters used to study the probing behavior of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* during an 8 h access period to the bark of *Populus x canadensis* cv. 'I214' stem-cuttings. Np, non-probing

EPG parameters	Mean	±	SE	(Min-Max)
Time parameters (min)				
Time from the beginning of experiment to first probe <sup>1</sup>	192.5	±	29.0	(11.4-437.3)
Time from start of first probe to first C + b-Icp <sup>2</sup>	4.5	±	0.5	(1.6-8.1)
Time from start of first probe to first s-Icp <sup>3</sup>	123.0	±	34.4	(17.9-375.1)
Total duration of Np from start of first probe to end of recording	127.2	±	25.9	(0-316.37)
Total duration of A + C + b-Icp <sup>2</sup> before the s-Icp <sup>3</sup> within a probe	49.2	±	3.8	(17.9-67.2)
Occurrence parameter				
Number of b-Icp <sup>2</sup> before the first s-Icp <sup>3</sup>	14.1	±	1.8	(5-29)

Note: <sup>1</sup> Starting point of probe is waveform A; <sup>2</sup> b-Icp are brief Icp events (Icp < 10min) that occurred during stylet pathway;

<sup>3</sup> s-Icp are sustained Icp events (Icp > 10min).



**Fig. 4** Sequence analysis of waveforms. Typical sequence probability of waveforms as occurred during probing behavior of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* in the bark of poplar stem-cuttings of the genotype *Populus x canadensis* cv. 'I214'. The values near the arrow correspond to the likelihood that one waveform is followed by any other type. Probabilities < 1% are not shown

## Discussion

Histological analysis of salivary sheaths and EPG waveforms revealed that *P. passerinii* likely feeds from cortical parenchyma tissue. This strategy is in agreement with both the little honeydew secretion of *P. passerinii* when compared to phloem sap feeding aphids (personal observation) and the stylet length of *P. passerinii*. This tiny aphid (1.6-1.7 mm in length; Arzone and Vidano 1984) does not have a very long stylet as do aphids of the *Stomaphis* species (Blackman and Eastop 1994; Dixon 1998) which feed on the trunks of mature trees, and is not a large species like phloem sap feeding aphids that probe on tree bark such as Lachninae. Even if *P. passerinii* inserted the whole of its stylet (i.e. approximately  $760 \pm 17 \mu\text{m}$ ) into the mature poplar bark – its preferred feeding site – the stylet are not long enough to penetrate the distance of  $1685 \pm 96 \mu\text{m}$  into the inner cortical parenchyma tissue to reach the phloem.

The stylet pathways of *P. passerinii* within the cortical parenchyma appeared to differ from those of phloem sap feeding aphids. Phloem sap feeding aphids leave many empty branches of salivary sheaths (Tjallingii and Hogen Esch 1993), whereas *P. passerinii* leave only straight, unbranched salivary sheaths. This observation suggests that *P. passerinii* does not need to locate phloem vessels, which is not surprising if it feeds exclusively in the cortical parenchyma. Changes in the stylet pathway of *P. passerinii* were only observed when stylets encountered blocks of

sclerenchyma (Deprost E., unpubl. data), which has also been observed for other aphids feeding on woody tissues such as *E. lanigerum* (Staniland 1924). Previous transmission electron microscopy studies showed that aphid stylet pathways were extracellular (sometimes intramural) with brief intracellular punctures (potential drop [pd] waveforms) of cells bordering the stylet pathway (Kimmins 1986, 1988; Tjallingii and Hogen Esch 1993). The stylet pathway of *P. passerinii* was also extracellular. However, some cells encountered along the pathway seemed to have been crossed and punctured (as suggested also by the presence of cell remnants in damaged cells), which seems to match the straight route of *P. passerinii*'s salivary sheath.

One waveform, Icp, is new for *P. passerinii*. Given the non-vascular feeding strategy of *P. passerinii*, all waveforms except for waveform A appeared to be correlated with stylet tip positions within the cortical parenchyma. Although not new, waveform A differed from the typical brief, high amplitude signals reported from aphids feeding on soft plant tissues (Tjallingii 1988) but was similar to woolly apple aphids, *E. lanigerum*, which penetrate their stylets into woody apple shoots (Sandanayaka and Hale 2003). Initially, this aphid also had long waveform A periods with one to three sudden increases in voltage level, indicating an extracellular stylet activity generating a continual decrease in resistance component, probably as a result of cork penetration. The bark probably becomes more electrically conductive closer to the cortical parenchyma, explaining the increasing voltage levels. Waveform A in EPGs of phloem sap feeding aphids is soon followed by waveform C correlated to both salivary sheath secretion and extracellular stylet penetration within the parenchyma tissue (Tjallingii 1978, 1988; Tjallingii and Hogen Esch 1993). On the basis of similarities in waveform characteristics and tissue location it is most likely that waveform C of *P. passerinii* is correlated to the same activities. However, the sub-waveforms of waveform C showed more or less distinct repetitive patterns, as described in Janssen et al. (1989) on whitefly. These authors suggested that they reflected an alternation of intercellular secretion of sheath saliva and mechanical progress of the stylets. Repetitive patterns in *P. passerinii* might be related to such alternation of activities during penetration, but further analyses are required to link sub-waveforms to the aphid activities. Waveform B features from other aphids were less clear or missing (Tjallingii 1988).

The main difference between *P. passerinii* and other aphids appeared in waveform Icp, the intracellular phase in cortical parenchyma cells. The EPGs showed two distinct waveform Icp periods: (1) the brief b-Icp, usually lasting about one minute, occurred 16 times on average, and (2) a sustained s-Icp, lasting more than 20 minutes, that often occurred subsequently. The return to waveform C at the end of a pd waveform in phloem sap feeding aphids (lasting 5-15s, typically) seems to be due to the withdrawal of the stylet tip from the living cell (Tjallingii 1985b). Alternatively, the return could be prompted by the stylet piercing the membrane at the opposite side of the cell or by the death of the punctured cell. In the case of *P. passerinii*, the two latter explanations seem more appropriate as shown by intracellular passages in the straight stylet pathways. The relatively small number of b-Icp

waveforms and their much longer duration than the pd waveforms support the hypothesis that they might be related to crossing the cells, meanwhile possibly ingesting their contents. The biological significance of the s-Icp waveform is much more difficult to explain. The sustained intracellular phase in non vascular cells is rather different from committed phloem ingestion in phloem feeders (Pettersson et al. 2007). The way in which *P. passerinii* ingests nutrients from the cortical parenchyma cells during these periods of s-Icp, is a question open to speculation. Kunkel (1967) suggested that parenchyma feeding Homoptera might stimulate a symplastic nutrient flow from surrounding cells and allowing subsequent sucking of the fluid contents of several cells by puncturing only one cell. Although rather speculative, this hypothesis corresponds to the clear indication of an intracellular position of stylet tips during s-Icp. The difference between b-Icp and s-Icp, in terms of waveform, is that Icp-III only occurred in the latter. However, this sub-waveform represents a 'silent period', suggesting no apparent activities, in contrast to Icp-I and Icp-II that showed regular repetitions of peaks (Fig. 3). The Icp-II peaks may suggest similarity to the E2 phloem ingestion waveform in phloem sap feeding aphids. However, the E2 peaks in other aphid EPGs have mixed emf/resistance origin and are not related to ingestion but to salivation, concurrently with ingestion. Ingestion is reflected by a regular sine-wave like signal of about 5 Hz, similar to but with a much lower amplitude than the waveform during xylem ingestion (Prado and Tjallingii 1994). The peaks shown in our Icp-I and -II may, therefore, be related to salivation, the Icp-I peaks resembling the E1 salivation peaks and the Icp-II downward peaks resembling the E2 salivation peaks. Furthermore, Icp-I always occurred before Icp-II, similar to E1 always preceding E2. However, similarities in waveform shape are generally not reliable and further experimental studies are required to explain them. Sub-pattern Icp-III was only observed during s-Icp events between two sub-patterns Icp-II. This sub-pattern was associated with intracellular position of stylets in parenchyma cells and showed a flat trace usually lasting less than 10 s. Under the hypothesis that a symplastic nutrient flow occurs during s-Icp period, Icp-III might correspond to the period during which the punctured cell has been emptied of its content and is filled from the contents of surrounding cells. Alternatively, an intracellular osmotic pump hypothesis could be possibly applied to Icp-III, a 'pressure release' (into the food canal) period between Icp-II periods, during which salivation may have increased the osmotic pressure in the punctured cell. Further studies involving correlation work by running EPG recordings in parallel with histological studies, quantifications of honeydew secretion or stylectomy will be necessary to confirm these hypotheses.

The average time needed to reach a sustained intracellular phase in a cortical parenchyma cell after plant access in *P. passerinii* (5 h) is similar to that reported in phloem sap feeding aphids: 5-7 h in some aphid-plant combinations (Tjallingii and Mayoral 1992), although this includes a longer non-probing time before the first probe (3 h). It would be interesting to perform further assays to test the effects of tethering on this first long non-probing period. In phloem sap feeding aphids, 1 h of complex

probing activity distributed over several separate probes, frequently including some short sieve element punctures has been observed regularly (Tjallingii and Mayoral 1992). In *P. passerinii*, the sustained intracellular phase was preceded by 2 h of a relative more simple sequence of events with an average of two probes per recording. This simplicity is probably due to the fact that mainly one type of plant tissue is penetrated. Only waveform A and early waveform C represent penetrating a different tissue: cork and cortical cambium, respectively. Then, alternations of waveform C and b-Icp reflected extracellular stylet penetration and crossing of cortical parenchyma cells.

Pollard (1973) underlined that Aphidoidea penetrate plant tissues targeting phloem sieve tubes, with exceptions for some tree-dwelling aphids species for which the destination of stylets is the cortical parenchyma such as in Adelgidae. In studying the probing behavior of Adelgidae (i.e. *Pineus boernerii* Annand on *Pinus taeda* L.), Cardoso (2007) described two main waveforms (one extracellular and one intracellular), which could be comparable to the waveforms C and Icp of *P. passerinii*'s EPGs. The most striking difference is the absence of short intracellular events (comparable to b-Icp) occurring during the pathway phase. In *P. boernerii*'s EPGs, aphids generally stay on average 1.7 h in the extracellular phase before shifting to a sustained intracellular phase (Cardoso 2007). However, penetration of cortical parenchyma tissue of conifer stems by Adelgidae is intercellular and only occasionally intracellular (Balch 1952; Pollard 1973; Müllick 1977). This could explain the absence of short intracellular events related to crossing of cortical parenchyma cells and could confirm the biological significance of b-Icp pattern. Some Adelgid species have a 2-year life cycle consisting of two different feeding strategies according to the years (Havill and Footitt 2007). For instance, *Adelges piceae* feeds on galls initiated on its primary host (i.e. spruce) the first year, but feeds by inserting its stylets inside cortical parenchyma cells of the trunk of its secondary host (i.e. firs) the second year (Balch 1952; Balch et al. 1964; Müllick 1977). When *A. piceae* penetrate cortical parenchyma cells of fir trunks, they trigger a hyperplasy and a hypertrophy of cortical parenchyma cells that might increase the sugar content and nutritional quality of these cells (Balch 1952; Balch et al. 1964; Müllick 1977). The prolonged intracellular phase in *P. passerinii*'s EPGs might be related to feeding in such nutritious tissue. However, such cellular modifications are generally visible after a few days (Müllick 1977). *P. passerinii* initiated a sustained intracellular event after a time lag of 5 h from the beginning of the experiment.

Tree-dwelling aphids have been considered to cause less damage than other sucking insects because they are rarely responsible for virus infection and their damage is mainly linked to reduction in tree growth (Blackman and Eastop 1994). However, it seems that we are here confronted with an exception where bark damage may result in extensive tree mortality. Two main hypotheses might explain such a phenomenon. Firstly, damage might be the consequence of tissue modifications caused by normal feeding. For instance, morphs of *A. piceae* in their secondary host are, with *P. passerinii*, the only known trunk-dwelling aphids that do not cause apparent galls but induce extensive tree

mortality. *A. piceae* triggers a non specific response consisting in the formation of a “wound periderm” within cortical parenchyma cells and a histological modification of tracheids similar to “compression wood” which disturbs sapwood translocation and causes tree mortality (Müllick 1977; Miles 1989). Secondly, herbivores having intimate relationships with their host trees, such as sessile Hemipteran, may induce a hypersensitive reaction (HR), i.e. a localized host tissues death reducing the negative impact of the insect (Fernandes 1990). Species inducing strong HR may be particularly damaging to their host tree by causing widespread tissue necrosis and tree mortality (Radville et al. 2011). The presence of an extended necrosis of cortical cells and the rapid and important poplar mortality following *P. passerinii* infestation suggest that its feeding mode induces such pronounced HR. Moreover, a plant that has no co-evolutionary history with a specific herbivore is more likely to exhibit a HR resulting in widespread tissue necrosis (Ryan et al. 1990). Poplar grown in poplar stands are recent man selected hybrids. Thus, the lack of co-evolutionary history between *P. passerinii* and these hybrids might also contribute to the development of a strong HR. However, the consequences of the feeding mode on poplars are still unknown and it is not known whether symptoms of damage are linked to a comparable tree responses.

In a broad ecological perspective, this study extends knowledge of the bark-feeding nutritional ecology of Aphididae. *P. passerinii* is the only Aphididae species known to feed on cortical parenchyma cells without causing apparent galls, a diet more usually encountered in Adelgidae (Pollard 1973; Müllick 1977; Miles 1989). Parenchyma feeding is a characteristic of the two primitive families, i.e. Adelgidae (all associated with conifers) and Phylloxeridae (mainly associated with oaks and pecans) (Pollard 1973; Blackman and Eastop 1994; von Dohlen and Moran 2000). Heie (1987) suggested that the success of the Aphididae lineage was partly due to the emergence of phloem sap feeding as inferred from the evolution of a large cauda in recent families of Aphidoidea. Because a large cauda gives a morphological advantage by allowing the excretion of the large quantity of honeydew produced by phloem feeders, it may have developed during the shift from parenchyma feeding to phloem sap feeding (Heie 1987). *P. passerinii* is the only species of the sub-family Phloeomyzinae (Blackman and Eastop 1994), a very peculiar family characterized by a rounded rudimentary cauda (Heie 1987). This morphological characteristic is not surprising given the mode of feeding of *P. passerinii* and might be associated with a primitive parenchyma feeding lifestyle. The phylogenetic position of Phloeomyzinae has not yet been elucidated. However, the mode of feeding of *P. passerinii* suggests that it might be a primitive sub-family in the Aphididae lineage that evolved before the emergence of the phloem sap feeding lifestyle in Aphididae. Its exact position however, still needs to be clarified.

In conclusion, despite the feeding preference of *P. passerinii* for the bark of mature trees, both histological and EPG analysis performed on poplar stem-cuttings were appropriate ways of studying the mode of feeding of this trunk feeder. They gave significant new insight into the feeding ecology of

Aphididae and showed a simpler probing behavior than phloem sap feeding aphids, probably owing to the small number of tissues crossed. The distinction between the short and sustained intracellular events of waveform Icp made it possible to separate *P. passerinii* EPG waveforms into two main phases: a pathway phase (gathering waveforms A, C and b-Icp) and a sustained intracellular phase (s-Icp) in cortical parenchyma tissue. The information obtained on the feeding site and stylet penetration of *P. passerinii* should serve as a basis for advanced studies on the mechanisms that lead to tree mortality and the poplar's resistance mechanism.

**Acknowledgments** This work is part of the PhD thesis of S. Poiteau carried out under the directorship and supervision of F. Lieutier with the participation of S. Bankhead-Dronnet as a co-supervisor. It was supported by grants from the French Ministry of Agriculture, Food and Fisheries (MAAP) and the French Ministry of Research and Education. We thank Freddy Tjallingii for his suggestions and corrections, which greatly improved the quality of this manuscript. We are grateful to Alain Moreau (INRA Orléans, France) and Bernadette Delaleu (INRA Nouzilly, France) for their technical support in histology.

### 3. ETUDE PHYLOGENETIQUE ET EVOLUTION DES MODES D'ALIMENTATION CHEZ LES APHIDIDAE

#### 3.1. Introduction

Au cours de l'étude précédente nous avons pu montrer que *P. passerinii* s'alimente dans le parenchyme cortical du tronc de peupliers selon un mode de pénétration encore jamais observé au sein des Aphididae. En comparant ce mode d'alimentation à celui des deux familles primitives Adelgidae et Phylloxeridae, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait correspondre à un caractère primitif au sein des Aphididae. Compte tenu de la position systématique non résolue de *P. passerinii*, il apparaissait donc intéressant de clarifier les liens phylogénétiques des Phloeomyzinae avec les autres sous-familles. Cette analyse devrait permettre d'apporter des informations utiles pour comprendre l'évolution du mode d'alimentation des pucerons au sein des Aphididae.

Plusieurs études ont tenté de réaliser une reconstruction phylogénétique globale des sous-familles d'Aphididae en se basant sur les caractères génétiques (cf. chapitre I, partie 2 § 2.2.3.). Elles se sont cependant révélées inadaptées à la résolution des nœuds profonds (i.e niveaux supérieurs à la tribu), probablement à cause de l'utilisation de gènes mitochondriaux dont le pouvoir résolutif s'avère inadapté aux groupes ayant connu de rapides radiations évolutives (Ortiz-Rivas et al. 2004). Ce cas de figure s'est ainsi également présenté lors de la résolution des liens phylogénétiques au sein du groupe des *Drosophila* (Barrio et al. 1994). Le génome nucléaire est constitué de gènes codants, fortement conservés, qui peuvent être utilisés pour résoudre de telles phylogénies. Ortiz-Rivas et al. (2004) ont montré l'utilité du gène LWO ('Long Wave-length Opsin', codant pour le pigment visuel 'Opsine'), dans la résolution des liens phylogénétiques pour des niveaux taxonomiques supérieurs à la tribu chez les pucerons Aphididae. Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010) ont ensuite mis en évidence que les reconstructions phylogénétiques effectuées avec LWO supportaient le groupement des sous-familles d'Aphididae en trois grandes lignées: (1) A + D (Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae and Pterocommatinae), (2) E + T (Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae and Thelaxinae, et (3) L (Lachninae) concordantes avec les différents scénarios d'évolution du cycle biologique des pucerons. Cette reconstruction phylogénétique supporte la topologie des principales lignées décrites par Wojciechowski (1992), avec toutefois un désaccord important quant à la position systématique basale des Lachninae. Ils ont également souligné que la combinaison du gène LWO avec d'autres gènes nucléaires [e.g. EF1 $\alpha$  (Elongation Factor 1  $\alpha$ ; Normark 1999)] ou avec des gènes mitochondriaux au faible pouvoir résolutif [ATP6 (sous-unité 6 de la F-ATPase) et COII (Cytochrome oxydase II)] avait pour effet d'augmenter le support de la monophylie de certaines sous-familles. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser le gène LWO pour résoudre les liens phylogénétiques des

Phloeomyzinae avec les autres sous-familles et de le combiner avec un second gène nucléaire, le gène EF1 $\alpha$ .

### 3.2. Matériels & Méthodes

Afin d'éviter les redondances avec le chapitre IV, les matériels et méthodes relatifs à l'étude phylogénétique ne sont pas présentés dans cette section. Le choix des espèces de pucerons incluses dans la reconstruction phylogénétique, les informations relatives aux marqueurs nucléaires choisis et aux méthodes moléculaires utilisées ainsi que le détail des analyses phylogénétiques sont détaillées dans l'article n°6.

### 3.3. Résultats

L'arbre phylogénétique non-enraciné obtenu à partir du jeu de donné, incluant les première et seconde positions de codon du gène LWO et toutes les positions de codon du gène EF1 $\alpha$  pour l'ensemble des 28 espèces étudiées, montre une topologie congruente avec les trois principales lignées (A +D, E+T and L) précédemment décrites dans Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010) (Fig. II.2). Le support statistique des nœuds (maximum de vraisemblance) pour les trois lignées et les sous-familles à l'intérieur des lignées est globalement très haut, excepté pour les sous-familles de la lignée E + T. La sous-famille des Phloeomyzinae montre un lien phylogénétique hautement supporté avec celle des Lachninae. Elle a donc été incluse dans la lignée L renommée L + P (Lachninae et Phloeomyzinae).

### 3.4. Discussion

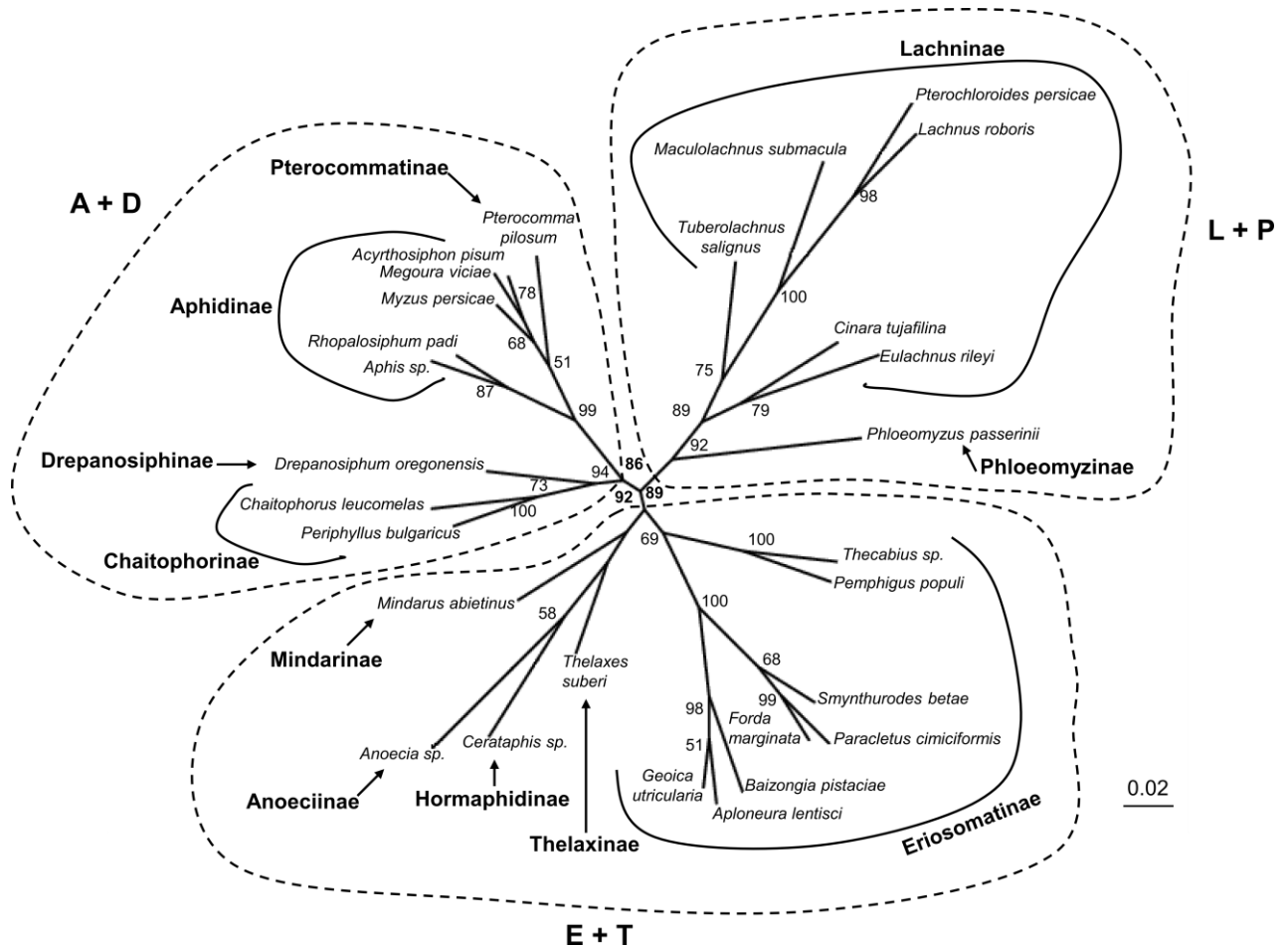
Notre résultat est en désaccord avec la proposition de Wojciechowski (1992) (cf. chapitre I, Fig. 2.5b) qui suggérait de relier les Phloeomyzinae aux Thelaxinae et donc à la lignée E + T. Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010) ont proposé une combinaison de caractères morphologiques indiqués comme caractéristiques de la lignée L : (i) un intestin long présentant des boucles, (ii) des triommatidies au premier stade larvaire, (iii) des cornicules courts ou poriformes, (iv) un processus terminalis plus court que la base du dernier article antennaire, (v) un rostre à cinq articles et (vi) l'absence de glandes accessoires. Les Phloeomyzinae possèdent les caractères i, iii et iv (Ponsen 1982 ; Nieto-Nafría & Mier-Durante 1998) et Wojciechowski (1992) évoque en outre la présence du caractère ii, mais le rostre de *P. passerinii* est composé de quatre articles. Il n'existe pas de donnée sur les glandes accessoires. Si l'on considère les caractères proposés par Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010), la combinaison des caractères morphologiques relatifs à la forme de l'intestin et des cornicules

et la configuration du dernier segment antennaire semble donc la mieux adaptée pour caractériser la lignée L + P vis-à-vis des deux autres lignées. Enfin, les caractères morphologiques diagnostiques qui différencient les Phloeomyzinae des Lachninae sont la présence de femelles sexuées toujours ailées et des ailes disposées à plat au repos (Heie 1987), tandis que le rostre à cinq articles caractérise les Lachninae.

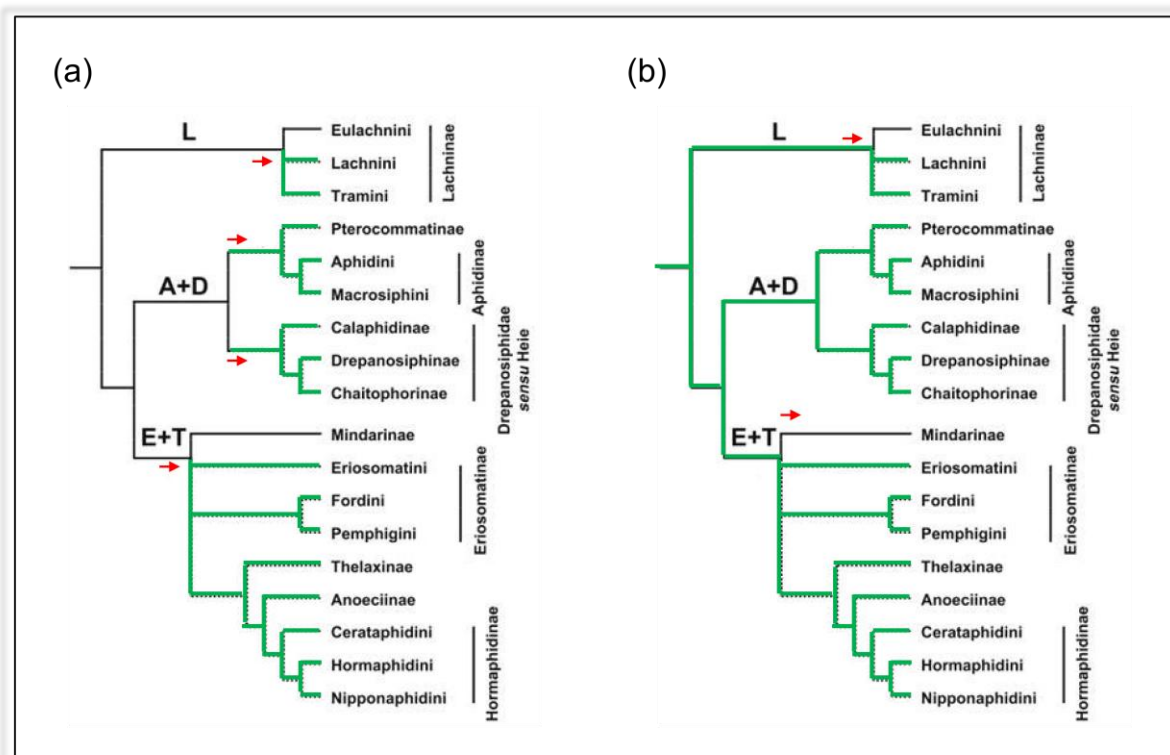
Les différentes combinaisons de gènes et les reconstructions phylogénétiques effectuées par Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010) suggèrent une position basale des Lachninae dans la phylogénie des Aphididae (Fig. II.3). Nos résultats suggèrent une position basale des Phloeomyzinae au sein de la lignée L + P. L'écologie et le cycle de vie des Lachninae et des Phloeomyzinae présentent des similitudes. Comme les Phloeomyzinae, les Lachninae (tribus des Lachnini et Eulachnini, excepté la tribu des Tramini associée aux Astéracées) sont monoéciques sur arbres (Blackman & Eastop 1994 ; Normark 2000). Les Eulachnini se développent sur les aiguilles de conifères (e.g. *Cinara* spp. sur *Pinus* spp.), tandis que les Lachnini se développent sur l'écorce du tronc, des branches, des tiges et des racines des Rosacées (*Pterochloroides persicae* (Cholodkovsky) sur *Prunus* spp.), des Salicacées (e.g. *Tuberolachnus* spp. sur *Salix* spp.) et des Fagacées (e.g. *Stomaphis* spp. sur *Quercus* spp.) (Blackman & Eastop 1994 ; Normark 2000). Toutes ces espèces de Lachninae sont phloémophages puisqu'elles sont toutes de grande taille et donc capables d'atteindre les tubes criblés situés en profondeur sous l'écorce (cf. chapitre I, partie 1 §1.1.5) (Pollard 1973 ; Blackman & Eastop 1994). Par conséquent le mode d'alimentation dans le parenchyme de l'écorce du tronc du peuplier chez *P. passerinii* et la position systématique basale des Phloeomyzinae au sein de la lignée L + P suggérée par notre résultat (Fig. II.2) semblent valider notre hypothèse du caractère primitif du mode d'alimentation de *P. passerinii*.

En ce qui concerne les Aphididae modernes et compte tenu de l'hypothèse soutenue par plusieurs auteurs d'un ancêtre commun monoécique sur conifère (Heie 1987 ; Shaposhnikov 1987), Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010) ont proposé un scénario de l'évolution du mode d'alimentation des pucerons à partir d'un ancêtre commun sur gymnosperme suivi de quatre transitions jusqu'aux Angiospermes (Fig. II.3a). Sous cette hypothèse, la prise en compte des Phloeomyzinae dans la phylogénie ajoute une 5<sup>ème</sup> transition. Toutefois, les auteurs ont également suggéré que l'explication la plus parcimonieuse de l'évolution du mode d'alimentation des Aphididae serait d'accepter la présence d'un ancêtre commun aux sous-familles vivant sur Angiospermes avec seulement deux transitions des Angiospermes aux Gymnospermes pour la tribu Eulachnini et la sous-famille Mindarinae (Fig. II.3b). Dans ce cas, l'ajout des Phloeomyzinae n'induit pas de transition supplémentaire. Nos résultats concernant à la fois la position systématique basale de *P. passerinii* au sein de la lignée L + P et son mode d'alimentation *a priori* primitif semblent plutôt converger vers l'hypothèse la plus parcimonieuse d'Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010). Si cette hypothèse était juste, il se pourrait

que la lignée des Aphididae modernes soit issue d'une espèce monoécique s'alimentant dans le parenchyme de Gymnospermes (comportement alimentaire primitif suggéré par Heie (1987)) passant ensuite sur Angiospermes et que l'évolution du mode d'alimentation au sein de la lignée L + P soit caractérisée par un passage sur Gymnosperme chez les Eulachnini, un passage à un mode d'alimentation phloémophage sur Angiosperme chez les Lachnini et un passage sur plantes herbacées Astéracées chez les Tramini (non représenté sur la figure II.2). Tous ces résultats ne sont que préliminaires et nécessitent d'être confirmés par la construction d'un arbre enraciné à l'aide d'un outgroup.



**Fig. II.2** Arbre non-enraciné construit selon la méthode de reconstruction phylogénétique du maximum de vraisemblance obtenu à partir d'un jeu de séquences de deux gènes nucléaires combinés [première et seconde position de chaque codon pour le gène LWO (Long Wave-length Opsin) et totalité de chaque codon pour le gène EF1 $\alpha$  (Elongation Factor 1 $\alpha$ )]. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50 % sont données à côté du nœud. Les trois ellipses en pointillé représentent les trois principales lignées regroupant les principales sous-familles d'Aphididae analysées (écrites en gras) : lignées A + D, E + T and L + P (cf. texte § 3.1).



**Fig. II.3** Proposition des relations phylogénétiques parmi les sous-familles d'Aphididae et scénarios d'évolution du mode d'alimentation des pucerons de cette famille selon l'hypothèse d'un ancêtre commun (a) sur Gymnosperme et (b) sur Angiosperme. L'arbre consensus représente un arbre consensus des analyses réalisées dans Ortiz-Rivas & Martínez-Torres (2010). Les lignes vertes représentent les groupes associés aux angiospermes et les lignes noires ceux associés aux gymnospermes. Les flèches rouges représentent les transitions 'Gymnosperme vs Angiosperme' et 'Angiosperme vs Gymnosperme'.



# Chapitre III.

---

Effets de la résistance du peuplier sur le  
puceron lanigère



## Chapitre III.

# E

## ffets de la résistance du peuplier sur le puceron lanigère

### 1. PRESENTATION DE L'ETUDE

Dans le chapitre précédent, nous avons pu élucider certaines étapes de la colonisation du peuplier par le puceron lanigère. Afin d'avoir un aperçu global des interactions entre *P. passerinii* et son hôte, il était important de comprendre comment les mécanismes de résistance peuvent affecter le processus de colonisation. De plus, bien que les mécanismes de résistance et leurs actions sur les pucerons phloémophages soient bien connus, on sait relativement peu de choses pour des pucerons s'alimentant dans le parenchyme. Enfin, l'augmentation croissante du potentiel ravageur de *P. passerinii* ainsi que le coût et les inconvénients écologiques et pratiques des traitements chimiques a conduit à prendre en considération la résistance naturelle du peuplier vis-à-vis du puceron lanigère comme une méthode de lutte alternative. Ce choix est d'autant plus justifié que les populations d'ennemis naturels semblent inefficaces dans la régulation des pullulations en peupleraie (Arzone 1987). L'utilisation des mécanismes naturels de résistance des plantes est un outil de lutte puissant contre les insectes phytophages, qui fait partie intégrante des programmes de lutte intégrée et permet de réduire les coûts économiques et environnementaux. Par exemple, l'utilisation de porte-greffe résistant aux attaques du phylloxera de la vigne *Daktulosphaira vitifoliae* demeure la principale méthode de lutte contre ce ravageur des variétés européennes de vigne. Peu d'essais pratiques ont cependant été réalisés concernant les arbres forestiers. C'est une tâche difficile dans la mesure où l'arbre est un végétal persistant. De plus, comme pour tous les végétaux, l'expression phénotypique de la résistance est la résultante d'interactions entre des facteurs génétiques (i.e. génotype de l'arbre) et des facteurs environnementaux (e.g. température, humidité, sécheresse, fertilisation et pratiques sylvicoles) (Heidger & Lieutier 2002 ; Bidart-Bouzat and Imeh-Nathaniel 2008 ; Henery 2010 ; Rowntree et al. 2010). Toutefois, cette méthode semble la mieux adaptée aux plantations forestières modernes, en particulier au peuplier qui présente de nombreuses espèces et possibilités d'hybridation (Coyle et al. 2002). La mise au point de génotypes d'arbres résistants nécessite : (1) la connaissance précise du comportement de l'insecte et de ses interactions avec son hôte, (2) le criblage de différents génotypes en laboratoire, (3) la mise au point de techniques d'infestation au champ et le criblage de ces mêmes génotypes au champ pour obtenir confirmation de la résistance, (4) l'obtention de critères simples, rapides, pratiques mais fiables d'évaluation des niveaux de résistance, (5) l'identification de

la base de la résistance (caractéristiques anatomiques ou chimiques), (6) sa stabilité face aux variations des facteurs abiotiques, et (7) la recherche des fondement génétique (héritabilité) de la résistance (d'après Kumar 1991). L'étude de la biologie et du comportement de *P. passerinii* (point 1) a fait l'objet du chapitre précédent. Dans ce chapitre, nous nous intéressons d'abord aux points 2, 3 et 4, en comparant les effets du niveau de résistance de divers génotypes de peuplier sur les performances des populations de puceron. Dans une seconde partie, nous étudions de manière fine, pour des génotypes de sensibilité connue, le(s) type(s) de résistance impliquée(s) (antibiose et/ou antixénose) et donnons des premiers éléments de réponse quant à la localisation des facteurs de résistance. Ceci servira de point de départ à l'élucidation des bases de la résistance et ses variations sous l'effet des facteurs abiotiques (points 5 et 6) qui font l'objet d'une autre thèse.

## **2. EFFET DE LA RESISTANCE SUR LES PERFORMANCES DE *P. PASSERINII***

### ❖ Présentation de l'article n°2 et principaux résultats

Des tests de laboratoire ont été développés en Italie et en Iran afin d'évaluer l'effet du génotype de peuplier sur l'insecte et obtenir des informations utiles pour des opérations de screening des génotypes (Arru 1974 ; Arru & Lapietra 1979 ; Allegro & Cagelli 1996 ; Allegro et al. 1996 ; Sadeghi et al. 2007). Ces tests consistent à dénombrer l'abondance des individus ou des colonies de puceron sur des boutures ou des jeunes plants infestés artificiellement. Ils ont montré que les colonies de *P. passerinii* possédaient des capacités de développement variables selon les espèces et les génotypes de peuplier. Toutefois, bien que ces tests présentent l'avantage d'examiner un grand nombre de génotypes pour un coût humain et financier relativement réduit, leurs résultats ne sont que partiellement en accord avec les observations de terrain. Par exemple, certains génotypes comme 'Soligo', jugés résistants sur le terrain, apparaissent sensibles en conditions de laboratoire (Allegro et al. 1996). De plus, s'ils soulignent que la nature du génotype peut avoir un impact sur les populations de *P. passerinii*, ces tests ne permettent pas d'expliquer l'origine de la variabilité de performance des insectes. Celle-ci pourrait résulter en effet d'une réponse comportementale du puceron liée à certains traits de défense de l'arbre hôte affectant la reconnaissance ou les préférences de l'insecte (antixénose) ou d'une altération des paramètres physiologiques du puceron tels que son développement ou sa fécondité (antibiose).

Dans ce contexte, nous avons étudié la résistance de divers génotypes de peuplier cultivés en France et déterminé l'origine des différences de performances observées chez les pucerons. Nous avons aussi vérifié que l'expression de cette résistance était transposable à différentes conditions expérimentales, notamment des conditions de laboratoire aux conditions de terrain. Pour une même

souche de puceron, les performances des insectes ont ainsi été évaluées sous trois conditions expérimentales : (1) boutures non enracinées en laboratoire, (2) plants sous serre et (3) arbres matures en peupleraie. Nous avons testé 10 génotypes de peuplier appartenant à *Populus × canadensis* Moench, *P. × interamericana* Brockh., *P. nigra* L., *P. deltoides* Bartram ex Marshall et *P. trichocarpa* Torr. & A. Gray ex Hook, sélectionnés sur la base de leur importance économique, de leur sensibilité appréciée d'après les dégâts de terrain et de précédents tests de laboratoire (Allegro et al. 1996 ; Baubet 2007). Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse (étude sous serre), du stage de master 2 de V. Lesieur (étude de laboratoire) et d'une étude de terrain réalisée par M. Bonnaffoux.

Les résultats indiquent que les génotypes testés ont affecté différemment le taux de colonisation, la vitesse de développement et la fécondité du puceron, suggérant l'implication de mécanismes de résistances variables selon les génotypes. Les résultats obtenus sous les trois conditions expérimentales ont montré une concordance lorsque les performances démographiques et le taux de colonisation du puceron étaient considérés. Enfin, la méthode d'infestation mise au point sur le terrain s'est avérée efficace pour l'évaluation du niveau de résistance au champ et pourra donc être utilisée ultérieurement dans des expériences visant à étudier la résistance en conditions naturelles.



ARTICLE N°2

Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, in various experimental conditions

Pointeau S, Sallé A, Lesieur V, Bankhead-Dronnet S, Bonnaffoux M & Lieutier F

*Canadian Journal of Forest Research*, **41**, 1233-1241 (2011)



## Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, in various experimental conditions

Sophie Pointeau, Aurélien Sallé, Vincent Lesieur, Stéphanie Bankhead-Dronnet, Matthieu Bonnaffoux, and François Lieutier

**Abstract:** The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Sternorrhyncha: Aphididae), causes the most damage to poplars in southern Europe and the Near East as outbreaks can lead to massive mortality in mature stands. Previous studies, conducted on poplar cuttings or young trees, showed that resistance varied depending on the poplar genotype. However, these results did not indicate how aphid populations were affected by tree resistance and were only partially confirmed by field observations. This study investigated the effect on aphid settlement and performance of poplar genotypes belonging to *Populus × canadensis* Moench, *Populus × interamericana* Brockh., *Populus nigra* L., *Populus deltoides* Bartram ex Marshall, and *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex Hook. using a single aphid clone. The study was conducted under three experimental conditions: (i) unrooted cuttings, (ii) potted cuttings, and (iii) mature trees. The aphid settlement rate, the larval development rate, and the fecundity were affected by the poplar genotype, highlighting the antixenotic and antibiotic properties involved in tree resistance to *P. passerinii*. The laboratory results for aphid performance and settlement rate on unrooted cuttings were transposable to both potted cuttings and mature trees. Laboratory studies could, therefore, provide useful information for identifying the parameters involved in resistance mechanisms.

**Résumé :** Le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Sternorrhyncha : Aphididae), est le plus important ravageur des peupleraies d'Europe méridionale et du Proche-Orient, ses pullulations aboutissant à des mortalités massives dans les peuplements matures. De précédentes études réalisées sur des boutures ou des jeunes peupliers ont montré que la résistance à cet insecte variait selon les génotypes de peuplier mais sans identifier les effets chez les insectes. De plus, les résultats n'ont été que partiellement vérifiés par les observations de terrain. En utilisant une même souche de puceron, nous avons examiné l'impact de génotypes de peuplier appartenant à *Populus × canadensis* Moench, *Populus × interamericana* Brockh., *Populus nigra* L., *Populus deltoides* Bartram ex Marshall et *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex Hook. sur l'installation et les performances du puceron. L'étude a été conduite sous trois conditions expérimentales : (i) boutures non enracinées, (ii) boutures en pot, et (iii) arbres matures. Un effet du génotype a été observé sur le taux d'installation, la vitesse de développement et la fécondité du puceron, soulignant l'implication de phénomènes d'antixénose et d'antibiose dans la résistance à *P. passerinii*. Les résultats de laboratoire se sont avérés transposables aux boutures en pot et aux arbres matures lorsque les performances et le taux d'installation étaient considérés. Les études de laboratoire peuvent donc fournir des informations utiles pour l'identification des paramètres impliqués dans les mécanismes de résistance.

### Introduction

The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Signoret (Aphididae: Phloeomyzinae), is a cosmopolitan monoecious aphid that feeds in bark crevices of mature poplars close to harvesting age (Della Beffa 1936; Aparisi 1971; Sadeghi et al. 2007). Although it has a holocyclic life cycle with an autumnal production of sexual alates, parthenogenetic reproduction of apterous females predominates (Della Beffa 1936; Arzone and Vidano 1984; Blackman and Eastop 1994). This aphid is considered to be the most significant pest of poplar stands throughout southern Europe, North Africa, and the

Near East (Arzone and Vidano 1984; Lapietra and Allegro 1990; Sadeghi et al. 2007). Where there is significant infestation, the aphids colonize whole stems, causing a loss of bark elasticity resulting in cracks, extended cortical necroses, mortality of lower branches, and inhibition of bud break. Severe outbreaks can lead to reduction in tree growth and even massive tree mortality, resulting in significant financial losses (Della Beffa 1936; Arzone and Vidano 1984; Baubet and Carouille 2009). In France, although it has been observed in poplar stands since 1939, the first significant outbreaks were recorded in the mid-1990s in southwestern France (Maugard 1996; Maugard and Baubet 2004). Since then, outbreaks have

Received 6 January 2011. Accepted 16 February 2011. Published at [www.nrcresearchpress.com/cjfr](http://www.nrcresearchpress.com/cjfr) on 24 May 2011.

S. Pointeau, A. Sallé, V. Lesieur, S. Bankhead-Dronnet, M. Bonnaffoux, and F. Lieutier. Université d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, BP 6759, FR-45067, Orléans CEDEX 2, France.

Corresponding author: F. Lieutier (e-mail: [francois.lieutier@univ-orleans.fr](mailto:francois.lieutier@univ-orleans.fr)).

increased in severity and have extended northwards to the central part of France, especially to poplar stands planted with genotypes belonging to the hybrid *Populus × canadensis* Moench, which are the most common genotypes planted in France owing to their optimal cultivation characteristics (Baubet 2007; Baubet and Carouille 2009).

The increasing threat from *P. passerinii* has recently led to the consideration of resistance to this aphid as an additional criterion in the selection of poplar genotypes (Lapietra and Allegro 1990; Département de la santé des forêts (France) 2006). Field observations of aphid outbreaks suggest that tree resistance varies depending on the poplar genotype (Département de la santé des forêts (France) observations). However, these field observations were often limited to the few genotypes that were most commonly planted, and it was difficult to take account of the effect of the site location. Moreover, records were based on visual observations that were hampered by the aphid's preference for the upper parts of the trees. Laboratory and field tests were also carried out in Italy and Iran to assess tree resistance (Lapietra and Allegro 1990; Allegro et al. 1996; Sadeghi et al. 2007). They were performed by artificially infesting unrooted cuttings or young trees (1 to 6 years old) with *P. passerinii* colonies. Resistance was then estimated by measuring the abundance of aphid individuals or colonies. Such methods have the advantage of being able to test a large number of genotypes rapidly and with little expense (Allegro and Cagelli 1996). However, they also suffer from several limitations. Firstly, there was only partial correlation between the results of the laboratory tests and field observations on the occurrence and extent of infestation (Allegro et al. 1996). Secondly, assays were never performed on trees of a size or age similar to those usually colonized under field conditions. In addition, although these studies showed that the poplar genotype affected *P. passerinii* population dynamics, assays performed using cuttings or young trees did not use the same aphid clone and few focused in detail on the insect characteristics that were affected by the host tree.

Plant resistance to insects often involves a combination of three components: tolerance is defined as the ability of an infested plant to survive and reproduce in spite of the pest (Panda and Khush 1995); antixenosis results in low or no acceptance of the plant by the insects owing to the disturbance of the processes involved in host acceptance (Kogan and Ortman 1978); and antibiosis affects the insect populations (Panda and Khush 1995). Two studies provided data on *P. passerinii* survival and preference among poplar genotypes and concluded that both antibiosis and antixenosis could be involved in poplar resistance (Rajabi-Mazhar et al. 2003; Rajabi-Mazhar et al. 2008). Further study of the interactions between *P. passerinii* and its host tree is required to determine the consequences of resistance on the biological characteristics of the aphids and to assess the contribution of each resistance mechanism to the overall expression of poplar resistance. Studies dealing with other aphid-plant systems have demonstrated that a wide array of biological parameters can be affected by the host genotype, e.g., settlement rate, development, fecundity, and survival (Awmack and Leather 2002; Ramírez et al. 2004; Sandanayaka et al. 2005).

This study aimed (i) to determine the life-history traits of the aphids that are affected by host plant resistance to clarify

the mechanisms involved, (ii) to confirm previous observations on inter- and intra-specific variability of poplar resistance to *P. passerinii* and extend these observations to the genotypes cultivated in France, and (iii) to test whether resistance expression is comparable between laboratory observations, rooted cuttings, and older trees in the field. The study was carried out under three experimental conditions using a single aphid clone: (i) a laboratory study with unrooted poplar cuttings; (ii) a greenhouse study with potted cuttings; and (iii) a field study with mature trees. Individual-related and colony-related variables were used to assess aphid performances.

## Materials and methods

### Aphid clone and tree genotypes

Aphids were obtained from a monoclonal laboratory colony, established from wild apterous parthenogenetic insects collected in October 2008 in Reboursin (France), on the *Populus × canadensis* 'Dorskamp' poplar hybrid. This monoclonal colony belonged to the most common haplotype that has so far been identified in France (S. Pointeau, S. Bankhead-Dronnet, and F. Lieutier, unpublished data from analyses of cytochrome oxidase I and II and cytochrome *b* genetic fragments). The colony was maintained under the breeding conditions developed by Arru (1974). Aphids were reared on *P. × canadensis* 'I214' cuttings (25 cm long and 1.5 to 2 cm diameter) under the following controlled conditions: 20 ± 1 °C, 70% ± 10% relative humidity, and 16 h light – 8 h dark regime.

Ten of the genotypes commercially available in France, with various resistance levels according to the literature (Allegro et al. 1996) and field observations (Baubet 2007), were selected for the laboratory study (Table 1). For practical reasons, the number of genotypes tested in the greenhouse experiment had to be reduced to six, which had different resistance levels, according to the literature and field observations (Table 1). For the field experiment, sites with no previously recorded infestations were selected to avoid possible biases linked to pre-infestation. However, few poplar growers agreed to host the experiment for fear of damage and because the experimental setup had not been previously tested. Consequently, the study was conducted in four sites, with only four genotypes. The site locations and stand characteristics are provided in Table 2.

### Laboratory experiment

Poplar cuttings (1.5 to 2 cm diameter) were collected from the experimental Guéméné-Penfao nursery (France) at the end of autumn 2008 and kept at 4 °C until use. The biological parameters of the aphids were assessed on 10 replicates for each of the 10 genotypes tested. One week before the experiment, poplar cuttings were removed from storage, placed in water, trimmed to 20 cm in length, and all but the terminal buds were removed for easy handling. Each cutting was placed in a plastic pot containing water and perlite and maintained under the same controlled conditions as used for raising the monoclonal aphid laboratory colony. Bud break and leaf formation indicated that the cuttings were in a good physiological condition.

For practical reasons, all genotypes could not be tested si-

**Table 1.** Poplar genotypes used in the three experiments.

Genotype	Code	Species	Hybridization	Resistance to <i>P. passerinii</i>	Laboratory study	Greenhouse study	Field study
Brenta	B	<i>P. × canadensis</i>	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>	R*	×	×	×
Dorskamp	D	<i>P. × canadensis</i>	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>	S†	×	×	×
I214	I214	<i>P. × canadensis</i>	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>	S*†	×	×	
I45/51	I45/51	<i>P. × canadensis</i>	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>	S†	×	×	
Koster	K	<i>P. × canadensis</i>	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>	?	×		×
Soligo	S	<i>P. × canadensis</i>	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>	S/R*	×	×	×
Raspalje	R	<i>P. × interamericana</i>	<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. deltoides</i>	?	×		
Alcinde	A	<i>P. deltoides</i>	—	?	×	×	
Vereecken	V	<i>P. nigra</i>	—	?	×		
Trichobel	T	<i>P. trichocarpa</i>	<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. trichocarpa</i>	?	×		

Note: R, resistant; S, susceptible.

\*Allegro et al. 1996.

†Baubet 2007.

**Table 2.** Site locations of the field experiment and characteristics.

Site	Coordinates	Altitude (m)	Stand age (years)	Genotypes	Circumference (cm)	Height (m)
Mareil sur Loir	47°42'37"N 00°00'44"E	31	15	Dorskamp	119.3±6.2	31.7±1.7
Saint Philbert du Peuple	47°23'54"N 00°04'05"E	28	9	Koster	65.7±0.7	19.0±0.6
La Flèche	47°41'45"N 00°03'35"E	30	9	Dorskamp	87.3±4.2	19.7±0.3
				Koster	81.7±2.3	19.0±0.5
				Soligo	50.6±2.8	14.3±0.7
				Brenta	49.3±4.3	12.8±0.4
Parigné l'Evêque	47°56'59"N 00°18'45"E	115	9	Dorskamp	46.7±3.3	10.3±0.8
				Soligo	44.7±2.9	12.3±0.3
				Brenta	35.7±1.5	10.0±0.0

multaneously. Consequently, the experiment was divided into two sets. In the first set of experiments from mid-February to the end of March 2009, 'Brenta', 'Dorskamp', 'I214', 'I45/51', 'Koster', and 'Soligo' genotypes were used, and 'Alcinde', 'Raspalje', 'Trichobel', 'Vereecken', and 'Soligo' were used for the second set of experiments from April to the end of May 2009. 'Soligo' was included in both sets, because of its high settlement rate, to be used for comparison.

### Experimental setup

Two pairs of apterous parthenogenetic females were placed at mid-height on each cutting, each pair under a colourless gelatine capsule (size 000, LGA, La Seyne-sur-Mer) to make it easier to monitor the aphids and their nymphs. After 24 h, first instar nymphs laid by the females were kept and counted, and the females and gelatine capsules were removed. These nymphs were monitored daily until they reached the second instar. If none of the nymphs reached the second instar, new infestations were carried out. When all nymphs had reached the second instar, only one nymph was kept on each cutting and monitored daily under a dissecting microscope. The duration of nymphal development was assessed by checking daily for the occurrence of each instar and their exuviae, until adult moult. The date when adults produced their first offspring was noted and daily fecundity was then monitored.

### Aphid performance parameters

Life-history traits based on individual-related variables commonly used for aphid performance assessment were used (Collins et al. 2001; Ramírez et al. 2004; Sandanayaka et al. 2005). For each genotype, the ratio between the number of nymphs that reached the second instar and the number of nymphs produced by the females was used as the settlement rate. The duration of each nymphal instar, total nymphal development, and prereproductive period (period from birth to the production of the first offspring) were recorded. For each genotype, the survival rate was assessed as the ratio between the nymphs that reached the final moult and the total number of settled second instar nymphs. Fecundity was measured as the total number of offspring produced during a period equivalent to the prereproductive period. The intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) was estimated using the simplified method described by Wyatt and White (1977), which assumed that 95% of the value of  $r_m$  is contributed by the offspring produced in a period equivalent to the prereproductive period. It was calculated using the formula  $r_m = 0.74(\ln Md)/d$ , where  $Md$  is the number of nymphs produced per individual over a period equal to the prereproductive period  $d$ .

### Greenhouse experiment

Poplar cuttings collected in Guémené-Penfao (France) at

the end of autumn 2008 were used. In January 2009, they were removed from storage and trimmed to 20 cm. The basal part was immersed in water for five days and then in liquid Exuberone for 20 min to rehydrate plant tissues, to improve bud break, and to stimulate rhizogenesis. For easy handling, all but the terminal buds were removed. The cuttings were planted in sand for three weeks and then transplanted at three-week intervals into 0.53, 2, 4, and 10 L pots containing compost (Klasmann substrate 4, recipe no. 267). Agglomerated Osmocote was added to each 10 L pot for fertilization. The cuttings were then left to grow for three months until the beginning of the experiment. In mid-April 2009, 12 potted cuttings for each of the six tested genotypes (Table 1) were randomly placed in a greenhouse and watered by an automatic system three times per week.

#### Experimental setup

In May 2009, two parthenogenetic females were placed at mid-height of each cutting and kept under a gelatine capsule as described above. The gelatine capsules and the females were removed after 48 h, leaving a sufficient number of first instar nymphs to assess settlement, fecundity being lower under greenhouse conditions than in laboratory conditions. The nymphs were monitored daily and the number of settled nymphs (nymphs reaching the second instar) was recorded. If none of the nymphs reached the second instar, new infestations were performed. When a nymph reached the adult stage on a cutting, the other nymphs were removed. At this point, because it was difficult to acquire individual-related data on the potted cuttings, colony-related data were used. The colony growth was monitored using the newly moulted female as the starting point for colony development. The female and her colony were monitored for eight weeks from the production of the first offspring. A picture was taken every week on each of two opposite sides of each cutting, always at the same place and same distance from the pot.

#### Aphid performance parameters

The settlement rate was assessed as for the laboratory experiment. The pictures taken during colony development were processed using Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.), and colony areas were estimated using ImageJ 1.40 (National Institutes of Health). For each cutting, the areas estimated using each of the two pictures were summed. A mean colonized area was calculated each week for each genotype.

#### Field experiment

In each field site, three trees per genotype were selected, giving a total of six 'Brenta', six 'Soligo', and nine 'Dorskamp' trees. Trees were selected randomly within the stand, away from the edge.

#### Experimental setup

In mid-June 2009, poplar trunks were infested with aphids, at breast height on the north-facing side of the trunk, using a piece of poplar cutting infested with approximately 10 virginoparous females. The infested area (15 × 15 cm) was surrounded with glue and covered with a fine mesh cloth. If no colony had been observed one month after aphid deposition, a second infestation was performed. Each tree was inspected for the presence of aphids every other week until the end of

October. When aphids were observed, a picture of the area was taken at a constant distance from the trunk.

#### Aphid performance parameters

The infestation success rate was assessed as the number of successfully infested trees compared with the total number of infested trees. The pictures taken during colony development were processed using Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.), and colony areas were estimated using ImageJ 1.40 (National Institutes of Health).

#### Data analysis

Statistical analyses were performed using R 2.7.2 (R Development Core Team 2007). All variables were checked for homoscedasticity (Levene test) and normal distribution (Shapiro–Wilk test). As the variables did not fit a normal distribution even after  $\log(x + 1)$  or  $\arcsin\sqrt{x}$  transformation, all of them were analyzed using nonparametric tests. The settlement rate, total nymphal development time, prereproductive period duration, fecundity,  $r_m$ , and colonized area were assessed using the Kruskal–Wallis test followed, when significant, by pairwise Wilcoxon rank sum tests for multiple comparisons with a Holm correction. Tests were performed only when more than five replicates per parameter and genotype were available. If fewer than five replicates were available for a genotype, it was discarded from the analyses. Comparisons between aphids parameters obtained on 'Soligo' in the two sets of laboratory experiments were performed using the Wilcoxon rank sum test. The differences between genotypes for the survival rate in the laboratory experiment and infestation success rates in the field experiment were assessed using the Fisher's exact test. The significance level,  $\alpha$ , was set at 5% in all statistical analyses. Mean values in the text and tables are given with their standard error.

## Results

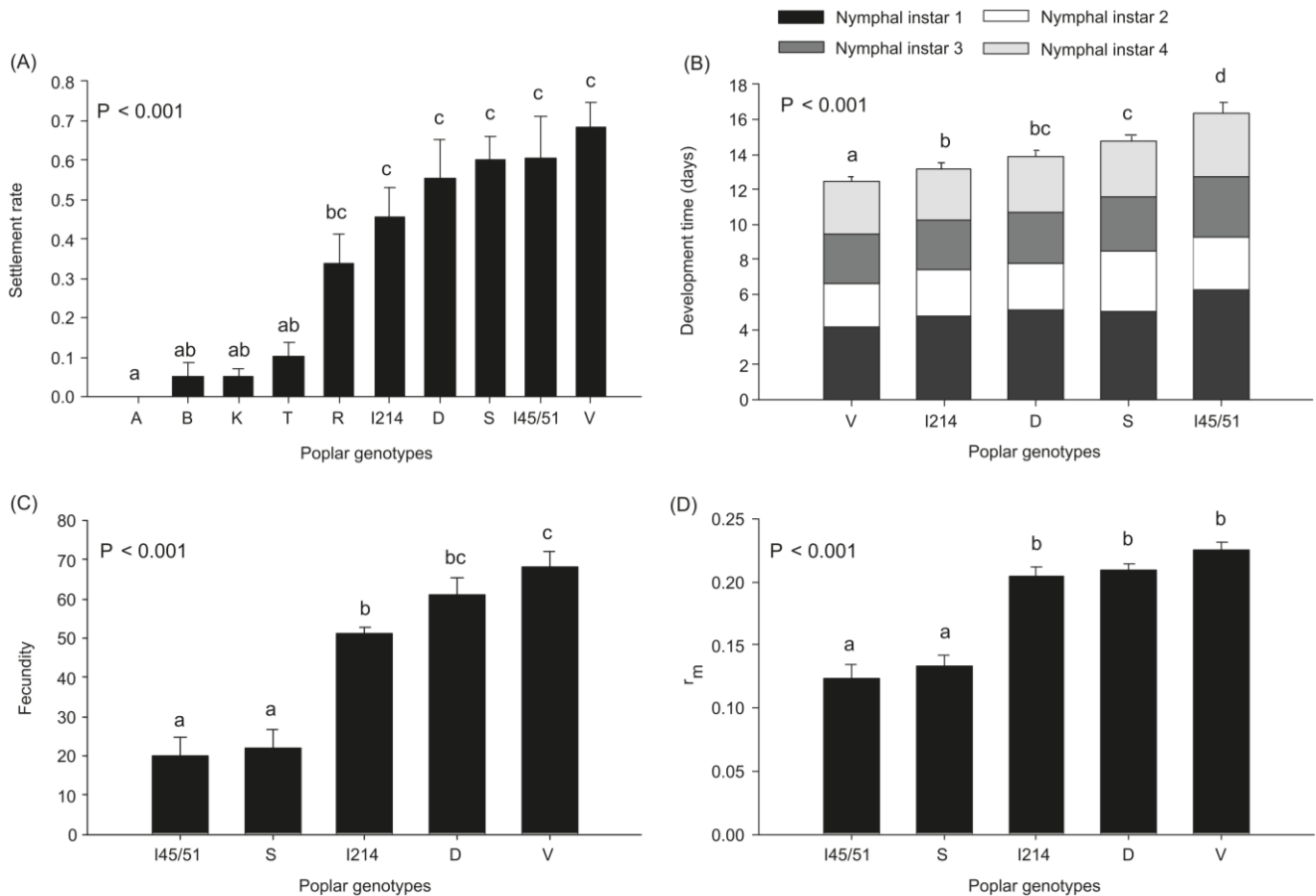
#### Laboratory study

As aphid parameters obtained on 'Soligo' were the same for both sets of the laboratory experiment, the data for the 'Soligo' genotype were pooled and statistical comparisons were performed for all parameters for the genotypes tested in both sets.

The settlement rate varied depending on the poplar genotypes (Fig. 1A). It was lower on genotypes 'Alcinde', 'Brenta', 'Koster', and 'Trichobel' than on genotypes 'I214', 'Dorskamp', 'Soligo', 'I45/51', and 'Vereecken', for which it was four to seven times higher. The genotype 'Raspalje' was intermediate.

The survival rates on 'Vereecken', 'Dorskamp', 'I214', and 'Soligo' genotypes (100%, 100%, 90%, and 90%, respectively) were significantly higher than those on 'Brenta' and 'Koster', on which no aphid survived ( $P < 0.05$  in all cases). This rate was also significantly higher on 'I45/51' (80%) than on the 'Brenta' genotype. The survival rate was significantly lower on both 'Trichobel' and 'Raspalje' genotypes (50% in both cases) compared with 'Vereecken' and 'Dorskamp'. It also differed significantly between 'Soligo' and 'Raspalje' genotypes. Only four nymphs reached the adult stage on 'Raspalje' (in  $13.9 \pm 1.1$  days), three on 'Trichobel' (in  $16.0 \pm 0.6$  days), and no adult survived long enough to esti-

**Fig. 1.** Mean ( $\pm$ SE) values for biological parameters of apterous parthenogenetic *Phloeomyzus passerinii* females on unrooted cuttings of different poplar genotypes under laboratory conditions. See Table 1 for genotype codes. (A) Settlement rate ( $n = 10$  for each genotype); (B) duration of the four nymphal instars and total nymphal development time (V,  $n = 10$ ; I214 and D,  $n = 9$ ; S,  $n = 18$ ; I45/51,  $n = 8$ ); (C) fecundity recorded during a period equivalent to the prereproductive period; and (D) intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) (I45/51,  $n = 8$ ; S,  $n = 16$ ; I214 and D,  $n = 9$ ; V,  $n = 10$ ). Different letters indicate significant differences for settlement rate, total nymphal development, fecundity, and  $r_m$  ( $\alpha = 0.05$ , pairwise Wilcoxon rank sum test).



mate fecundity. It was, therefore, not possible to estimate developmental and fecundity parameters accurately on these genotypes, or on ‘Brenta’ and ‘Koster’.

The poplar genotype affected the duration of all nymphal instars (instar 1,  $H_{4,50} = 20.71$ ,  $P < 0.001$ ; instar 2,  $H_{4,50} = 13.81$ ,  $P = 0.008$ ; instar 3,  $H_{4,50} = 11.05$ ,  $P = 0.026$ ; instar 4,  $H_{4,50} = 17.03$ ,  $P = 0.002$ ) and, consequently, the total nymphal development duration ( $H_{4,50} = 31.35$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 1B). There was a three-day difference in development between the two extremes (i.e., ‘Vereecken’ and ‘I45/51’). The prereproductive period varied significantly between genotypes, as it did for total nymphal development ( $H_{4,49} = 28.50$ ,  $P < 0.001$ ). It ranged from 13.9 days for ‘Vereecken’ to 17.2 days for ‘I45/51’.

Fecundity was also significantly affected by the poplar genotype (Fig. 1C). It was more than twice as low on both ‘I45/51’ and ‘Soligo’ than on the other genotypes. As their development was longer and their fecundity was lower, the aphids that developed on ‘Soligo’ and ‘I45/51’ had a signifi-

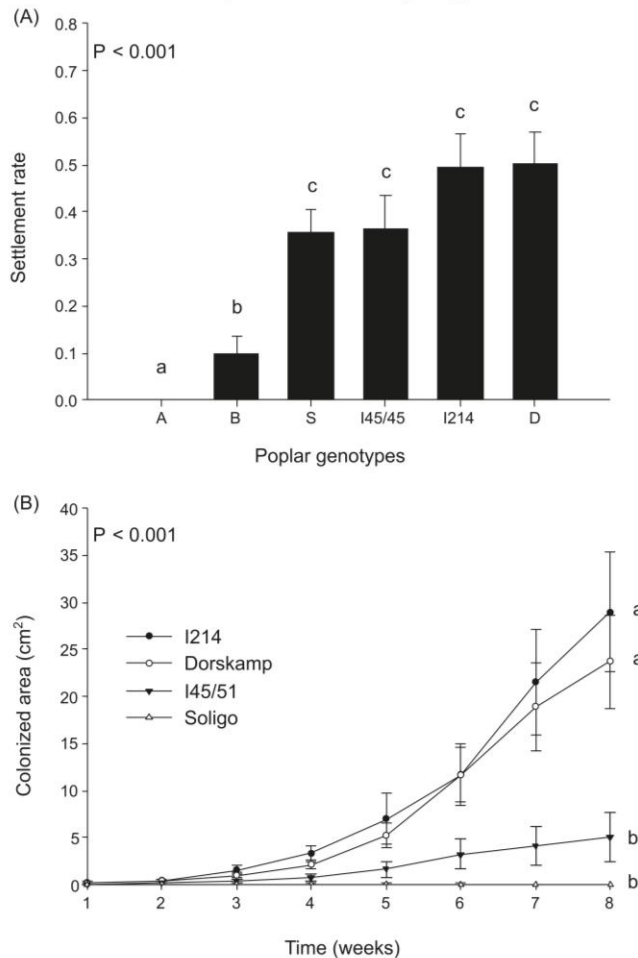
cantly lower intrinsic rate of natural increase  $r_m$  than on the other genotypes (Fig. 1D).

### Greenhouse study

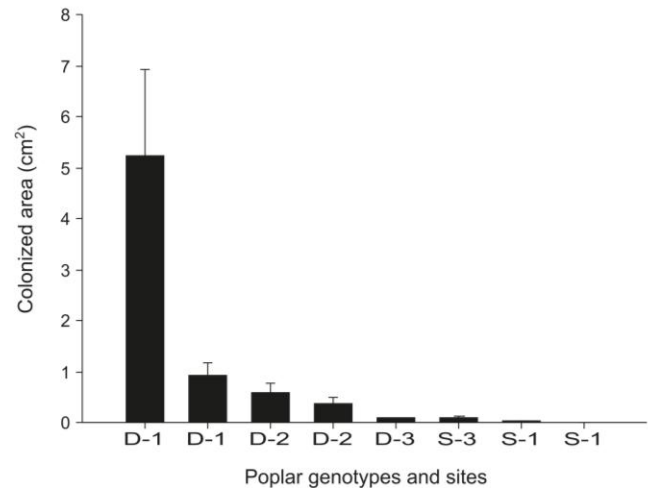
The settlement rate was affected by poplar genotypes (Fig. 2A). No nymph settled on the ‘Alcinde’ genotype, and the settlement rate was significantly lower on ‘Brenta’ than on ‘Soligo’, ‘I45/51’, ‘I214’, and ‘Dorskamp’ genotypes, on which it was three to five times higher.

From the third week until the end of the experiment, the colonized area was significantly affected by the poplar genotype (week 3,  $H_{3,40} = 14.86$ ,  $P < 0.002$ ; week 4,  $H_{3,40} = 18.22$ ,  $P < 0.001$ ; week 5,  $H_{3,40} = 18.54$ ,  $P < 0.001$ ; week 6,  $H_{3,40} = 17.83$ ,  $P < 0.001$ ; week 7,  $H_{3,40} = 19.36$ ,  $P < 0.001$ ; week 8,  $H_{3,40} = 20.91$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2B). Colonies exhibited exponential growth on ‘I214’ and ‘Dorskamp’ genotypes, whereas growth was more linear on ‘I45/51’ and almost zero on ‘Soligo’. No colony developed on the ‘Brenta’ genotype.

**Fig. 2.** (A) Mean ( $\pm$ SE) settlement rate of apterous parthenogenetic *Phloeomyzus passerinii* females on potted cuttings of six poplar genotypes under greenhouse conditions. (B) Evolution of the mean ( $\pm$ SE) colonized areas by apterous parthenogenetic *Phloeomyzus passerinii* populations on potted cuttings of four poplar genotypes. Different letters indicate significant differences ( $\alpha = 0.05$ , pairwise Wilcoxon rank sum test). See Table 1 for genotype codes.



**Fig. 3.** Mean ( $\pm$  SE) bark areas colonized by apterous parthenogenetic *Phloeomyzus passerinii* populations from June to October 2009 on trees belonging to two poplar genotypes ('Dorskamp' (D) and 'Soligo' (S)) on three experimental sites: La Flèche (1), Mareil sur Loir (2), and Parigné l'Évêque (3).



## Discussion

Poplar genotypes affected various aphid performance parameters, suggesting that resistance acted through various mechanisms during settlement, development, and multiplication. In both laboratory and greenhouse experiments, aphids exhibited a relatively high settlement rate on certain genotypes (i.e., 'I214', 'Dorskamp', 'Soligo', 'I45/51', and 'Vercecken'), whereas it was significantly lower or zero on others (i.e., 'Alcinde', 'Brenta', 'Koster', and 'Trichobel'). The same pattern was found in the field experiment, with a zero infestation success rate on both 'Brenta' and 'Koster' genotypes. Such a low settlement rate suggests that antixenosis and (or) strong antibiosis could be involved in host resistance to this aphid. Sauge et al. (1998a, 1998b) obtained similar patterns when rearing *Myzus persicae* on resistant *Prunus* genotypes and attributed the resistance to a strong antixenotic property, which was corroborated by a very low nymphal mortality rate and, based on electrical penetration graphs, a failure by the aphids to recognize these genotypes as hosts. Here, the zero settlement rate recorded on 'Alcinde' under both laboratory and greenhouse conditions could also indicate strong antixenosis, but both the low survival and settlement rates observed on 'Brenta', 'Koster', 'Trichobel', and, to a lesser extent, 'Raspalje' genotypes suggest a strong antibiogenic effect. Indeed, antibiosis might cause early instars to die after settlement owing to a strong substrate toxicity or nutritional unsuitability (Panda and Khush 1995). Both antibiosis and antixenosis might be involved during the settlement of *P. passerinii*, depending on poplar genotypes. Using preference assays, Rajabi-Mazhar et al. (2003) concluded that antixenosis could affect *P. passerinii* settlement on some poplar genotypes. However, their conclusions relied on preferences among poplar genotypes that could also result from an enhanced attractiveness of some genotypes.

Among the genotypes on which *P. passerinii* could settle, 'Soligo' and 'I45/51' had a negative impact on both the development and reproduction of the aphids. Despite a rela-

## Field study

In the field experiment, eight trees out of 27 were successfully infested, five after the first aphid deposition (four 'Dorskamp' and one 'Soligo') and three others after the second aphid deposition (one 'Dorskamp' and two 'Soligo'). No successful infestation was observed on 'Brenta' and 'Koster' trees. With an infestation success rate of 0.55, the genotype 'Dorskamp' differed from 'Brenta' and 'Koster' genotypes ( $P = 0.044$  in both cases) but not from 'Soligo' (infestation success rate = 0.50). The infestation success rate did not differ significantly for 'Soligo', 'Brenta', and 'Koster' genotypes. No aphids were found outside the monitoring area.

Given the limited number of replicates and because trees were not inoculated at the same time, it was not possible to perform statistical analyses for the colonized areas. Nonetheless, Fig. 3 suggests that the mean colonized area during the infestation period tended to be higher on 'Dorskamp' ( $1.44 \pm 0.96$  cm<sup>2</sup>) than on 'Soligo' ( $0.05 \pm 0.03$  cm<sup>2</sup>) trees.

tively high settlement rate of first instar nymphs, aphids reared on these genotypes under laboratory conditions exhibited slow development, a prolonged prereproductive period, reduced fecundity, and, as a consequence, a much lower  $r_m$  when compared with aphids reared on the 'Vereecken', 'Dorskamp', and 'I214' genotypes. In the greenhouse study, the colonies developing on 'Soligo' and 'I45/51' potted cuttings also exhibited a weak, linear growth, whereas growth was much stronger on both 'Dorskamp' and 'I214', visible after only three weeks of colony establishment. Under field conditions, colonies also tended to be larger on 'Dorskamp' than on 'Soligo' trees. This lengthening of the nymphal period associated with a reduction in reproductive performance is generally ascribed to antibiosis (Panda and Khush 1995; Sauge et al. 1998a; Sandanayaka et al. 2005), resulting from a nutrient deficiency and (or) toxic metabolites in host tissues (Awmack and Leather 2002; Philippe and Bohlmann 2007). However, as we performed "no-choice" experiments, the poor performances of *P. passerinii* on these two genotypes might also indicate strong antixenosis owing to the presence of secondary compounds acting as feeding inhibitors leading to insect starvation (Panda and Khush 1995). The occurrence of feeding inhibitors would have affected the settlement rate (Sauge et al. 1998a, 1998b). Because the settlement rate was the same on both 'Soligo' and 'I45/51' compared with 'Vereecken', 'Dorskamp', and 'I214' genotypes, on which aphids performed better, the hypothesis of an antibiotic effect seems more plausible. Further experiments would be required to determine the type of antibiotic (i.e., poor nutritional quality or toxic effect of the host plant) and (or) antixenotic properties that are involved.

Resistance to *P. passerinii* varied among poplar species and hybrids. This confirms the previous field and laboratory observations reported in Italy and Iran (Lapietra and Allegro 1990; Allegro et al. 1996; Sadeghi et al. 2007). These results indicate that the performance of *P. passerinii* is optimal on *P. nigra* ('Vereecken' genotype) and that aphid settlement was impaired on *P. deltoides* ('Alcinde' genotype), *P. trichocarpa* ('Trichobel' genotype), and *P. × interamericana* ('Raspalje' genotype). These differences agree with previous studies indicating that, in general, *P. deltoides* genotypes exhibit a high resistance towards *P. passerinii*, whereas *P. nigra* genotypes are generally susceptible (Allegro et al. 1996; Allegro and Cagelli 1996; Sadeghi et al. 2007). Under laboratory, greenhouse, and field conditions, aphid settlement and multiplication capacities varied between *P. × canadensis* hybrid genotypes. The good performances observed on both 'I214' and 'Dorskamp' genotypes agreed with previous laboratory studies and field observations (Allegro et al. 1996; Lapietra and Allegro 1990; Baubet 2007). Similarly, the low settlement rate observed on 'Brenta' confirms previous reports of its high resistance (Allegro et al. 1996). Although 'Soligo' was previously considered as a susceptible genotype under laboratory conditions (Allegro et al. 1996), this study shows that both development and fecundity were impaired on this genotype. It is the first report on the resistance to *P. passerinii* of 'Koster', a genotype commonly planted in France.

This study was the first attempt to use a single aphid clone to confirm that laboratory tests on resistance to aphids were comparable with tests in field conditions. Allegro et al.

(1996) stated that a classification obtained using a lab-based resistance index was sometimes contradicted by field observations. For example, they considered the 'Soligo' genotype to be resistant according to field observations, whereas it was ranked as susceptible under laboratory conditions. However, the effects on aphid settlement, development, and fecundity should be considered to prevent wrongly classifying genotypes as susceptible or resistant. During their laboratory assays, Allegro et al. (1996) estimated resistance just one month after infestation, when the effects preventing insect settlement were easily observed but effects on insect development and fecundity were not clearly detectable. This is in line with the greenhouse study showing that differences in colony area between genotypes were significant only after several weeks of colony growth. To predict poplar resistance to *P. passerinii*, it is therefore advisable to take account of both the settlement and the multiplication capacities of the aphids.

In this study, although the limited number of genotypes and replicates did not allow rigorous estimation of aphid performances in the field, the trends observed under these conditions corroborated previous field observations (Allegro et al. 1996; Baubet 2007; Baubet and Carouille 2009), and these trends were in line with the results obtained with either unrooted or potted cuttings. The low settlement rates observed for genotypes 'Alcinde', 'Brenta', and 'Koster' were confirmed both by the greenhouse results for 'Alcinde' and 'Brenta' and under field conditions for 'Brenta' and 'Koster'. Similarly, the lowest aphid reproductive performances were consistently observed under laboratory, greenhouse, and field conditions for 'I45/51' and 'Soligo'. Observations of resistance expression under laboratory conditions were comparable with those on both potted cuttings and mature trees. Changing the experimental conditions introduced uncontrolled environmental factors (e.g., temperature and humidity) and variations in host physiology between unrooted cuttings and trees, but apparently did not modify the nature of the insect response towards the host tree resistance mechanisms. Laboratory studies can thus provide useful information for identifying host-related parameters involved in resistance.

There are some reservations about the resistance estimation in our study. Maternal experience (i.e., the host on which the aphid's parents have been reared) may have buffered the effects of host quality on offspring fitness, at least during the first offspring generation (Collins et al. 2001; Awmack and Leather 2002). In this experiment, aphids were reared for several generations on the 'I214' genotype prior to the experiment assessing aphid performances during only one generation on other poplar genotypes. This may have altered the interactions between the aphid and the assayed genotypes. However, as these results agree with previous field observations, maternal experience probably did not exert a strong influence. In the assessment of resistance and ranking of poplar genotypes, although results from lab-based experiments agreed with results from field observations, they should be regarded with caution because several issues still need to be clarified. Firstly, it should be investigated whether resistance rankings stay the same regardless of the aphid clone considered. Aggressiveness may vary among clones within aphid species (Bournoville et al. 2000; Jyoti and Michaud 2005). This study was conducted with aphids belonging to the most common haplotype in France, but a preliminary population

genetic study indicates that several haplotypes may be encountered in France and elsewhere in Europe (S. Pointeau, S. Bankhead-Dronnet, and F. Lieutier, unpublished data). Secondly, site conditions may also modify aphid performances. Field observations suggest that aphid damage is more severe on well-watered, fertile sites (O. Baubet, Département de la santé des forêts (France), personal communication, 2009). To address this issue, the field experimental setup presented here would be useful, as it allows the aphid's settlement and performance to be studied without damaging a whole stand.

In conclusion, this study showed that several biological parameters of *P. passerinii* were affected by poplar genotypes, highlighting the antibiotic and antixenotic properties of certain poplar genotypes. Further investigations are necessary to determine what kind of antixenotic and (or) antibiotic processes are involved in poplar resistance (low nutritional quality of the host plant and (or) secondary metabolites). The involvement of several mechanisms in poplar resistance to *P. passerinii* is encouraging in the context of a breeding programme, as already mentioned for *Prunus* resistance to *Myzus persicae* (Sauge et al. 1998b). The similarity in the results from the three experiments indicates that controlled laboratory studies could provide information for future identification of tree resistance related parameters useful for further breeding purposes. Finally, the field experimental setup proved to be reliable in assessing poplar resistance to *P. passerinii* under field conditions and could be adapted to assess the impact of environmental factors on insect population dynamics.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the French Ministry of Agriculture, Food and Fisheries (MAAP) and the Regional Direction for Food, Agriculture and Forestry (DRAAF) of the Pays de la Loire Region (France). We thank three anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions on the manuscript and Gianni Allegro for fruitful discussions on *P. passerinii* biology. We are grateful to Alain Guichard, Xavier Pineau, and Elodie Deprost for their technical support. The Regional Centre of Forest Property (CRPF) of the Pays de la Loire Region also helped to set up the field experiments and M. Pelletier, G. Courant, A. de Montgascon, and J.-M. Lacarelle provided the poplar stands. Finally, we thank the Forest Health Department (Département de la santé des forêts (France)) for sharing its field observations.

### References

- Allegro, G., and Cagelli, L. 1996. Susceptibility of *Populus nigra* L. to the woolly poplar aphid (*Phloeomyzus passerinii* Sign.). *For. Genet.* **3**(1): 23–26.
- Allegro, G., Picco, F., and Bianco, B. 1996. Resistance behavior to *Phloeomyzus passerinii* of some recently selected Italian poplar clones. *In* Proceedings of the 20th Session of the International Poplar Commission, Part 1, Budapest, Hungary, 1–4 October 1996. Paper no. FO:CIP:1/96/2. pp. 199–208.
- Aparisi, C. 1971. Noticia sobre el afido lanigero del chopo *Phloeomyzus passerinii* Signoret, y ensayos para su tratamiento. *Plagas Forestales*, **14**: 3–11. [In Spanish.]
- Arru, G.M. 1974. Metodo per valutare la resistenza dei pioppi all'Afide lanigero (*Phloeomyzus passerinii* Sign.). *Cellulosa e Carta*, **25**(5): 45–49. [In Italian.]
- Arzone, A., and Vidano, C. 1984. Indagini su *Phloeomyzus passerinii* (Sign.) in Piemonte. *Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Torino*, **13**: 337–356. [In Italian.]
- Awmack, C.S., and Leather, S.R. 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annu. Rev. Entomol.* **47**(1): 817–844. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145300. PMID: 11729092.
- Baubet, O. 2007. Le puceron lanigère étend son aire de répartition. Bilan de la santé des forêts en 2006, Département de la santé des forêts (France). pp. 1–2.
- Baubet, O., and Carouille, F. 2009. Peupleraie française: entre rouille et puceron lanigère, l'inquiétude demeure. Bilan de la santé des forêts en 2008, Département de la santé des forêts (France). pp. 1–7.
- Blackman, R.L., and Eastop, V.F. 1994. The Aphids. *In* Aphids on the world's trees: an identification and information guide. CAB International in association with The Natural History Museum, London, UK. pp. 538–925.
- Bournoville, R., Simon, J.-C., Badenhauer, I., Girousse, C., Guilloux, T., and André, S. 2000. Clones of pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae), distinguished using genetic markers, differ in their damaging effect on a resistant alfalfa cultivar. *Bull. Entomol. Res.* **90**(1): 33–39. doi:10.1017/S0007485300000687. PMID:10948361.
- Collins, C.M., Fellowes, M.D.E., Sage, R.B., and Leather, S.R. 2001. Host selection and performance of the giant willow aphid, *Tuberolachnus salignus* Gmelin — implications for pest management. *Agr. For. Entomol.* **3**: 183–189.
- Della Beffa, G. 1936. Contributo alla conoscenza degli insetti parassiti dei pioppi. II *Phloeomyzus passerinii* Sign. (Afide lanigero dei pioppi). *Boll. Lab. Sper. Oss. Fitopatol.* **13**: 17–23. [In Italian.]
- Département de la santé des forêts (France). 2006. Puceron lanigère du peuplier. Information santé des forêts, Département de la santé des forêts (France). pp. 1–3.
- Jyoti, J.L., and Michaud, J.P. 2005. Comparative biology of a novel strain of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on three wheat cultivars. *J. Econ. Entomol.* **98**(3): 1032–1039. doi:10.1603/0022-0493-98.3.1032. PMID:16022336.
- Kogan, M., and Ortman, E.F. 1978. Antixenosis — a new term proposed to define Painter's "nonpreference" modality of resistance. *Bull. Entomol. Soc. Am.* **24**(2): 175–176.
- Lapietra, G., and Allegro, G. 1990. Suscettibilità a *Phloeomyzus passerinii* Sign. dei cloni di pioppo coltivati in Italia. *Inf. Fitopatol.* **40**: 41–44. [In Italian.]
- Maugard, D. 1996. Attaque d'un ravageur inhabituel dans le Sud-ouest de la France: le puceron lanigère du peuplier. *Les cahiers du Département de la santé des forêts (France)*, n° 1, 1996. pp. 19–20
- Maugard, D., and Baubet, O. 2004. Le puceron lanigère du peuplier accentue sa présence dans le Sud-Ouest et étend sa zone d'épidémie vers le Nord. Bilan de la santé des forêts en 2003, Département de la santé des forêts (France). pp. 1–4.
- Panda, N., and Khush, G.S. 1995. Mechanisms of resistance. *In* Host plant resistance to insects. CAB International, Wallingford, UK. pp. 151–206.
- Philippe, R.N., and Bohlmann, J. 2007. Poplar defence against insects herbivores. *Can. J. Bot.* **85**(12): 1111–1126. doi:10.1139/B07-109.
- R Development Core Team. 2007. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available from <http://www.R-project.org>.
- Rajabi-Mazhar, N., Moharrampour, S., and Sadeghi, S.E. 2003. Antixenosis resistance to woolly aphid *Phloeomyzus passerinii* Sign. (Hom.: Aphididae) in different poplar clones. *J. Entomol. Soc. Iran*, **22**(2): 31–44. [In Persian with English summary.]

- Rajabi-Mazhar, N., Moharramipour, S., and Sadeghi, S.E. 2008. Comparative life history of woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, on various poplar clones. Iran. J. For. Range Prot. Res. **6**(1): 62–73. [In Persian with English summary.]
- Ramírez, C.C., Zamudio, F., Verdugo, J.V., and Nuñez, M.E. 2004. Differential susceptibility of poplar hybrids to the aphid *Chaitophorus leucomelas* (Homoptera: Aphididae). J. Econ. Entomol. **97**(6): 1965–1971. doi:10.1603/0022-0493-97.6.1965. PMID:15666751.
- Sadeghi, S.E., Rajabi-Mazhar, N.A., and Moharramipour, S. 2007. A study on the incidence of woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Hom.: Aphididae), on poplar species and clones in Hamedan Province, Iran. J. Entomol. Soc. Iran, **26**(2): 47–59.
- Sandanayaka, W.R.M., Bus, V.G.M., and Connolly, P. 2005. Mechanisms of woolly aphid [*Eriosoma lanigerum* (Hausm.)] resistance in apple. J. Appl. Entomol. **129**(9–10): 534–541. doi:10.1111/j.1439-0418.2005.01004.x.
- Sauge, M.-H., Kervella, J., and Pascal, T. 1998a. Settling behaviour and reproductive potential of the green peach aphid *Myzus persicae* on peach varieties and a related wild *Prunus*. Entomol. Exp. Appl. **89**(3): 233–242. doi:10.1046/j.1570-7458.1998.00404.x.
- Sauge, M.-H., Kervella, J., and Rahbé, Y. 1998b. Probing behaviour of the green peach aphid *Myzus persicae* on resistant *Prunus* genotypes. Entomol. Exp. Appl. **89**(3): 223–232. doi:10.1046/j.1570-7458.1998.00403.x.
- Wyatt, I.J., and White, P.F. 1977. Simple estimation of intrinsic rate of natural increase rates for aphids and tetranychid mites. J. Appl. Ecol. **14**(3): 757–766. doi:10.2307/2402807.

### 3. CARACTERISATION DE L'ANTIBIOSE ET DE L'ANTIXENOSE

#### ❖ Présentation de l'article n°3 et principaux résultats

Dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence une résistance vis-à-vis de *P. passerinii* pour certains génotypes de *Populus × canadensis* Moench qui résultait soit d'un faible taux d'installation du puceron soit d'une réduction importante des performances démographiques de l'insecte. Si ces résultats suggèrent l'implication de mécanismes de résistance différents, ils ne permettent pas de déterminer précisément le (ou les) type(s) de résistance impliqué(s) et d'identifier les tissus de l'écorce contenant les facteurs de la résistance. Il était donc nécessaire de réaliser une étude supplémentaire pour compléter ces informations.

La méthode d'électropénétrographie (EPG) que nous avons décrite dans le chapitre précédent permet de corréler des ondes EPG à la localisation et à l'activité précise des stylets dans les tissus végétaux (Tjallingii 1978, 1988 ; Tjallingii & Hogen Esch 1993). Par conséquent, elle peut être utilisée pour identifier les tissus végétaux concernés par la résistance. En comparant, chez des génotypes résistants et sensibles, les paramètres démographiques et les paramètres EPG spécifiques du comportement alimentaire du puceron, il est notamment possible de déterminer si l'altération des performances de l'insecte sur un génotype résistant est liée à l'impact de facteurs de résistance sur la reconnaissance ou les préférences de l'insecte (antixénose) ou sur ses paramètres démographiques sans altération de son comportement (antibiose).

Nous avons choisi trois génotypes de niveau de sensibilité connu d'après l'étude précédente : deux génotypes résistants 'Brenta' et 'I45/51' et un sensible 'I214'. Puis, par une analyse combinée du comportement alimentaire (réalisée au cours d'un second séjour au Laboratoire de biologie des entomophages de l'Université de Picardie Jules Verne) et de la physiologie du puceron sur ces génotypes, nous avons caractérisé le (ou les) type (s) de résistance impliqué(s) et les tissus végétaux concernés. Comme attendu suite à l'étude précédente, les deux génotypes 'Brenta' et 'I45/51' agissent sur l'insecte de manière complètement opposée. Chez le génotype 'Brenta', une antixénose se manifeste dans le parenchyme cortical. De manière intéressante, une antibiose se manifeste également. Cette antibiose pourrait être liée à une antixénose si forte qu'elle conduit à une famine des larves et à leur mort ou à une réaction hypersensible du génotype. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si la résistance de ce génotype résulte d'une difficulté à accepter l'hôte ou à contourner une réaction hypersensible de l'hôte. Chez le génotype 'I45/51' en revanche, c'est un phénomène d'antibiose qui intervient, probablement basée sur une déficience en éléments nutritionnels ou sur la présence d'inhibiteurs de digestion.

ARTICLE N°3

Characterization of antibiosis and antixenosis to the woolly poplar aphid (Hemiptera: Aphididae) in different poplar genotypes

Pointeau S, Ameline A, Sallé A, Bankhead-Dronnet S & Lieutier F

*Prochainement soumis pour publication*

## Résumé

Le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Hemiptera : Aphididae) est un ravageur majeur des peupleraies de la zone méditerranéenne et du Moyen-Orient, ainsi que d'une grande partie de celles de la France. Il se développe sur les troncs où il s'alimente au niveau du parenchyme cortical. En dépit de son importance économique, il existe peu d'information sur les mécanismes impliqués dans la résistance du peuplier vis-à-vis de ce ravageur. Dans cette étude, nous avons examiné la réponse du puceron à la résistance du peuplier en combinant une étude physiologique et une étude comportementale (électropénétrographie). Les performances et le comportement de pénétration de *P. passerinii* ont été évalués sur trois génotypes *Populus x canadensis* : un sensible, 'I214', un résistant, 'Brenta' et un intermédiaire 'I45/51'. Pour 'I45/51' et 'Brenta', les facteurs de la résistance sont localisés dans le parenchyme cortical. Sur 'Brenta', le taux de survie larvaire était affecté et le comportement alimentaire de *P. passerinii* était modifié, suggérant une antixénose localisée dans le parenchyme et combinée à des caractéristiques antibiotiques. Les paramètres démographiques étant altérés et la phase intracellulaire soutenue étant prolongée, le type de résistance impliqué pour le génotype 'I45/51' est supposé être une antibiose. Les types de résistance sont discutés en relation avec les mécanismes de résistance probablement impliqués et leur utilisation potentielle pour le contrôle de *P. passerinii*. Cette étude est le premier essai qui vise à caractériser les mécanismes de résistance vis-à-vis d'un puceron Aphididae se nourrissant dans le parenchyme cortical.

## Characterization of antibiosis and antixenosis to the woolly poplar aphid (Hemiptera: Aphididae) in different poplar genotypes

Sophie Pointeau<sup>1</sup>, Arnaud Ameline<sup>2</sup>, Aurélien Sallé<sup>1</sup>, Stéphanie Bankhead-Dronnet<sup>1</sup> & François Lieutier<sup>1</sup>

1 UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres, BP 6759, FR-45067 Orléans Cedex, France.

2 Unité de Recherche EA 4698, EDYSAN, Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés, Laboratoire de Bio-Ecologie des Insectes Phytophages et Entomophages, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, FR-80039 Amiens Cedex, France.

### Abstract

The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Hemiptera: Aphididae), is a major pest of poplar plantations in the Mediterranean and the Near East areas, as well as in France. It lives on trunks and targets the cortical parenchyma as feeding site. Despite its economical importance, little is known about the mechanisms involved in poplar resistance towards this pest. In this study, we investigate the aphid response to poplar resistance by combining physiological and behavioral (electrical penetration graph) studies. The performances and probing behavior of *P. passerinii* were assessed on three *Populus x canadensis* Moench genotypes: one susceptible 'I214', one resistant 'Brenta' and one intermediate 'I45/51'. For the 'I45/51' and 'Brenta' genotypes, resistance factors were located in the cortical parenchyma. On 'Brenta', nymphal survival was affected and the probing behavior of *P. passerinii* was modified, suggesting a parenchyma-located antixenosis, combined with antibiosis properties. Because demographic parameters were altered and the sustained intracellular phase was significantly enhanced, the type of resistance involved in 'I45/51' was supposed to be antibiosis. These types of resistance were discussed in relation to the possible mechanisms involved and their potential use for *P. passerinii* control. This study is the first attempt to characterize resistance mechanisms against a true parenchyma feeding Aphididae.

**Keywords** *Phloeomyzus passerinii* · *Populus x canadensis* · tree resistance · bark · parenchyma feeder · Electrical penetration graph

## Introduction

Host plant selection in aphids is a succession of behavioral sequences conditioned by chemical, physical (tactile) and nutritional information (Powell et al. 2006). Aphids select their puncture site by performing a first assessment of host plant suitability. They scan the plant surface to perceive physicochemical cues using the tip of their proboscis and their antennae carrying respectively mechano- and chemo-receptors (Niemeyer 1990; Powell et al. 2006). After insertion of their stylets within plant tissue, they use gustatory receptors located at the tip of the food canal to discriminate host and non-host plants on the basis of intracellular primary and secondary metabolites (Wensler and Filshie 1969; Powell et al. 2006). The first brief intracellular puncture in epidermis cell is generally sufficient to decide on rejection of a non-host plant (Powell 1991; Tjallingii and Hogen Esch 1993). When plant is recognized as host, stylets are inserted deeper (Powell et al. 2006). The feeding site is localized thanks to intracellular punctures initiated along the stylet pathway, which inform the insect on the nutritional quality of the tissue encountered (Tjallingii and Hogen Esch 1993). In phloem sap feeding aphids, these intracellular punctures are brief and numerous (Tjallingii and Hogen Esch 1993), while they are less frequent in other Hemiptera (Calatayud et al. 1994; Janssen et al. 1989). The ultimate step of host plant acceptance is a sustained ingestion phase in the targeted feeding site (Prado and Tjallingii 1994). At each step of stylet penetration, plant resistance factors encountered by aphids may affect host plant colonization processes.

Resistance factors can affect host plant colonization in two ways. Antixenosis is a type of resistance in which aphid probing behavior is deterred or altered by resistance mechanisms leading to a delayed acceptance and ultimately the rejection of the host plant. Aphids' performance reduction due to alteration of demographic parameters without behavioral modifications highlights antibiosis (Kogan and Ortman 1978; Panda and Khush 1995). Antibiosis has traditionally a chemical origin while physicochemical characteristics that disturb the way to the feeding site are involved in antixenosis (Panda and Khush 1995; van Emden 2007). When toxic secondary metabolites are detected by aphids, they may act as deterrent compounds contributing in antixenosis (van Emden 2007). Antibiosis can result either from toxic or antidigestive effects of secondary metabolites or from the unsuitable composition in primary metabolites of the host plant (Panda and Khush 1995; van Emden 2007). Because of their economical impact, host plant resistance against aphids has been mostly studied in crop pest species (van Helden and Tjallingii 1993; Cole 1994; Caillaud et al. 1995; Le Roux et al. 2008). Tree-dwelling aphids are considered to cause less damage because they induce only tree growth reduction and rarely transmit phytovirus (Blackman and Eastop 1994). However, when aphids live on woody tissue, they may induce injuries to stems and cause tree mortality (Miles 1989). Such tree-dwelling aphids are often parenchyma feeders or gall inducers (Pollard 1973; Miles 1989) and the type of tree resistance involved against such aphids is poorly known.

To determine the type of resistance involved in plant defense against aphids and the tissues involved, several experiments have to be combined. The electrical penetration graph (EPG) generates waveforms correlated with both stylet activities and stylet tip position into plant tissue (Tjallingii 1978, 1988), and allows the description of probing behavior of aphids or other Hemiptera (Tjallingii 2000). Comparative analyses of some EPG parameters when insects probe on susceptible and resistant plant genotypes can be used as a tool to obtain information on the types of resistance involved (van Helden and Tjallingii 1993, 2000). Disturbance of specific EPG parameters allows detecting antixenosis and its location in host plant tissue. On the contrary, antibiotic properties are highlighted when host plant resistance may be quantified thanks to the reduction of aphid performance (e.g. survival, fecundity or increased developmental rate), while aphids' probing behavior is not affected. EPG parameters have been well characterized in phloem sap feeding aphids (Tjallingii 1978, 1988; Prado and Tjallingii 1994) but few EPG studies have characterized the probing behavior of aphids exhibiting distinct feeding diet (Sandanayaka and Hale 2003; Cardoso 2007; Kingston and Powell 2007). This is a curb to the development of knowledge about tree resistance against aphid feeding on woody tree tissues.

The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Aphididae: Phloeomyzinae), is a monoecious species that lives on the trunk of young or mature poplars (Arzone and Vidano 1984; Blackman and Eastop 1994), where its stylets follow an extracellular and intracellular pathway to reach its feeding site in the cortical parenchyma tissue (Pointeau et al. unpubl. data). Firstly described in France (Signoret 1875), this species is native from the Palaearctic area (Blackman and Eastop 1994). In case of heavy infestations in poplar stands, colonies develop on the whole trunk, leading to damage ranging from reduction in tree growth to massive tree mortality (Lapietra and Allegro 1990; Sadeghi et al. 2007). Previous observations pointed out that resistance to this aphid varied among poplar species and genotypes (Lapietra and Allegro 1990; Allegro and Cagelli 1996; Allegro et al. 1996; Sadeghi et al. 2007; Pointeau et al. 2011). In resistant genotypes, either nymphal settlement or development and fecundity were affected, suggesting that resistance acts through various mechanisms involving antibiotic and/or antixenotic properties (Pointeau et al. 2011). The probing behavior of *P. passerinii* has been recently characterized, opening new perspectives for studying poplar resistance mechanisms against this emerging aphid pest (Pointeau et al. unpubl. data).

The present study investigates both the type and location of resistance in three poplar genotypes *Populus x canadensis* Moench exhibiting a contrasted susceptibility to *P. passerinii*: 'Brenta' genotype is resistant, 'I214' genotype which is susceptible, whereas 'I45/51' genotype is intermediate (Pointeau et al. 2011). Using the same aphid clone, EPG and demographic parameters of *P. passerinii* were assessed and combined to infer the possible mechanisms involved in poplar resistance against such a cortical parenchyma feeding aphid.

## Materials and Methods

### *Aphids and plant material*

The three tested poplar genotypes ('Brenta', 'I214' and 'I45/51') were provided by the experimental Guémené-Penfao nursery (France). Stem-cuttings (1.5 to 2 cm diameter) (one-year poplar stump sprouts cut from mature trees) with winter buds were collected at the end of autumn 2008 and kept at 2°C in dry condition until use.

Aphids were obtained from a monoclonal laboratory colony, established from wild apterous parthenogenetic insects collected in October 2008 in Reboursin (Region Centre, France), on the *Populus x canadensis* cv. 'Dorskamp' poplar hybrid. This colony belonged to the most common haplotype that has so far been identified in France (Pointeau S., unpublished data from analyses of Cytochrome oxidase I and II, and Cytochrome *b* genetic fragments). The colony was maintained under the breeding conditions developed by Arru (1974). Aphids were reared on *P. x canadensis* cv. 'I214' stem-cuttings (25 cm long and 1.5 to 2 cm diameter), under the following controlled conditions:  $20 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10$  % RH and 16L: 8D photoperiod. Laboratory colony was transferred every 15 days on new poplar stem-cuttings.

### *Aphid performances*

One week before the experiment, poplar stem-cuttings were removed from storage, trimmed to 20 cm in length and placed in water. For easy use in experiments, all buds except the terminal one were removed. Each stem-cutting was placed in a plastic pot containing water and perlite, and maintained under the same controlled conditions as used for the aphid laboratory rearing. Bud break and leaf formation indicated that the stem-cuttings were in a good physiological condition.

Pools of even-aged first instar nymphs were placed on each stem-cutting, as in Pointeau et al. (2011) and nymphs were monitored daily until they reached the second instar. New infestations were carried out if none of the nymphs reached the second instar. Then, only one nymph was kept on each stem-cutting and monitored under a dissecting microscope. Nymphal development duration was assessed by checking daily for the occurrence of each instar and their exuviae, until adult molting. The date of production of the first offspring was noted for each female and daily fecundity was then monitored. Biological parameters were assessed on 22 replicates of each of the three genotypes.

For each genotype, the ratio between the number of nymphs that reached the second instar and the number of nymphs produced by the females was used as the settlement rate. Demographic parameters such as nymphal survival rate (ratio between the nymphs that reached the final molt and the total number of settled second instar nymphs), duration of the pre-reproductive period (from birth

to the production of the first offspring), fecundity (total number of offspring produced during a period equivalent to the pre-reproductive period) were assessed. The intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) was also estimated using the simplified method described by Wyatt and White (1977), which assumed that 95 % of the value of  $r_m$  is contributed by the offspring produced in a period equivalent to the pre-reproductive period. It was calculated using the formula  $r_m = 0.74 (\ln Md) / d$ , where  $Md$  is the number of nymphs produced per individual over a period equal to the pre-reproductive period  $d$ . The doubling time (DT) was calculated with  $DT = \ln 2 / r_m$  (Birch 1948).

### *Probing behavior*

The probing behavior of *P. passerinii* was EPG recorded on the three poplar genotypes by using the Giga-4 EPG system (EPG systems, Wageningen, The Netherlands) (Tjallingii 1978, 1988), adjusted at about 70x gain. Stem-cuttings were prepared as for the performance experiment and placed in pots containing water. Three to five-day-old apterous adult females of *P. passerinii* were collected from the laboratory colony and immediately immobilized on the tip of an Eppendorf cone connected to a vacuum device. The wax wool covering aphid dorsum was gently removed with a thin paintbrush, and then a thin gold wire (20  $\mu\text{m}$  diameter and 2 cm length), previously attached to a copper electrode, was stuck on the aphid's dorsum by conductive water-based silver glue (EPG systems, Wageningen, The Netherlands). The electrode was then attached to the amplifier input of the EPG system and the aphid was carefully placed in contact with the bark at mid-height of the poplar stem-cuttings. Another electrode (10 cm copper wire, 2 mm diam.) was inserted into the pot containing the stem-cutting. Each aphid was monitored for 12 h (08:00–20:00 hours) and 22 to 26 individuals were analyzed, depending on the poplar genotype. The connected aphid-plant system whole was placed inside a Faraday cage in a climate-controlled room at a temperature of  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  under electric fluorescent light. The acquisition and analysis were performed with Probe 3.4 software for windows (EPG systems, Wageningen, The Netherlands).

Recording were scored using Np (non-probing) and the EPG waveforms or waveform periods described by Pointeau et al. (unpubl. data): A, stylet pathway through cork tissue; C, extracellular stylet pathway through cortical parenchyma tissue; b-Icp, stylet pathway through cortical parenchyma cells (brief Icp event, < 10 min), and s-Icp, sustained intracellular phase in cortical parenchyma cells (sustained Icp event, > 10 min). Sixteen EPG parameters belonging to these EPG waveforms were calculated using EPG-Calc 4.9 (Giordanengo 2009) and assigned in six categories: (i) general probing behavior (ii) cork phase (A waveform), (iii) extracellular cortical parenchyma phase (C waveform), (iv) crossing of cortical parenchyma cells (b-Icp waveform), and (v) sustained intracellular phase in cortical parenchyma cells (s-Icp waveform), (vi) additional parameters.

Typical sequences of waveform events occurring during stylet penetration were studied on the three genotypes to characterize *P. passerinii* probing behavior based on data of 264-312 h (12 h per aphid) of EPG recording, by calculating the likelihood a specific waveform being followed by another waveform type as described in previous studies (Wayadande and Nault 1996; Almeida and Backus 2004; Miranda et al. 2009). Probabilities < 2 % were not considered.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using R 2.7.2 (R Development core team, 2007). The significance level was set at 5 % in all statistical analyses. Mean values in the text and tables are given with their standard error. All variables were checked for homoscedasticity (Levene test) and normal distribution (Shapiro-Wilk test). As the variables did not fit a normal distribution even after  $\log(x+1)$  or  $\text{ArcSin}\sqrt{x}$  transformation, all of them were analyzed using non-parametric tests.

The genotype effect on settlement rate was assessed using the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Wilcoxon rank sum tests for multiple comparisons, with a Holm correction. Difference between genotypes for the survival rate was assessed using the Fisher exact test. Wilcoxon rank sum test was used to compare pre-reproductive period duration, fecundity, intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) and doubling time (DT).

Genotype effect on EPG parameters during aphid probing was assessed using the Kruskal-Wallis test followed, when significant, by pairwise Wilcoxon rank sum tests for multiple comparisons with a Holm correction. A Fisher exact test was performed to assess whether the proportion of aphids that initiated a sustained ingestion varied among genotypes.

## **Results**

### *Aphid performances*

The settlement rate was reduced on 'Brenta' compared to 'I214' and 'I45/51' (Table 1). No aphid reached the adult stage when nymphs were reared on 'Brenta', while nymphal survival rate was above 90 % on 'I214' and 'I45/51' (Table 1). It was therefore not possible to estimate the remaining demographic parameters on 'Brenta'. The pre-reproductive period was significantly higher on 'I45/51' than on 'I214', while the fecundity was significantly reduced on the former (Table 1). Consequently the intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) of the population was significantly reduced and doubling time of the population (DT) was enhanced when aphids were reared on 'I45/51' (Table 1).

**Table 1** Mean ( $\pm$  SE) performances of *Phloeomyzus passerinii* reared on stem-cuttings of the *Populus x canadensis* Moench genotypes ‘I214’, ‘I45/51’ and ‘Brenta’. Settlement rate, pre-reproductive period (from birth to the production of the first offspring), fecundity (recorded during a period equal to the pre-reproductive period).  $r_m$ : intrinsic rate of natural increase; DT: doubling time. Nymphal survival rate: percentage of nymphs reaching the adult stage.

Performance parameters	I214	I45/51	Brenta	P-value
	n = 22	n = 22	n = 22	
Settlement rate	0.50 $\pm$ 0.05 a	0.61 $\pm$ 0.06 a	0.12 $\pm$ 0.03 b	< 0.001
Nymphal survival rate (%)	95 a	91 a	0 b	< 0.001
	n = 21	n = 20		
Pre-reproductive period (day)	13.7 $\pm$ 0.2	16.0 $\pm$ 0.4	-	< 0.001
Fecundity (female/female)	63.6 $\pm$ 3.8	36.5 $\pm$ 4.9	-	< 0.001
$r_m$ (female/female/day)	0.22 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	-	< 0.001
DT (day)	3.1 $\pm$ 0.1	4.7 $\pm$ 0.3	-	< 0.001

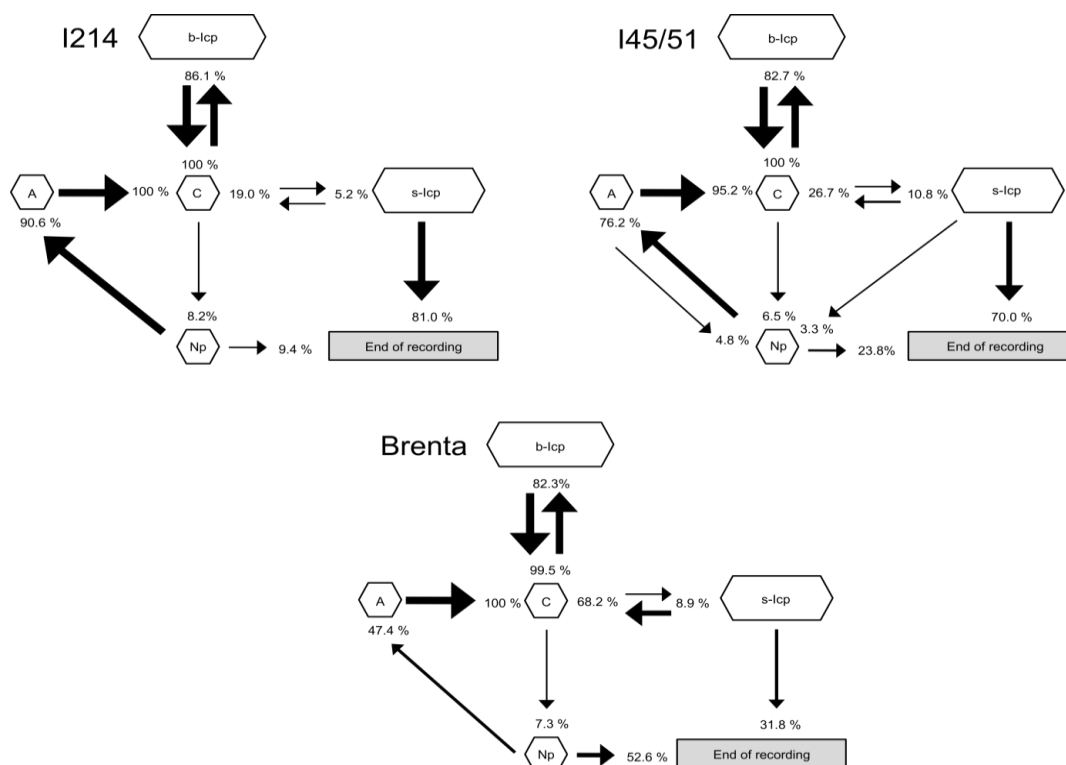
Note: P-value: P-value of the pairwise Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons (settlement rate), Fisher exact test (nymphal survival rate) and Wilcoxon rank sum test (Pre-reproductive period, fecundity,  $r_m$  and DT) ( $\alpha = 0.05$ ).

### Probing behavior

Eight EPG parameters were significantly affected by poplar genotypes (Table 2). General probing behavior and cork phase were significantly affected in their total duration but not in their number of occurrence. Total duration of non-probing (s\_Np) was significantly enhanced on ‘Brenta’ compared with ‘I45/51’. Total duration of cork phase (s\_A) was significantly longer when aphids were reared on ‘I45/51’ compared with ‘I214’. The number of extracellular parenchyma phases and crossings of parenchyma cells were significantly affected by poplar genotypes, but not their total duration. The number of extracellular parenchyma phase (n\_C) and the number of crossed parenchyma cells (n\_b-Icp) were significantly higher on ‘I214’ than on ‘I45/51’. This later parameter was higher on ‘I214’ than on ‘Brenta’ but did not differ between ‘I45/51’ and ‘Brenta’. The proportion of aphids initiating a sustained intracellular phase in cortical parenchyma (%\_s-Icp/Tr) was significantly reduced on ‘Brenta’ compared with both ‘I214’ and ‘I45/51’. Within aphids that initiated a sustained intracellular phase in cortical parenchyma, the number of these sustained phases (n\_s-Icp) was not affected. However, their average duration (a\_s-Icp) was significantly reduced on ‘Brenta’ compared with ‘I45/51’, and their total duration of (s\_s-Icp) was significantly higher on ‘I45/51’ than on ‘I214’. Among additional parameters, the time to the first probe from the beginning of the experiment ( $t > 1Pr$ ) and the time to the first sustained intracellular phase in cortical parenchyma from the start of the first probe ( $t > 1s-Icp$ ) did not differ significantly among the three genotypes. The number of crossed

parenchyma cells before the first sustained intracellular phase in parenchyma ( $n\_b\text{-Icp} > 1s\text{-Icp}$ ) was significantly higher on 'I214' than on 'I45/51'.

Sequence analysis of waveforms during all 264-312 h of EPG recording (12 h per aphid) showed that sequences of events were variable depending on the genotype (Fig. 1). When compared with 'I214', there were approximately twice more C waveforms followed by a sustained intracellular phase in cortical parenchyma (s-Icp) when aphids fed on 'I45/51' and 'Brenta'. On genotype 'I214', 81 % of s-Icp periods were maintained until the end of recording, against only 70 % on 'I45/51' and 31.8 % on 'Brenta'. More s-Icp periods returned to a C waveform on these last two genotypes (26.7 % and 68.2 % for 'I45/51' and 'Brenta' respectively) than on 'I214' (19 %). On the 'I45/51' genotype, 4.8 % of A waveform and 3 % of s-Icp periods were followed by a non-probing period. 9.4 % of the non-probing periods were maintained until the end of the recording on 'I214', whereas the corresponding values were 23.8 % on 'I45/51' and 52.6 % on 'Brenta'.



**Fig. 1** Transition scheme between waveforms representing the typical sequence of events that are likely to occur during 264-312 h of probing behavior of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* on the bark of poplar stem-cuttings of the *Populus x canadensis* Moench genotypes 'I214', 'I45/51' and 'Brenta'. Np (non-probing); A, stylet pathway through cork; C, extracellular stylet pathway through cortical parenchyma; b-Icp, stylet pathway through cortical parenchyma cells (brief Icp event, < 10 min), and s-Icp, sustained intracellular phase in cortical parenchyma cell (sustained Icp event, > 10 min) (Pointeau et al. unpubl. data). The values near the arrowheads correspond to the likelihood that a waveform being followed by any other type. Probabilities < 2 % were not shown.

**Table 2** EPG parameters (mean  $\pm$  SE) belonging to five EPG waveforms or waveform periods: Np (non-probing), A, C, b-Icp and s-Icp (see text for further details); calculated on 12 h EPG recordings of *Phloeomyzus passerinii* feeding on the bark of the *Populus x canadensis* Moench genotypes ‘I214’, ‘I45/51’ and ‘Brenta’. EPG parameters were assigned in six categories: (i) general probing behaviour, (ii) cork phase (waveform A), (iii) extracellular cortical parenchyma phase (waveform C), (iv) crossing of parenchyma cells (brief Icp events < 10 min, b-Icp), (v) sustained intracellular phase in cortical parenchyma (sustained Icp events > 10 min, s-Icp), and (vi) additional parameters. Different letters within a line indicate significant differences ( $\alpha = 0.05$ , Kruskal-Wallis followed by pairwise Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons).

EPG parameters	I214 n = 22	I45/51 n = 26	Brenta n = 22	P-value
<b>General probing behaviour</b>				
1. n_Np	2.5 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	0.722
2. s_Np (min)	428.8 $\pm$ 36.0 ab	308.8 $\pm$ 42.2 a	471.3 $\pm$ 44.3 b	<b>0.018</b>
<b>Cork phase</b>				
3. n_A	2.3 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1	0.419
4. s_A (min)	10.9 $\pm$ 2.4 a	25.2 $\pm$ 5.5 b	46.4 $\pm$ 24.5 ab	<b>0.026</b>
<b>Extracellular parenchyma phase</b>				
5. n_C	18.2 $\pm$ 2.7 a	10.7 $\pm$ 1.0 b	11.3 $\pm$ 1.0 ab	0.030
6. s_C (min)	51.6 $\pm$ 6.5	35.2 $\pm$ 5.2	65.58 $\pm$ 14.1	<b>0.043</b>
<b>Crossing of parenchyma cells</b>				
7. n_b-Icp	15.7 $\pm$ 2.2 a	8.8 $\pm$ 0.8 b	9.3 $\pm$ 0.9 b	<b>0.015</b>
8. s_b-Icp (min)	15.9 $\pm$ 2.0	10.5 $\pm$ 1.2	12.1 $\pm$ 2.2	0.076
<b>Sustained intracellular phase in parenchyma</b>				
9. %_s-Icp/Tr	91 a	88 a	45 b	<b>&lt; 0.001</b>
10. n_s-Icp	1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.3	0.147
11. a_s-Icp (min)	225.0 $\pm$ 39.2 ab	329.8 $\pm$ 42.2 a	156.0 $\pm$ 32.9 b	<b>0.033</b>
12. s_s-Icp (min)	234.9 $\pm$ 40.1 a	384.7 $\pm$ 42.6 b	173.9 $\pm$ 56.1 ab	<b>0.046</b>
<b>Additional parameters</b>				
13. t>1Pr (min)	279.2 $\pm$ 38.3	202.8 $\pm$ 34.1	298.7 $\pm$ 46.0	0.173
14. t>1s-Icp (min)	141.9 $\pm$ 35.9	71.5 $\pm$ 12.8	92.8 $\pm$ 39.7	0.272
15. s_b-Icp > 1s-Icp (min)	13.8 $\pm$ 2.2	8.9 $\pm$ 1.3	11.5 $\pm$ 3.3	0.270
16. n_b-Icp > 1s-Icp	13.8 $\pm$ 2.1 a	7.6 $\pm$ 0.9 b	9.2 $\pm$ 0.9 ab	<b>0.020</b>

Note: (1) n\_Np, number of non-probing; (2) s\_Np, sum of non-probing; (3) n\_A, number of A; (4) s\_A, sum of A; (5) n\_C, number of C; (6) s\_C, sum of C; (7) n\_b-Icp, number of b-Icp; (8) s\_b-Icp, sum of b-Icp; (9) %\_s-Icp/Tr, % aphids with s-Icp; (10) n\_s-Icp, number of s-Icp; (11) a\_s-Icp, average of s-Icp; (12) s\_s-Icp, sum of s-Icp; (13) t>1Pr, time to first probe from the beginning of the experiment; (14) t>1s-Icp, time to the first s-Icp from start of the first probe; (15) s\_b-Icp > 1s-Icp, sum of b-Icp before the first s-Icp; (16) n\_b-Icp > 1s-Icp, number of b-Icp before the first s-Icp.

## Discussion

*P. passerinii* exhibits an atypical parenchyma feeding behavior with EPG waveforms distinct from other aphids, especially the Icp waveform which corresponds to the intracellular position of the stylets in the cortical parenchyma cells (Pointeau et al. unpubl. data). The feeding process in *P. passerinii* consists of a series of consecutive events starting with the first stylet contact with cork, followed by the straight stylet transit through the cortical parenchyma layer with the crossing of parenchyma cells and, ultimately, by a sustained intracellular phase in the cortical parenchyma cells (Pointeau et al. unpubl. data). This peculiar feeding diet suggests that host plant selection in *P. passerinii* follows steps distinct from other aphids. This study was the first attempt to characterize tree resistance to such a parenchyma feeding aphid living on trunk bark, by using EPGs. There is little information in the literature on tree resistance mechanisms involved against such aphids. Our results showed that both EPG signals and performance parameters of *P. passerinii* were affected differently among the three tested poplar genotypes. These results suggest that resistance acts through distinct mechanisms in the 'I45/51' and the 'Brenta' genotypes, as previously hypothesized (Pointeau et al. 2011).

### Surface interactions

Perception of surface physicochemical cues constitutes the first step of plant suitability assessment in aphids (Powell et al. 2006). Surface antixenosis resistance is a common feature that affects aphid settlement on tree leaves due to the presence of trichomes, epicuticular waxes or emission of volatile organic compounds (VOCs) (van Emden 2007). Poplar trunk bark may contain terpenoids, simple phenolics and benzene cyanide potentially involved in VOCs emission or surface properties that could repel or deter *P. passerinii* (Palo 1984; Philippe and Bohlmann 2007). However, *P. passerinii* did not show any significant difference among the three tested genotypes, regarding the delay for the first probing, suggesting that no bark surface repellence interfere in the resistance of 'I45/51' and 'Brenta'. This result is congruent with the high settlement rate of first instar nymphs observed on 'I45/51' and suggests that the very low settlement rate observed on 'Brenta' cannot be related to strong surface antixenotic properties.

### Internal interactions

EPG studies of phloem sap feeding aphids showed that, after plant contact, resistance may be due to either antixenosis resistance based on physicochemical cues perceived at different levels of plant tissues (e.g. epidermis, mesophyll or phloem) or antibiosis when aphids had no difficulties to reach and consume phloem sap but experience low performance due to chemical characteristics of the plant (Cole 1994; Caillaud et al. 1995; Alvarez et al. 2006; Le Roux et al. 2008). In the case of a parenchyma feeder such as *P. passerinii*, antixenosis resistance may be located either in the cork layer

or in the cortical parenchyma tissue, and antibiosis is supposed to be linked to parenchyma cell content.

*Resistance in cork.* Aphids spent more time in cork phase (A waveform) on 'I45/51' than on 'I214' and 'Brenta'. However, settlement rate on 'I45/51' was not significantly affected when compared with the susceptible genotype 'I214'. It is likely that cork does not have significant antixenotic properties and does not contribute significantly to the overall expression of resistance in this genotype. This was corroborated by the fact that 95.2 % of stylet pathways through the cork layer (i.e. A waveform) was followed by extracellular stylet pathways within cortical parenchyma tissue (i.e. C waveform). Consequently, cork-located resistance was not involved in the two tested resistant genotypes.

*Resistance in the cortical parenchyma.* The 'I45/51' and 'Brenta' genotypes exhibited similar characteristics. The phase of stylet transit within the cortical parenchyma was characterized by a significant reduction in the number of crossed parenchyma cells compared with the 'I214' genotype. On 'I45/51', this was followed by a significant reduction in the number of extracellular cortical parenchyma phases. This tendency was also observed on 'Brenta', although not statistically significant. This characteristic could result from difficulties in penetrating the parenchyma tissue, possibly because of antixenotic factors. However, in spite of a reduced number of crossed cells there was no significant difference in the delay in initiating the first sustained intracellular phase in the cortical parenchyma between the three genotypes. Thus, it is more likely that the reduction of crossed cells rather corresponded to anatomical characteristics of these genotypes.

'Brenta' appeared to be a less suitable host genotype than 'I214' and 'I45/51'. On 'Brenta', the very low settlement rate and the zero nymphal survival suggested antixenosis and (or) strong antibiosis properties (Poiteau et al. 2011). The main characteristics of antixenosis in EPGs of phloem sap feeding aphids as well as in gall inducing aphid such as *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) is reduced ingestion phase and a smaller proportion of aphids initiating a sustained ingestion (van Helden and Tjallingii 1993; Cole 1994; Sauge et al. 1998a; Sandanayaka et al. 2003). The EPGs corroborated antixenosis resistance in 'Brenta' since aphids failed to recognize this genotype as a host. Only half of the aphids initiated a sustained intracellular phase in the cortical parenchyma cells of this genotype (i.e. s-Icp waveform) compared to both 'I214' and 'I45/51'. Moreover, a high proportion of sustained intracellular phases (68.2 %) returned to extracellular stylet penetration within parenchyma tissue (only 19 % on the susceptible 'I214'), and 52.6 % of non-probing periods were maintained until the end of recordings (only 9.4 % on 'I214') (Fig. 1). Finally, among aphids that initiated a sustained intracellular phase on 'Brenta', food uptake duration also tended to be reduced although not statistically supported. Antixenosis has generally little influence on nymphal survival (Sauge et al. 1998a,b). However, on 'Brenta', nymphal survival was null, suggesting concomitant antibiotic properties.

The poplar resistance mechanisms explaining such an aphid response on the genotype 'Brenta' is a question open to speculation. Parenchyma-located antixenosis might reflect difficulties in either accepting feeding substrate as a consequence of a deterrent compound (Dixon 1998) or overcoming a rapid plant hypersensitive reaction (Sauge et al. 2002). These two hypotheses might also explain the concomitant antibiotic properties observed on 'Brenta'. Antixenotic effect of deterrent constitutive secondary metabolites, such as tannins or phenolic glycosides present in poplar bark (e.g. salicin, salicortin, tremuloidin, tremulacin) (Palo 1984; Philippe and Bohlmann 2007), might be so strong that starvation could lead to nymph mortality. Alternatively, hypersensitive reaction is triggered by an accumulation of defensive compounds (e.g. phenolics), which cause necrosis. Some of which, appearing directly toxic to aphids (Miles 1989), might also lead to nymph death. Resistance mechanisms in 'Brenta' need further investigations to be elucidated.

Although no nymph completed its life cycle on 'Brenta', 45 % of adult aphids monitored on EPGs were able to initiate a sustained intracellular phase in the cortical parenchyma cells of this genotype. Sandanayaka et al. (2005) observed similar results when they reared *E. lanigerum* on an apple resistant genotype. These authors concluded that the occasional susceptibility, under glasshouse condition, of this generally immune genotype could be an explanation. However, the poplar genotype 'Brenta' is always resistant whatever the scale considered, i.e. laboratory, greenhouse or field conditions (Pointeau et al. 2011). It is possible that more than 12 h (duration of our observations) are necessary for an antibiotic effect to take place in 'Brenta'. An experimental artefact is also possible because wired aphids cannot leave an unsuitable plant, and consequently may probe longer and more frequently leading to a higher proportion of aphids reaching the sustained ingestion phase than in the case of natural conditions (Tjallingii 1986, 1988).

*Resistance without behavioral effects.* The genotype 'I45/51' displayed a different kind of resistance compared with 'Brenta'. Compared with the susceptible genotype 'I214', the settlement rate on 'I45/51' was not affected; but the  $r_m$  was reduced and DT was prolonged consecutively to the antagonistic effects of resistance mechanisms on both the development time and fecundity. Contrary to 'Brenta', *P. passerinii* initiated a sustained intracellular phase in the cortical parenchyma cells of 'I45/51' as quickly and in the same proportion as in 'I214'. The resistance level of this poplar genotype is therefore antibiosis, as previously suggested (Pointeau et al. 2011). The lower nutritional quality of 'I45/51' or the presence of toxic or anti-digestive secondary metabolites such as phenolics might be involved in the antibiotic property of this genotype (Palo 1984; Philippe and Bohlmann 2007). However, food uptake in 'I45/51' was significantly prolonged compared to 'I214' and the survival rate of first instar nymphs was higher, which tends to exclude intoxication of aphid. Nutritional deficiency and/or occurrence anti-digestive secondary metabolites would thus more likely explain the alteration of the demographic parameters of *P. passerinii*. Further investigations are needed to identify the chemical composition (primary and secondary metabolites) of the bark of the of

'I45/51' genotype and clarify their involvement in its resistance.

### **Characteristics of the susceptible genotype**

The typical probing behavior of *P. passerinii* on the suitable 'I-214' host genotype was essentially characterized by the aphid's ability to maintain a sustained intracellular phase in the cortical parenchyma cells for numerous hours, without returning to an extracellular stylet progress in cortical parenchyma tissue. This is congruent with the high levels of settlement and survival, and the rapid development observed on this genotype. However, prior to this experiment, *P. passerinii* had been reared on the 'I214' genotype for several generations. One cannot thus exclude that the marked difference in the susceptibility between 'I214' and the others two genotypes might be partly explained by the maternal experience of the aphids, which could have buffered the effect of host plant quality on offspring fitness, at least during the first offspring generation (Collins et al. 2001). Nevertheless, previous studies showed that maternal experience probably did not exert a strong influence on *P. passerinii*'s performances (Pointeau et al. 2011).

### **Conclusion**

Our results bring knowledge about an unusual tree-aphid interaction model, with distinct host colonization processes. To our knowledge, there is no previous data on the tree resistance mechanisms against such a parenchyma feeding aphid on lignified tissues. The combined analysis of the EPGs and the demographic parameters of *P. passerinii* provided evidence of the existence of different mechanisms of resistance in the poplar genotypes tested. The results suggest that, with the genotypes considered, *P. passerinii* encountered no resistance factors before its stylets reach the cortical parenchyma layer. Feeding behavior was only disrupted on the genotype 'Brenta', which showed a parenchyma-located antixenosis resistance coupled with antibiosis. The mechanisms involved still need to be clarified as it was not possible to distinguish between difficulties to accept the feeding substrat and inability to overcome a possible hypersensitive response of the genotype. Reduced performance on 'I45/51' was due to antibiosis alone, either based on chemical and/or nutritional resistance. These mechanisms are of wider interest in the building of a durable resistance to *P. passerinii* in poplar. They may reduce, when associated in the same genotype, the probability of aphid populations overcoming resistance.

**Acknowledgments** This work is a part of the PhD thesis of S. Pointeau carried out under the directorship and supervision of F. Lieutier with the participation of S. Bankhead-Dronnet as a co-supervisor. It was supported by grants from the French Ministry of Agriculture, Food and Fisheries (MAAP) and the French Ministry of Research and Education (MER).



# Chapitre IV.

---

Facteurs conditionnant l'émergence et  
l'expansion des pullulations



## Chapitre IV.

# Facteurs conditionnant l'émergence et l'expansion des pullulations

### 1. PRESENTATION DE L'ETUDE

Dans ce chapitre, nous nous sommes placés dans un contexte écologique plus large en recherchant les processus à l'origine de l'émergence et de l'expansion des pullulations de *P. passerinii* en France. Rappelons que plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans l'émergence d'un insecte ravageur indigène sur une essence autochtone, en particulier un environnement climatique favorable et/ou une altération du niveau de résistance ou de l'abondance de l'arbre hôte (affectés par les conditions abiotiques et les pratiques sylvicoles). Ces facteurs environnementaux peuvent favoriser le développement des populations locales d'insectes, favoriser l'expansion de certaines populations ou l'apparition et l'expansion de génotypes particuliers (Wagner 2002 ; van Driesche 2006 ; Ayres & Lombardero 2000 ; Margaritopoulos et al. 2009 ; Robinet & Roques 2010). Les dégâts de *P. passerinii* ont été signalés pour la première fois en peupleraie dans le Sud-Ouest de la France en 1996, en 1998 en Indre et Loire puis en 2003 en Bourgogne (Baubet & Goudet 2010). Des modifications climatiques ou liées à l'arbre hôte pourraient avoir été des éléments déclencheurs des pullulations de puceron lanigère du peuplier. De plus, à l'heure actuelle, il est impossible de savoir si ces pullulations sont liées à des populations locales ou à des populations ou génotypes particuliers en expansion géographique. Or, ces informations sont essentielles à l'élaboration de méthodes de gestion adaptées au contrôle de ce ravageur. Cette étude est abordée par deux approches complémentaires qui permettent à la fois d'évaluer l'importance des facteurs environnementaux dans la dynamique des pullulations de *P. passerinii* et de comprendre l'origine et l'évolution des populations de puceron lanigère en France :

- Une première approche a pour objectif d'évaluer l'effet de la température sur les performances du puceron et de tester son implication dans le processus d'émergence et d'expansion des pullulations de puceron lanigère, en considérant également le niveau de résistance des génotypes plantés en France et leur répartition. L'étude vise également à évaluer les risques pour les zones encore non infestées.

- Une deuxième approche complémentaire de génétique vise à retracer l'histoire évolutive des populations de puceron lanigère pour mieux comprendre leur origine géographique, leur évolution et les relations entre foyers d'infestation. Les objectifs spécifiques sont d'une part de mettre au point des

outils génétiques fiables applicables à une étude de génétique des populations, et d'autre part d'utiliser ces outils pour estimer la diversité génétique, identifier les génotypes et apprécier le niveau de différenciation des populations de *P. passerinii*.

Je présenterai d'abord les travaux concernant l'implication des facteurs environnementaux dans l'émergence du problème du puceron lanigère en France, qui font l'objet d'un article prochainement soumis. Puis, j'exposerai les travaux de l'étude génétique, qui ont donné lieu à un article accepté pour publication dans *Molecular Ecology Resources* et un article en préparation.

## 2. ROLE DE LA TEMPERATURE & DE L'ARBRE HOTE

### ❖ Présentation de l'article n°4 et principaux résultats

En France, bien que *P. passerinii* ait été signalé à l'état endémique en peupleraie depuis 1939 (Maugard 1996), les premières pullulations n'ont été enregistrées qu'à partir du milieu des années 1990 dans le Sud-Ouest de la France. Depuis, les pullulations se sont intensifiées et étendues vers le Nord du pays. Le réchauffement climatique récent a déjà été mis en cause dans la modification des régimes de pullulations des insectes forestiers (Netherer & Schopf 2010). Par exemple, les conditions climatiques défavorables du sud du bassin parisien constituaient jusqu'au milieu des années 1990 une barrière à l'expansion latitudinale de la processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa*. Depuis le réchauffement observé en 1996 dans cette zone, cette barrière a été décalée de 5.6 km au nord (Robinet et al. 2007). Les températures anormalement chaudes des années 1990 suivi d'un accroissement continu des températures année après année (EEA 2004) pourraient avoir favorisé localement le développement des populations de puceron lanigère, passant ainsi d'un état endémique à un état épidémique, et contribué à l'expansion des pullulations de pucerons à des zones où les populations étaient auparavant limitées par la température. Des approches modélisatrices expérimentales et théoriques ont été développées sur de nombreux modèles biologiques pour évaluer l'impact potentiel du réchauffement climatique sur les pullulations d'insectes (Bale et al. 2002 ; Williams & Liebhold 2002 ; Ungerer et al. 1999 ; Battisti et al. 2005 ; Crozier & Dwyer 2006 ; Lange et al. 2006 ; Jönsson et al. 2007 ; Robinet et al. 2007). Ce sont généralement des modèles corrélatifs qui relient la distribution actuelle des pullulations d'une espèce à la température afin de prédire l'évolution des aires de pullulation (Williams & Liebhold 2002) ou des modèles mécanistiques qui évaluent en laboratoire la réponse physiologique (e.g. développement, phytophagie) de l'insecte à la variable température pour ensuite la relier à une analyse géographique de l'évolution du climat (Ungerer et al. 1999 ; Battisti et al. 2005 ; Robinet et al. 2007).

Nous avons choisi d'évaluer l'impact d'un réchauffement climatique récent sur l'émergence et l'expansion des pullulations de *P. passerinii* par une approche modélisatrice qui prédirait les patrons d'abondance locale du puceron en utilisant les données climatiques sur une période de 30 ans. Nous avons dans un premier temps étudié la réponse physiologique de l'insecte à la variable température (i.e. quatre températures testées : 10°C, 15°C, 20°C et 25°C) pour ensuite développer un modèle mécanistique de dynamique des populations qui simule le potentiel de croissance annuel des populations de *P. passerinii* en conditions optimales. Pour prédire les risques liés à une évolution du réchauffement climatique, les projections du modèle ont été réalisées pour plusieurs scénarii d'évolution de la température (+ 1°C à + 4°C).

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, les performances du puceron lanigère sont aussi directement influencées par le niveau de résistance des génotypes de peuplier. Les conditions dans lesquelles l'arbre se développe influencent également l'expression phénotypique de la résistance de l'arbre (Rowntree et al. 2010). L'utilisation de génotypes de peuplier sensibles au puceron, la culture en plantations monoclonales ainsi que l'augmentation des surfaces plantées, pourraient avoir aussi un impact important sur les populations de *P. passerinii*. Les génotypes de peuplier cultivés présentent des niveaux de sensibilité variés aux infestations de puceron lanigère (Della Beffa 1936 ; Vidotti 1960 ; Allegro 1997). En France, les infestations sévères concernent essentiellement les génotypes de peuplier euraméricain avec d'abord le 'I214' et dans une moindre mesure 'Dorskamp' et 'Triplo' (Baubet & Carouille 2009). La résistance de l'arbre hôte n'a pas été incluse dans le modèle lui-même, mais le rôle potentiel de la distribution des peupleraies en France et de la résistance des génotypes plantés a été pris en compte dans l'interprétation des résultats.

En combinaison avec les données de l'arbre hôte, le modèle prédit ainsi de manière fiable l'histoire passée et la répartition actuelle des pullulations de *P. passerinii*. La combinaison entre les modifications climatiques locales apparues au cours des années 1990 et la composition génotypique des peupleraies semble avoir contribué à l'émergence des pullulations en France. La répartition actuelle semble être influencée par la température et la distribution des peupleraies. Ce modèle a permis d'identifier un seuil de déclenchement des pullulations qui peut constituer un outil d'évaluation des risques pour les peupleraies encore non infestées, d'autant plus que les scénarii d'évolution de la température prédisent un dépassement de ce seuil sur l'ensemble de la France pour une augmentation des températures moyennes de 1°C.



ARTICLE N°4

Predicting insect outbreaks in a warming world: population dynamics of an emerging poplar pest

Pointeau S, Bankhead-Dronnet S, Robinet C, Sallé A, Pineau X, Vala J-C & Lieutier F

*Prochainement soumis pour publication*

## Résumé

Le changement climatique des dernières décennies a été directement ou indirectement impliqué dans l'évolution de l'histoire de vie et des niveaux de population de plusieurs espèces indigènes d'insectes forestiers, conduisant à des pullulations inattendues et sans précédent. Bien que l'impact complexe du climat sur les communautés d'insectes soit difficile à estimer, l'évaluation de l'effet du réchauffement climatique sur la dynamique des populations d'insectes demeure fondamentale pour comprendre et prédire les pullulations d'insectes induites par ce réchauffement dans les écosystèmes forestiers. Afin de tester l'hypothèse d'un effet du réchauffement climatique sur l'émergence et la propagation des insectes indigènes, cette étude a évalué si le récent réchauffement climatique pourrait expliquer les pullulations du puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii*, un ravageur émergent dans les peupleraies françaises depuis 1996. Un modèle mécanistique de dynamique des populations a été développé pour simuler le potentiel de croissance annuel des populations de *P. passerinii* en conditions optimales, le taux global d'accroissement (TGA), basé sur les traits biologiques dépendant de la température et en donnant le facteur multiplicateur maximal de la population. Les projections du modèle ont été effectuées en utilisant un indice théorique TGA:  $\ln TGA$ . Lorsque les données de l'arbre hôte ont été prises en compte, ce modèle a prédit avec succès l'histoire passée et l'aire actuelle de pullulation de cet insecte, ce qui confirme l'effet du réchauffement climatique sur ce puceron ravageur émergent. Des scénarii simples de réchauffement climatique (+1 à +4 ° C) ont prédit l'avenir des tendances locales à l'échelle du pays, montrant une augmentation significative des niveaux de population sur une large zone géographique et un risque d'épidémie dans les plantations non encore affectées avec une augmentation de température de seulement 1 ° C.

## Predicting insect outbreaks in a warming world: population dynamics of an emerging poplar pest

Sophie Pointeau<sup>1</sup>, Stéphanie Bankhead-Dronnet<sup>1</sup>, Christelle Robinet<sup>2</sup>, Aurélien Sallé<sup>1</sup>, Xavier Pineau<sup>1</sup>, Jean-Claude Vala<sup>1</sup> & François Lieutier<sup>1</sup>

1 UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres, BP 6759, FR-45067 Orléans Cedex, France.

2 INRA, UR633 Zoologie Forestière, FR-45075 Orléans, France

### Abstract

Climate change in recent decades has been directly or indirectly involved in changing the life-history and population levels of many endemic forest insect species, leading to unexpected and unprecedented outbreaks. In spite of difficulties in assessing the complex impact of climate on insect communities, evaluating the effect of climate warming on insect population dynamics remains fundamental to understanding and predicting global warming-induced insect outbreaks in forest ecosystems. To test the hypothesis that climate warming affects the emergence and spread of endemic insects, this study assessed whether recent climate warming could explain the outbreaks of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, an emerging pest in French poplar stands since 1996. A mechanistic model of population dynamics was developed to simulate the annual growth potential of *P. passerinii* populations under optimal conditions, the Global Increase Rate (GIR), based on temperature-dependent biological traits and giving the maximum multiplying factor of the population. Model projections were performed using a theoretical GIR index: Ln GIR. When host tree data was taken into account, this model could successfully indicate the past history and current outbreak range of the insect, confirming the effect of climate warming on this emerging aphid pest. Simple climate warming scenarios (+1 to +4°C) predicted future local tendencies at the country scale, showing a significant increase in population levels over a wide geographical area and a risk of outbreak in plantations not yet affected with an increase in temperature of only 1°C.

**Keywords** Forest disturbance · Outbreak modelling · Epidemic aphid species · Global increase rate · *Phloeomyzus passerinii*

## Introduction

Regional and global climate changes, particularly temperature increase, are major anthropogenic disturbances suffered by ecosystems. During the last century, the temperature increased significantly by  $0.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  (Folland et al. 2001) and the mean global temperature was forecast to increase by 1.8 to  $4.0^{\circ}\text{C}$  between 1980-1999 and 2090-2099 (Meehl et al. 2007). As trees are long-living organisms with slow growth, forest ecosystems are particularly sensitive to environmental changes, which can cause forest disturbance (e.g. increased frequency of extreme events such as drought, fire, storms and hurricanes). The distribution, phenology, abundance and dynamics of many forest plant and animal species are also expected to change significantly over the next decades (e.g., McCarty 2001; Parmesan and Yohe 2003; Root et al. 2003; Parmesan 2006).

Poikilothermic organisms, in particular insects, are highly sensitive to temperature, which directly affects their life-history traits (development, reproduction and mortality) and dispersal. Global warming may, therefore, influence both the rate of increase and the distribution of their populations. Moreover, temperature increase can cause cascade effects on herbivorous forest insect populations with indirect effects on community interactions, including host trees, competitors, natural enemies and symbionts (Ayres and Lombardero 2000; Bidart-Bouzat and Imeh-Nathaniel 2008; Netherer and Schopf 2010; Robinet and Roques 2010). The changes in outbreak patterns of herbivorous insects in temperate forests have both ecological and socio-economical impacts (Ayres and Lombardero 2000; Volney and Fleming 2000; Dale et al. 2001; Netherer and Schopf 2010). There is already visible evidence that temperature is the main cause of outbreak pattern modifications through its effect on the population dynamics of herbivorous forest insects, characterized by explosive population eruptions (Netherer and Schopf 2010). The most frequently reported response to global warming is climate-induced outbreak range shifts, which are well documented in coniferous pests such as bark beetles in North America (Ungerer et al. 1999, Williams and Liebhold 2002; Berg et al. 2006) and the pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa*) in Europe (Battisti et al. 2005; Robinet et al. 2007).

To show how climate warming has affected, and will continue to affect, outbreak ranges, frequencies and intensities, various statistical modelling strategies were used, based either on correlative models that correlate current species outbreak distributions with climatic variables (Williams and Liebhold 2002) or on mechanistic relationships between temperature and species-specific physiological responses (Ungerer et al. 1999; Battisti et al. 2005; Robinet et al. 2007). While correlative models may provide good indications of the impact of climate warming on outbreak ranges, mechanistic approaches using lab-based estimates of insect thermal physiology can provide greater understanding (Pearson and Dawson 2003; Crozier and Dwyer 2006; Robinet et al. 2007). They correlate the temperature with population dynamics parameters, making it possible to assess the importance of temperature on both outbreak range and dynamics (Ungerer et al. 1999; Battisti et al.

2005; Lange et al. 2006; Jönsson et al. 2007). The reliability of such methods derived from bioclimatic envelope models is open to question as factors other than temperature, particularly biotic interactions, may be involved in determining outbreak range and dynamics (Pearson and Dawson 2003). However, mechanistic models provide a useful basic approach giving an initial approximation of the potential effects of global warming on outbreak patterns (Pearson and Dawson 2003; Robinet et al. 2007). There are currently limitations in outbreak risk assessment in response to global warming. Firstly, most existing models of population dynamics focus on the shift of range leading to outbreaks further north or at higher altitudes and the prediction of unprecedented outbreaks related to changes in voltinism (Ungerer et al. 1999; Battisti et al. 2005; Lange et al. 2006; Jönsson et al. 2007). Little research has been carried out into the prediction of local explosions of insect populations by the detection of a threshold for triggering outbreaks. Such a model would be a useful means for predicting local effects of climate warming on outbreak patterns and improving management strategies. Secondly, existing models are generally based on temperature-dependent development (lower developmental threshold and development degree-days) and do not take account of the effects of temperature on reproduction. Finally, these models focus mainly on coniferous forest insects, in particular bark beetles and Lepidoptera (Volney and Fleming 2000; Netherer and Schopf 2010; Robinet and Roques 2010).

To gain a better understanding of the direct impact of global warming on insect outbreak patterns, predictive models should be applied to forest insect species that may be key agents of forest disturbance (Ayres and Lombardero 2000). Among insects, aphids (Hemiptera: Sternorrhyncha) are sensitive indicators of temperature change, owing to their fast growth, low developmental temperature thresholds and short generation times without diapause, allowing them to reproduce many generations per year (Harrington et al. 1995). The outbreak patterns of temperate aphid species, in which parthenogenetic reproduction may predominate, are therefore expected to be significantly modified by global warming (Bale et al. 2002). Moreover, aphids are important pests and it is of particular interest to predict how their populations will respond to future environmental changes (Harrington et al. 2007; Hullé et al. 2010). Previous studies on the effects of global warming on aphids have focused mainly on phenological changes caused by milder winters resulting in earlier flight (Harrington et al. 2001; Weastgarth-Smith et al. 2007). Investigating how aphid population-dynamics could respond to global warming will provide useful additional information (Newman 2003).

The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Signoret (Sternorrhyncha: Aphididae: Phloeomyzinae), feeds in bark crevices of the trunk of *Populus* spp. and is considered to be the most significant pest of poplar stands throughout temperate Europe and the Near East (Arzone and Vidano 1984; Lapietra and Allegro 1990; Sadeghi et al. 2007; Baubet and Carouille 2009). It has a predominant parthenogenetic reproduction pattern of apterous virginoparae in France and some Mediterranean countries. Colonies develop rapidly from March to November and apterous

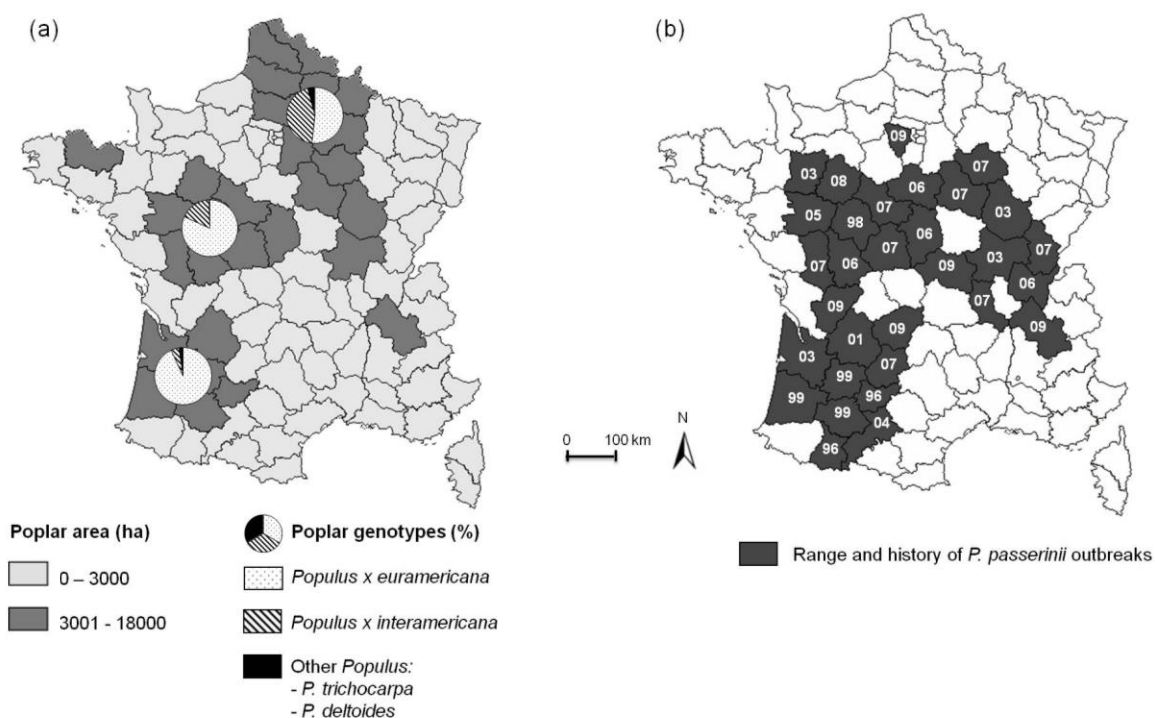
virginoparae overwinter in bark cracks when the temperature is low (Arzone and Vidano 1984). This aphid mainly attacks *Populus x euramericana* (Dode) Guinier genotypes, especially the widely planted 'I214' (Allegro and Cagelli 1996; Allegro et al. 1996; Baubet and Carouille 2009). *P. passerinii* outbreaks result in several symptoms ranging from reduced tree growth to massive tree mortality leading to significant financial losses (Della Beffa 1936; Arzone and Vidano 1984; Baubet and Carouille 2009). The first outbreaks were recorded in Italy in 1934 (Della Beffa 1936) and their frequency increased during the 1980s (Lapietra and Allegro 1990). In France, although the aphid had been reported as endemic for a long time, its first significant attacks were recorded only during the mid-1990s in the south-west (Maugard 1996; Maugard and Baubet 2004). Since then, outbreaks have increased in severity and have extended northwards (Baubet and Carouille 2009). The unusually warm worldwide temperatures of the 1990s may have encouraged the development of latent populations until the first outbreaks and the continual increase in temperature may have encouraged the outbreaks to move northwards (EEA 2004).

This study investigated the effects of climate warming as well as distribution and genotypic composition of poplar stands on outbreak patterns of the woolly poplar aphid in France. A simple method was developed to predict extreme scenarios of aphid population growth related to global warming and to define a critical threshold for triggering outbreaks with populations expanding from endemic to epidemic levels. Laboratory experiments were carried out at constant temperatures to measure individual development and fecundity, from which population growth parameters were calculated. The experimental data was used to develop a mechanistic model of population dynamics. A theoretical multiplying factor, the "Global Increase Rate" (GIR), was used to simulate the annual growth potential of *P. passerinii* populations under optimal conditions at various temperatures over the study area (France). It represented the suitability of the habitat temperature in various localities. Model projections were performed using a theoretical GIR index:  $\ln \text{GIR}$ . By using historical climatic data, the GIR model was used to test the hypothesis that the increase in number of outbreaks and range was due to climate change. Various scenarios for climate warming and host tree data were considered to assess the risk of aphid outbreaks as a function of temperature.

## Study area and host trees

The study was carried out at national scale in France. The area of poplar stands in each department (French administrative county) was determined using 2003 cadastral data. Departments were separated into two classes depending on the total area of poplar plantations (0-3000 ha, 3001-18000 ha). The distribution and abundance of poplar areas varied (Fig. 1a). The departments with the largest areas of poplar (> 3000 ha) were located in three main zones: (1) south-west, (2) centre and (3) north of France. They accounted for 31% of departments and 75% of the total area planted with poplars. The proportion of three groups of poplar genotypes in each of these poplar zones was calculated (data at regional scale from the French Ministry for Agriculture, Food, and Fisheries, 1996-2008) (Eric Paillassa, Institute for Forestry Development, pers. com.) (Fig. 1a). These groups of genotypes were defined according to the species or hybrids to which they belong: (i) *Populus x euramericana* hybrids, mainly the 'I214' genotype, (ii) *P. x interamericana* Brockh. hybrids, mainly the 'Beaupré' genotype, and (iii) *P. deltoides* Marsh. and *P. trichocarpa* Torr.& Gray. The first group of genotypes was considered to be the most susceptible to *P. passerinii*, whereas the genotypes in the last two groups were considered to be resistant (Allegro and Cagelli 1996; Allegro et al. 1996; Baubet and Carouille 2009; Pointeau et al. pers. obs.). *P. x euramericana* hybrids accounted for more than 80-95% of the poplar diversity in the south-west and the central zones and 51.8 % in the northern zone.

The current distribution of the departments affected by *P. passerinii* outbreaks in France were also considered (source: Forest Health Department, DSF, French Ministry of Agriculture, Food, and Fisheries) (Fig. 1b). To show the history of outbreaks, the year of the first outbreak recorded was indicated for each department. It was clear that damage had spread recently and rapidly from the southern-west to the central part of France and that the northern part is currently unaffected.



**Fig. 1** (a) Poplar stand data in France: distribution of the departments in which the total poplar area exceeded 300 ha (cadastral data 2003). Three main poplar zones: (1) southern, (2) central and (3) northern zones. In each zone, the relative area (% of the total poplar area) of three groups of poplar genotypes is indicated (data from the French Ministry for Agriculture, Food and Fisheries (1996-2008)). (b) Outbreak history of *P. passerinii*: the year (last two numbers) of the first outbreak report is indicated for each department (data from Forest Health Department). Departments are delimited by thin black lines.

## Model description and methods

The Global Increase Rate model was developed to simulate the annual growth potential of *P. passerinii* populations under optimal conditions over the study area, assuming that host saturation and natural enemies were not limiting factors of population growth. Since it was a multiplying factor, this model did not require abundance data, and thus, the population growth rate could be simulated without knowing the initial population size. At a given point in France, the GIR was affected by both the number of generations that a population can achieve and the rate of multiplication in each generation ( $R_0$ , net reproductive rate) (Andrewartha and Birch 1954). As these two parameters are closely related to temperature, the annual growth potential of *P. passerinii* populations was expected to vary geographically according to the climatic characteristics of each area (Harrington et al. 1995). GIR data were Ln transformed in order to project them onto the study area, giving a map of a GIR index representing the growth potential of *P. passerinii* populations in one year under optimal conditions (without limiting factors except temperature). This map was used to test the hypothesis that

climatic changes explained the recent spread and intensification of outbreaks in France. The GIR index projection also gave a tool for assessing the risk of outbreaks in regions that are currently unaffected, under current climate conditions and warming scenarios. All analyses and simulations were performed using R 2.7.2 (R Development core team 2007). Maps were generated using ArcInfo 9.2, ESRI.

### *Modelling the Global Increase Rate (GIR)*

*Temperature dataset.* A model was built using daily mean temperatures recorded from January to December. Daily minimum (Tmin) and maximum (Tmax) temperatures for the 30-year period 1979-2008 were obtained from the European Climate Assessment & Dataset (Klein Tank et al. 2002), at 28 weather stations covering the study area. Missing data (i.e. the temperatures for days without records, 1% of the data) were estimated by linear regression using the data from the nearest station and daily mean temperatures were calculated from the Tmin and Tmax data over this 30-year period at these 28 stations.

*Number of generations and net reproductive rate of *P. passerinii*.* These parameters were calculated for each weather station over the period 1979-2008. To calculate the number of generations ( $G$ ), degree-days were computed for each day as  $T_{\text{mean}} - T_0$ , where  $T_{\text{mean}}$  was the daily mean temperature and  $T_0$  the developmental threshold temperature defined from laboratory experiments (see below). The accumulated degree-days from January to December were then calculated. The number of generations in a year for each locality was given by  $G = \sum \text{degree-days}_{\text{Jan-Dec}} / DD_{\text{Gen}}$ , where  $DD_{\text{Gen}}$  was the accumulated degree-days required to achieve a complete generation (defined from the laboratory experiment). The annual mean net reproductive rate ( $R_0$ ) for each year and each locality was estimated using daily mean temperatures and the non-linear regression equation fitted to the four measured  $R_0$  values (one at each temperature tested in the laboratory experiment) and  $R_0$  equals to zero at the developmental threshold temperature.

*GIR model.* In case of overlapping generations, population size at time  $t$  is

$$N_{(t)} = R_0^{g(t)} N_{(0)} \quad (1)$$

where

$g(t)$  is the number of generations at the time  $t$  since the initial time

$R_0$  is the net reproductive rate of the population

$N_{(t)}$  is the population size at time  $t$

$N_{(0)}$  is the initial population size

The annual growth potential of *P. passerinii* populations (GIR) based on the number of generations completed within one year ( $G$ ) ( $= g$  ( $t = 1$  year)), was derived from equation (1):

$$\text{GIR} = N_{(G)} / N_{(0)} = R_0^G \quad (2)$$

The GIR was calculated for each year during the period 1979-2008 at the 28 weather stations using the equation (2), assuming that the same non-linear relationship between temperature and  $R_0$  applied for all generations at a given station. The  $G$  parameter took account of the effect of annual temperature variations on aphid development and  $R_0$  took account of reduction in aphid fecundity and survival at lower and higher temperatures. To summarise the results, a mean GIR index (Ln GIR) was calculated for sequential five-year periods from 1979 to 2008 (1979-1983, 1984-1988, 1989-1993, 1994-1998, 1999-2003, 2004-2008) in each of the 28 weather stations. For each five-year period, the mean GIR index was interpolated using a multiple regression with latitude, longitude and elevation as predictive variables, based on the data from the 28 stations. It was then projected onto a grid cell ( $180 \times 132$  cells, with a cell size  $\Delta x = \Delta y = 0.08^\circ$ ) covering the study area (N  $41^\circ.08'$  – N  $52^\circ.00'$ , W  $04^\circ.92'$  – E  $10^\circ.00'$ ) using a digital elevation model derived from the USGS/NASA SRTM data (Jarvis et al. 2006).

To evaluate the model, both annual mean and maximum Ln GIR values corresponding to the year of the first recorded outbreak in each department affected by *P. passerinii* between 1996 and 2008 were calculated. Locations above the elevation limit of 650 m, which corresponded to areas where there are no poplar stands (source: Forest Health Department, DSF, French Ministry of Agriculture, Food, and Fisheries), were excluded from the calculations, to avoid bias in mountainous departments. Ln GIR values were compared with the years and locations of the first outbreaks in order to detect a possible Ln GIR threshold related to outbreak emergence.

#### *Climate warming scenarios in combination with poplar stand data*

To explore the possible effects of climate warming on the pest status of *P. passerinii*, an increase in temperature was simulated, ranging from  $+1^\circ\text{C}$  to  $+4^\circ\text{C}$ , in steps of  $1^\circ\text{C}$ , from the reference stable climate scenario (based on the average values of Ln GIR for the 30-year period 1979-2008). The mean GIR index over this period was estimated for each station and interpolated for each climate warming scenario. The data was then projected onto the grid cell described above.

The results generated by the model of the reference stable climate and the temperature increases were used to compare the mean GIR index below the elevation limit of 650 m for the three main poplar zones (Fig. 1a).

### *Model parameters*

*Aphids and plants.* *P. passerinii* were bred in laboratory conditions from a single collection of one wild apterous parthenogenetic female collected in May 2008, in a poplar stand located in Maray (Centre region, France). The aphids were reared on cuttings of the poplar genotype *P. x euramericana* cv. I214 (length: 25 cm, diameter: 1.5 to 2 cm), using the method described by Arru (1974). Breeding conditions were maintained at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  RH and 16:8h L:D.

In December 2008, 120 cuttings of 'I214' (diameter: 1.5 to 2 cm, length: 15 cm) were collected from seedlings located in an experimental forestry nursery in Guémené-Penfao (Brittany region, France). These cuttings were transplanted into 0.53 L pots containing a 3:1 mixture of compost (Klasmann® substrate 4 n°267) and sand. For easy handling, all except the terminal buds were removed. The potted cuttings were placed in a greenhouse and left to root for two weeks before use.

*Experimental treatments.* The experiment was carried out in climatic chambers at four constant temperatures,  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , and  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , under controlled daylight (16:8h L:D) and  $70 \pm 10\%$  relative humidity. Before the assays, four young apterous virginoparae aphids bred in the laboratory were placed on the bark of each of the 120 potted cuttings using a thin paintbrush and kept under a gelatine capsule (LGA, La Seyne-sur-Mer) to prevent them falling or moving. The capsules were held on the bark by Parafilm®. All the cuttings were first kept at  $20^\circ\text{C}$  for 24 hours to obtain even-aged pools of first instar nymphs under the gelatine capsules. The capsules and the adults were then removed and a maximum of 10 nymphs per cutting was kept. Cuttings were divided into four groups of 30, which were kept in climatic chambers for the temperature tests. The aphids were monitored daily and, once the nymphs had reached the adult stage, only one adult was kept on each cutting and monitored daily until death.

*Individual parameters.* Nymphal survival and development was assessed by monitoring the cuttings daily for the occurrence of each instar and their exuviae. The mean duration of the four nymphal instars and total nymphal development was calculated for each cutting. Nymphal survival was assessed as the percentage of nymphs that had reached maturity.

Total longevity was estimated as the time from birth to death. The duration of total adult life and the three adult life periods (pre-reproductive, reproductive, and post-reproductive) was recorded. The mean total fecundity of apterous virginoparae (number of offspring per female) was assessed by recording the offspring daily.

The relationship between the development rate (reciprocal of total nymph development time) and temperature was used to estimate the developmental threshold temperature and the development degree-days (Andrewartha and Birch 1954; Campbell et al. 1974). This relationship can be approximated by a straight line between extreme temperatures (temperatures below which the

development is considered to cease and above which the insect dies). Most development rate data can thus be fitted reasonably well by linear regression, where the intercept with the temperature axis gives the developmental threshold. The standard error was calculated according to Campbell et al. (1974). The development degree-days estimate was calculated as the temperature/time product:

$$(T_t - T_0) (H),$$

where

$T_0$  is the developmental threshold temperature,

$T_t$  is the rearing temperature and

$H$  is the development duration (in days) at that temperature.

The accumulated degree-days for a complete generation (from birth to the production of the first offspring) ( $DD_{Gen}$ ) were also estimated using the above equation by replacing ( $H$ ) by the length of the pre-reproductive period.

*Population parameters.* A life table was built using the age-specific survivorship ( $l_x$ ) and fecundity ( $m_x$ ) for each age interval ( $x$ ) including nymphal instars. The intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) was approximated using the equation:  $\sum e^{-r_m x} l_x m_x = 1$ . The net reproductive rate ( $R_0 = \sum l_x m_x$ ), the finite rate of increase ( $\lambda = e^{r_m}$ ), the mean generation time ( $T_m = \ln R_0 / r_m$ ) and the doubling population time ( $T_d = \ln 2 / r_m$ ) were also calculated (Andrewartha and Birch 1954). The Jackknife technique was used to estimate the uncertainty associated with the estimation of each population growth parameter (Meyer et al. 1986).

### *Statistical analysis*

The mean values in the text and tables are given with their standard error ( $\pm$  SE). Statistical procedures were performed using R 2.7.2 (R Development core team 2007). All variables were checked for their homoscedasticity (Levene test) and normal distribution (Shapiro-Wilk test). Non normal data was  $\log(x+1)$  or  $\text{ArcSin}\sqrt{x}$  transformed. Variables that did not fit a normal distribution after transformation were analyzed with non-parametric tests. The significance of correlations between warming, development time, nymphal survival, longevity, adult life periods, total fecundity and population growth parameters were analyzed with a Kruskal-Wallis test followed, when significant, by pairwise Wilcoxon rank sum tests for multiple comparisons. The significance was taken at  $P \leq 0.05$ . The correlation between the development rate of nymphal instars and temperature was tested using the Pearson test.

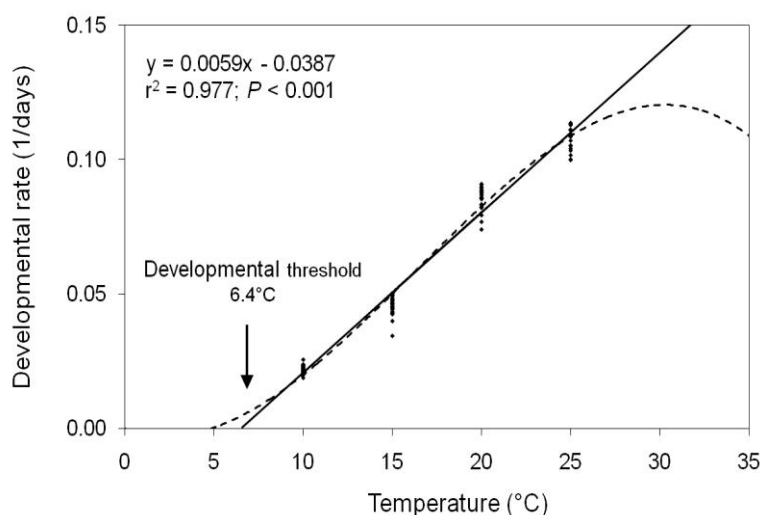
## Results

### Model parameters

*Individual parameters.* All *P. passerinii* individuals developed through four nymphal instars. For each nymphal instar, the duration of the development decreased significantly when the temperature increased from 10°C to 25°C, leading to a decrease in the duration of the total nymphal development (Table 1). Survival increased slightly but significantly with increasing temperature (Table 1). The highest mortality occurred at 10°C and 15°C, whereas the optimal temperature for nymphal instar survivorship was between 20°C and 25°C.

The total longevity and total duration of the three adult life periods (pre-reproductive, reproductive and post-reproductive life) of apterous parthenogenetic *P. passerinii* decreased significantly as the temperature increased from 10 to 25°C (Table 1). The total mean fecundity was significantly affected by low and high temperatures. The maximum number of nymphs was observed at 15°C and 20°C and the minimum at 10°C.

The development rate of the nymphal instars was correlated linearly and positively with temperature (Fig. 2). Based on the intercept of the regression line with the temperature axis, the minimum temperature needed to allow development (lower developmental threshold) was estimated at  $6.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . The upper temperature allowing development could not be determined over the range of temperatures tested but a third order regression equation showed that *P. passerinii* optimum was around 30°C. Using the lower developmental threshold, the development degree-days of *P. passerinii* (from birth to adulthood) was  $171 \pm 1$  degree-days. The accumulated degree-days required by *P. passerinii* for a complete generation (from birth to the production of the first offspring) ( $DD_{Gen}$ ) were  $198 \pm 2$  degree-days.



**Fig. 2** Rate of development (1/days) from birth to final ecdysis of apterous individuals of *Phloeomyzus passerinii* reared at four constant temperatures, n= 119. The broken line is a diagrammatic representation of a speculative third order polynomial regression.

**Table 1** Mean ( $\pm$  SE) development time (days) of the four nymphal instars, fecundity, duration of adult life periods (days), longevity (days) and nymphal survival (%) during development of apterous parthenogenetic *Phloeomyzus passerinii* reared at four constant temperatures on 'I214' potted cuttings. n = number of cuttings. Means with the same letter within a line did not differ significantly ( $\alpha = 0.05$ , pairwise Wilcoxon rank sum test).

	Rearing temperature				<i>P</i> <
	10°C	15°C	20°C	25°C	
	(n=29)	(n=30)	(n=30)	(n=30)	
Nymphal periods (days)					
First instar	14.17 $\pm$ 0.22 a	7.35 $\pm$ 0.11 b	4.23 $\pm$ 0.07 c	3.20 $\pm$ 0.06 d	0.001
Second instar	10.35 $\pm$ 0.32 a	5.01 $\pm$ 0.18 b	2.87 $\pm$ 0.07 c	2.45 $\pm$ 0.06 d	0.001
Third instar	9.91 $\pm$ 0.13 a	4.33 $\pm$ 0.11 b	2.21 $\pm$ 0.06 c	1.78 $\pm$ 0.04 c	0.001
Fourth instar	11.15 $\pm$ 0.27 a	5.16 $\pm$ 0.08 b	2.39 $\pm$ 0.07 c	1.85 $\pm$ 0.03 d	0.001
Total development	45.57 $\pm$ 0.41 a	21.85 $\pm$ 0.33 b	11.71 $\pm$ 0.11 c	9.28 $\pm$ 0.07 d	0.001
Nymphal survival (%)	64.6 $\pm$ 4.8 b	66.4 $\pm$ 4.8 b	87.5 $\pm$ 1.8 a	79.1 $\pm$ 3.9 ab	0.001
	(n=28)	(n=27)	(n=24)	(n=20)	
Adult periods (days)					
Pre-reproductive	8.57 $\pm$ 0.43 a	3.6 $\pm$ 0.20 b	1.67 $\pm$ 0.11 c	1.23 $\pm$ 0.08 d	0.001
Reproductive	64.04 $\pm$ 4.37 a	44.56 $\pm$ 2.27 b	25.26 $\pm$ 1.34 c	16.7 $\pm$ 1.58 d	0.001
Post-reproductive	7.50 $\pm$ 1.4 a	4.74 $\pm$ 0.99 ab	1.96 $\pm$ 0.41 bc	0.63 $\pm$ 0.45 c	0.001
Fecundity	29.79 $\pm$ 2.59 c	106.2 $\pm$ 7.39 a	89.98 $\pm$ 6.81 a	55.45 $\pm$ 7.42 b	0.001
Longevity (days)					
Adult life	80.11 $\pm$ 4.57 a	52.96 $\pm$ 2.91 b	28.79 $\pm$ 1.39 c	18.8 $\pm$ 1.70 d	0.001
Total life	124.9 $\pm$ 4.60 a	74.31 $\pm$ 2.98 b	40.79 $\pm$ 1.41 c	28.05 $\pm$ 1.69 d	0.001

*Population parameters.* All the life table statistics were affected significantly by temperature (Table 2). The net reproductive rate ( $R_0$ ) was very low at 10°C and peaked at 15°C, with a maximum multiplying factor of populations of 106 times in each generation. The intrinsic rate of natural increase ( $r_m$ ) increased significantly with temperature up to 25°C. At 10°C, aphids had difficulty in maintaining their population ( $r_m = 0.046$ ). Over the range of the temperatures tested, it was not possible to determine the temperature at which  $r_m$  started to decline as temperature increased. The highest finite rate of increase ( $\lambda$ ) was 1.27 and was recorded at 25°C. The mean generation time ( $T_m$ ) and the doubling generation time ( $T_d$ ) decreased significantly as the temperature increased from 10°C to 25°C. These two parameters decreased rapidly between 10°C and 15°C but slowly from 15°C to 25°C.

**Table 2** Mean ( $\pm$  SE) population growth parameters of apterous parthenogenetic *Phloeomyzus passerinii* reared at four constant temperatures on 'I214' potted cuttings.  $R_0$  = net reproductive rate;  $r_m$  = intrinsic rate of natural increase;  $\lambda$  = finite rate of increase;  $T_m$  = mean generation time;  $T_d$  = doubling generation time. Means with the same letter within a line did not differ significantly ( $\alpha = 0.05$ , pairwise Wilcoxon rank sum test).

	Rearing temperature								$P <$				
	10°C (n=28)		15°C (n=27)		20°C (n=24)		25°C (n=20)						
$R_0$	29.92	$\pm$ 0.09	d	106.2	$\pm$ 0.26	a	87.02	$\pm$ 0.28	b	51.98	$\pm$ 0.36	c	0.001
$r_m$	0.046	$\pm$ 0.001	d	0.119	$\pm$ 0.001	c	0.212	$\pm$ 0.001	b	0.242	$\pm$ 0.001	a	0.001
$\lambda$	1.047	$\pm$ 0.001	d	1.126	$\pm$ 0.001	c	1.236	$\pm$ 0.001	b	1.274	$\pm$ 0.001	a	0.001
$T_m$	73.88	$\pm$ 0.05	a	39.21	$\pm$ 0.02	b	21.07	$\pm$ 0.01	c	16.33	$\pm$ 0.02	d	0.001
$T_d$	15.07	$\pm$ 0.008	a	5.825	$\pm$ 0.002	b	3.27	$\pm$ 0.002	c	2.864	$\pm$ 0.003	d	0.001

### Modelling the Global Increase Rate (GIR)

*Number of generations and net reproductive rate.* The number of generations that *P. passerinii* can achieve in one year (during its active period) ranged from 3 to 19 for all weather stations over the period 1979-2008. The non-linear relationship between temperature (from 6.4°C to 25°C) and the net reproductive rate ( $R_0$ ) was represented by the regression equation:

$$y = -0.0231x^3 + 0.2664x^2 + 13.6110x - 96.5200 \quad (R^2 = 0.920),$$

with a maximum occurring at 18-19°C.

*GIR model.* The regressions that gave the best explanations of the variation of the GIR index (Ln GIR) for each of the sequential five-year period are summarized in Table 3.

The index gradient given by the model for the six sequential five-year periods ranged from 0 to 81 for the study area (Fig. 3a), which means that the population level of *P. passerinii* could be multiplied by a factor of between 0 and 1.5E+35 in one year depending on the locality. The south-to-north index gradient did not change during the first two five-year periods (1979 to 1988). The GIR index remained 1.4-2.2 times higher in the south-west (generally between 50 and 65) than in the north (30 to 35) and stayed around 35-45 in the central part. From the period 1989-1993, this gradient changed. During 1989-1998 in the north of France, the GIR index value was between 35 and 40, while it was 40-45 from 1999. The GIR index increased by a factor of 1.3 over the 30-year period 1979-2008 in the north, while it increased by a factor of 1.1 in the south-west, rising from 55 to 70 from 1994 to 2008. In central France, the GIR index values were roughly comprised between 40 and 50 from 1989. The current GIR index gradient (period 2004-2008) has values 1.2-1.8 times higher in the south-west ( $55 < \text{Ln GIR} < 70$ ) than in the north ( $40 < \text{Ln GIR} < 45$ ).

In the evaluation of the model, all annual mean GIR index values for the first years of outbreak in each French department were above 45 (or  $GIR = 3.5E+19$ ) (Fig. 3b). The highest mean GIR index value (66.1) was found in Gironde and the lowest was 45.1 (Jura). Maximum GIR index values were between 48.4 (Aube) and 68.8 (Landes). See Online Appendix 1 for the department numbers, names and corresponding mean and maximum annual GIR index values. There was a good congruence between the departments where the GIR index value was above 45 for the 2004-2008 period and the departments currently affected by *P. passerinii* outbreaks (Fig. 3c). GIR index value was above 45 in 90 % of the area currently affected by *P. passerinii* outbreaks presented.

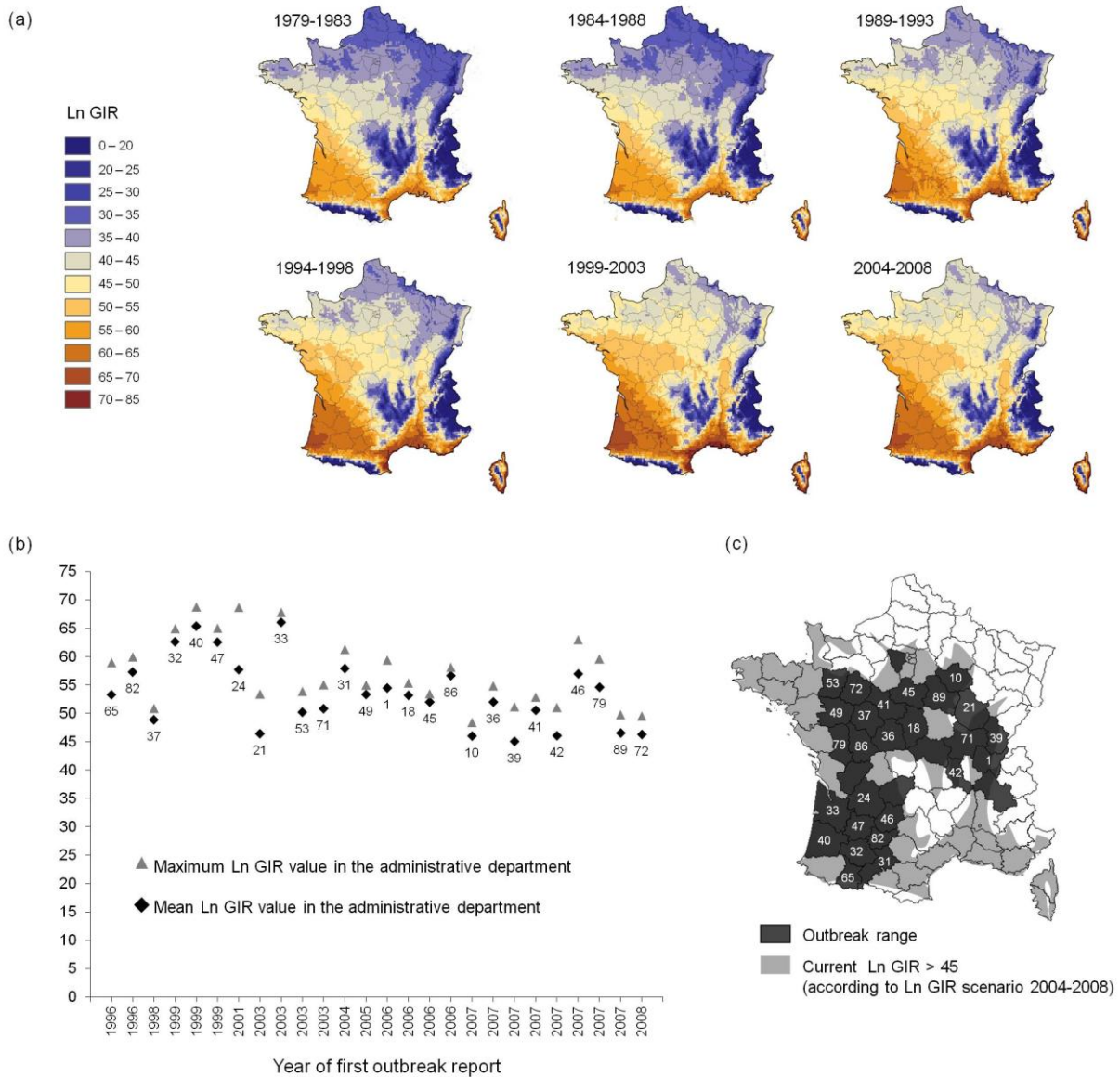
**Table 3** Regressions giving a best fit to the variation of the Global Increase Rate (GIR) index for the period 1979-2008 divided into sequential five-year periods and for the climate warming simulation. In the climate warming simulation, the stable climate scenario is based on the average GIR index for the 30-year period 1979-2008. *Abbreviations for regression equation:* Lat, latitude (in decimal degrees); Elev, elevation (m).

Scenario	Regression equation	$r^2$	F-statistic	$P <$
GIR model for the period 1979-2008 divided in sequential five-year periods				
1979-1983	$\text{Ln}(\text{GIR}_{1979-1983}) = 243.051 - 4.147 \text{ Lat} - 0.032 \text{ Elev}$	0.944	$F_{2,25} = 228.6$	0.001
1984-1988	$\text{Ln}(\text{GIR}_{1984-1988}) = 249.777 - 4.299 \text{ Lat} - 0.031 \text{ Elev}$	0.953	$F_{2,25} = 275.5$	0.001
1989-1993	$\text{Ln}(\text{GIR}_{1989-1993}) = 239.727 - 3.989 \text{ Lat} - 0.033 \text{ Elev}$	0.951	$F_{2,25} = 260.1$	0.001
1994-1998	$\text{Ln}(\text{GIR}_{1994-1998}) = 260.658 - 4.395 \text{ Lat} - 0.035 \text{ Elev}$	0.955	$F_{2,25} = 285.6$	0.001
1999-2003	$\text{Ln}(\text{GIR}_{1999-2003}) = 247.681 - 4.068 \text{ Lat} - 0.035 \text{ Elev}$	0.953	$F_{2,25} = 275.3$	0.001
2004-2008	$\text{Ln}(\text{GIR}_{2004-2008}) = 234.302 - 3.795 \text{ Lat} - 0.033 \text{ Elev}$	0.944	$F_{2,25} = 229.8$	0.001
GIR model for the climate warming simulation				
Stable climate (sc)	$\text{Ln}(\text{GIR}_{\text{sc}}) = 245.866 - 4.115 \text{ Lat} - 0.033 \text{ Elev}$	0.953	$F_{2,25} = 276.3$	0.001
sc+1°C	$\text{Ln}(\text{GIR}_{\text{sc}+1}) = 258.094 - 4.223 \text{ Lat} - 0.036 \text{ Elev}$	0.956	$F_{2,25} = 290.6$	0.001
sc+2°C	$\text{Ln}(\text{GIR}_{\text{sc}+2}) = 267.919 - 4.275 \text{ Lat} - 0.038 \text{ Elev}$	0.955	$F_{2,25} = 290.5$	0.001
sc+3°C	$\text{Ln}(\text{GIR}_{\text{sc}+3}) = 275.391 - 4.274 \text{ Lat} - 0.041 \text{ Elev}$	0.954	$F_{2,25} = 282.0$	0.001
sc+4°C	$\text{Ln}(\text{GIR}_{\text{sc}+4}) = 280.641 - 4.226 \text{ Lat} - 0.043 \text{ Elev}$	0.952	$F_{2,25} = 269.7$	0.001

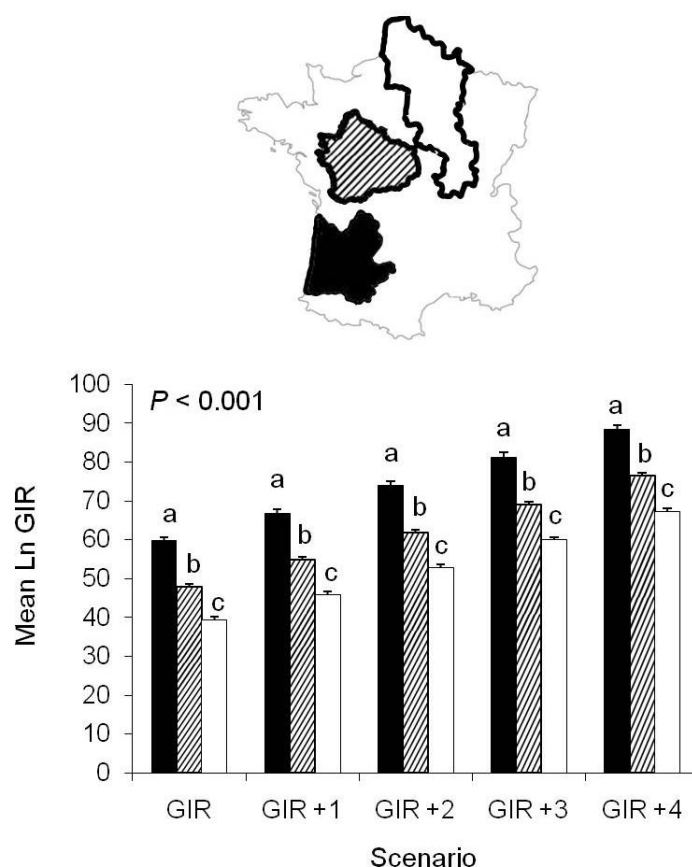
#### *Climate warming scenarios in combination with poplar stand data*

The regressions that best explain the GIR index variations for the reference stable climate (average Ln GIR for the period 1979-2008) and for each of the four scenarios of tested climate warming are summarized in Table 3. For each model, the mean GIR index differed significantly between zones (Fig. 4). The highest value was observed in south-western France and the lowest in northern France. The effect of climate warming on each poplar stand zone was highly significant ( $P < 0.001$  in each zone). With a warming of 1°C, the mean GIR index reached a value above or equal to 45 over the whole poplar area in France, even in the northern zone. This value was approximately the current

value of the central zone under a stable climate. However, a warming of 4°C was required for the northern area to reach the current values observed in the south-west. An increase of 3°C in the central zone was required to reach the value observed in the south-western zone under stable climate.



**Fig. 3** (a) Predictive model of the Global Increase Rate (GIR) index (Ln GIR) for sequential five-year periods from 1979 to 2008, based on temperature data from the 28 weather stations and the areas where the climate was suitable for aphid development. (b) Annual mean and maximum GIR index values for the year of the first outbreak report in each department (labelled by their number, see Fig. 3c for their localization). (c) Areas concerned by *Phloeomyzus passerinii* outbreaks and area corresponding to a GIR index above 45, according to the predictive GIR model of the 2004-2008 period (see Fig. 3a). Departments are delimited by black lines and labelled with their corresponding number.



**Fig. 4** Mean ( $\pm$  SE) Ln GIR (Global Increase Rate) values for each of the three areas delimiting the main poplar zones in France (Filled square: south-west, hatched square: centre, emptied square: north of France and Burgundy regions). Global warming simulations were performed by calculating the average GIR index for an elevation of the annual mean temperature of 1°C (Ln GIRsc+1), 2°C (Ln GIRsc+2), 3°C (Ln GIRsc+3) and 4°C (Ln GIRsc+4) applied to a 30-year reference climate (GIRsc: 1979-2008 period). Within a GIR scenario, significant differences between poplar zones are indicated with different letters ( $\alpha = 0.05$ , pairwise Wilcoxon rank sum test).

## Discussion

As it is often the case with emerging insect pests, there was little information about the life history traits of the woolly poplar aphid (Moharramipour et al. 2004; Rajabi-Mazhar et al. 2003, 2008; Arzone and Vidano 1984). This study provides substantial information on the biology and population dynamics of *P. passerinii*, especially on the effects of temperature on both the individual apterous parthenogenetic forms (development, survival, and fecundity) and the aphid population parameters. The aphid optimum growth temperature is generally around 22°C (Harrington et al. 1995), but it seems to be around 30°C for *P. passerinii*, which is consistent with the occurrence of this species in

the Mediterranean area (Arzone and Vidano 1984). The total nymphal development time, fecundity and population parameters of the apterous parthenogenetic stages were similar to those observed in other temperate tree-dwelling aphids (Asante et al. 1991; Collins and Leather 2001). Similarly, the developmental threshold ( $6.4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) and the development degree-days ( $171 \pm 1$ ) obtained from the laboratory experiments were comparable to those estimated for other temperate aphid species such as *Eriosoma lanigerum*, *Brevicoryne brassicae*, *Acyrtosiphon pisum*, *Tuberolachnus salignus* (Campbell et al. 1974; Asante et al. 1991; Harrington et al. 1995; Collins and Leather 2001). This experimental data is therefore in agreement with other studies on tree-dwelling and crop aphid species, making it possible to adapt the Global Increase Rate (GIR) to these species.

An approach using the temperature sensitivity of the physiology to model population growth rate can successfully show the current and expected range shift of a species (Crozier and Dwyer 2006). This study used this approach to model the emergence and dynamics of outbreaks of an aphid species originally latent in France. Incorporating host tree data could explain its current outbreak range as well as assess risks of outbreak.

The GIR incorporates multiple temperature effects on aphid population dynamics, whereas other existing models only take account of temperature-dependent development data (Ungerer et al. 1999; Lange et al. 2006; Jönsson et al. 2007). The GIR reflects the effects of climate warming both on the annual voltinism and the rate of multiplication per generation (net reproductive rate,  $R_0$ ), depending on the temperature in different localities. The experimental data did not make it possible to determine precisely the optimum temperature for development or the higher lethal temperature threshold. Consequently, the number of generations ( $G$ ) and thus the GIR may have been overestimated but this restriction is certainly negligible in the past and current GIR index (Ln GIR) projection because the daily mean temperature rarely exceeds  $30^{\circ}\text{C}$  (*P. passerinii* optimum temperature) in France. Moreover, by using a non-linear relationship between  $R_0$  and temperature in the GIR calculation, the harmful effects of higher temperatures on the population growth rate were partially included in the model parameterization. The decrease in the slope of the south-to-north gradient of the maximum GIR index from 2.2 in the 1979-1988 period to 1.8 in the 2004-2008 period indicates that the difference between extreme GIR index values tends to be less marked under global warming (Fig. 3). This reduction was mainly driven by a greater GIR index increase in the north (from Ln GIR = 30-35 before 1989 to Ln GIR = 40-45 during 2004-2008). This could be explained by the harmful effects of high temperatures on the aphid population growth rate in the south-west through its effect on  $R_0$ . It underlines the usefulness of building an index including temperature effects on both development and reproductive data.

The model was evaluated by testing the annual mean and maximum GIR index for the year of the first outbreak report in each department between 1996 and 2008 (Fig 3b). Among the departments with damaged areas, the first outbreaks occurred at an annual mean GIR index value above 45. The

risk of outbreaks would thus probably increase when the annual mean GIR index rises above 45. Consequently, the current geographical range of *P. passerinii* outbreaks (Fig. 1b) can be successfully predicted with both the current distribution of an annual mean GIR index above the threshold value of 45 (Fig. 3c) and poplar area data (Fig. 1a). There was a good congruence between the location of the three main poplar zones (Fig. 1a) and the current outbreak distribution, except for the northern part of the northern poplar zone where no outbreak has yet been recorded (Fig. 1a and 1b). The absence of outbreaks could be explained by the low annual mean GIR index encountered in this area below 45, but also by the stand composition (see below). That *P. passerinii* outbreaks could occur above a particular threshold value supports the hypothesis that climate warming influences both the emergence and the range of these outbreaks. It also confirms the usefulness of building a population dynamics model simulating the annual population growth rate of an insect species to explain its outbreak range.

The genotypic composition of poplar stands (Fig. 1a) has also certainly played a significant role in the history of outbreaks, in combination with that of global warming. The presence of *P. passerinii* populations has been reported in French poplar stands since 1939 (Maugard and Baubet 2004) but no outbreaks had been recorded before the mid-1990s (Maugard 1996) (Fig. 1b). Modelling the GIR index over the period 1979-2008 in France also revealed that *P. passerinii* population dynamics were modified by temperature only from the period 1989-1993 (Fig. 3a). No outbreak was, however, recorded in south-western France before 1996 although the GIR index had largely exceeded the threshold value of 45. This apparent contradiction can be explained by the anthropogenic redistribution of resources from the 1990s, especially the planting of poplar genotypes susceptible to *P. passerinii*. For example, the fast growing but highly susceptible genotype 'I214' has been widely used since the 1990s and has been the most commonly planted genotype since 2000, now making it the most widely distributed in the country (Paillassa 2010; Pointeau et al. pers. obs.). The intensification of silvicultural practices, the increase in stand density and the monoclonal culture of fast growing and more susceptible poplar genotypes may also have promoted *P. passerinii* outbreaks. Since the period 1989-1993, a continuous increase of GIR index values has been observed all over the country, with a northwards expansion of the area of annual mean GIR index above the threshold value of 45 (Fig. 3a). The first recorded outbreaks in France were located in the south-west, an optimal area for aphid development at this time when considering both the GIR index values (already higher than 45, Fig. 3a) and the poplar genotypes (93% of *P. x euramericana* including the most susceptible genotypes). In the central poplar zone, where aphid outbreaks are more recent, poplar stand composition is favourable (81% of *P. x euramericana* genotypes) but GIR index is much lower. Finally, the absence of damage in northern France, where there are many poplar stands, can be explained by both a GIR index below the 45 threshold value and a high proportion of *P. x interamericana*, *P. trichocarpa* and *P. deltoides*, all poplar groups considered resistant to *P.*

*passerinii* (Lapietra and Allegro 1990; Allegro et al. 1996; Sadeghi et al. 2007; Pointeau et al. pers. obs.).

These results support the hypothesis that the unusually warm worldwide temperatures of the 1990s (EEA 2004) provided an opportunity for latent populations of *P. passerinii* to reach epidemic levels. During the 1990s, other unexpected insect outbreaks were also reported for insects previously at endemic population levels, such as those of the spruce bark beetles *Dendroctonus* spp. in the North-American forests (Berg et al. 2006). Berg et al. (2006) suggested that these massive beetle outbreaks were triggered by temperature directly affecting population size through both better overwintering survival and greater maturation rate. Accelerated development rates related to increasing temperature can also allow polyvoltine species to produce additional generations leading to unprecedented outbreaks (Ayres and Lombardero 2000; Lange et al. 2006; Jönsson et al. 2009). It could, therefore, be considered that the temperature increase of the 1990s affected both voltinism and the reproductive rate of each generation of *P. passerinii*, especially as aphids are non-diapausing and fast-growing organisms with a low temperature developmental threshold (Harrington et al. 1995). However, the hypothesis of a major direct role of climate warming on insect population dynamics must be considered with caution. Climate could be also indirectly involved in outbreak occurrence and expansion by affecting host tree physiology and resistance. For example, global change experiments have already shown how plant chemical compounds such as secondary metabolites usually involved in defences against phytophagous insects, can be affected by variations in temperature, CO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> and UV light (see review in Bidart-Bouzat and Imeh-Nathaniel 2008). Moreover, in population dynamics of phytophagous insects, other biotic and abiotic factors can also be involved (Ayres and Lombardero 2000; Bale et al. 2002; Netherer and Schopf 2010; Robinet and Roques 2010).

As combining GIR model projection and poplar stand data gives a reliable prediction of current outbreak distribution (Fig. 1 and Fig. 3), the projection of climate warming scenarios in combination with poplar stand data may help to indicate possible future outbreaks, even though it is difficult to quantify them. Hence, in a climatic change perspective, this model predicts that aphid populations could increase in all parts of France. An increase of 1°C in mean temperature would raise the GIR index to the threshold value of 45 in the entire northern poplar zone (Fig. 4), and current values of GIR index in the south-west would be reached in the central and northern parts of the country for a warming of 3°C and 4°C respectively. Nonetheless, because the genotypic composition of poplar stands in the northern zone is dominated by resistant forms (*P. x interamericana* hybrids, *P. trichocarpa* and *P. deltoides*: Lapietra and Allegro 1990; Allegro et al. 1996; Sadeghi et al. 2007; Pointeau et al. pers. obs.), *P. passerinii* population levels would probably remain low.

These predictions must, however, be treated with caution. (1) Although the overestimation of the number of generations is certainly negligible in the past and current GIR model projections because the daily mean temperature rarely exceeds 30°C in France, it may affect results related to the

climate warming scenarios. (2) Climate warming simulations implied that the geographical distribution of poplar stands will remain stable in the future, but major changes in bio-geographic areas are expected for short rotation forestry (Loustau et al. 2005). However, because poplar stands already occupy the well drained humid land in France required for poplar cultivation (Fig. 1a), change in the general geographical distribution of poplar stands in relation to climate warming are unlikely in France. (3) The model did not consider the possible harmful effects of an increase in CO<sub>2</sub> atmospheric concentration. Previous studies on aphid responses to climate change have suggested that both increased temperature and CO<sub>2</sub> concentration can influence the population growth rate through a negative effect on plant nutritional quality (i.e. variation in sap amino acid concentration) (Bezemer et al. 1998, 1999; Newman 2003; Newman et al. 2003; Hullé et al. 2010). However, this would affect sap feeding aphids rather than *P. passerinii* which feed on cortex (Arzone and Vidano 1984, Pointeau et al. pers. obs.). (4) It was assumed that there was no limitation on the aphid population growth rate, in particular from natural enemies and competitors. However, the GIR model, combined with poplar stand data, successfully predicted the current range of *P. passerinii* damage, suggesting that these regulating factors do not currently play a major role in the population dynamics of this insect, but their role in future climate warming conditions may change (5) The carrying capacity was not considered but the large areas of monoclonal poplar plantations are probably not a limiting factor for *P. passerinii* population growth. (6) Finally, this laboratory study used one single aphid clone. The various populations distributed throughout France may have different biological performances and aggressiveness in relation to their local habitat conditions. Genetic analyses combined with a biological study of these populations would help to determine whether outbreak emergence and expansion are due to one or several clones. The genetic identification of the clone used in this study and the knowledge of its distribution in France will make it possible to assess whether the GIR model produces overestimates or underestimates.

This study produced three main results. 1. The approach combining physiology, population dynamics and host tree data provided reliable prediction of past outbreaks and the current outbreak range of *P. passerinii*. The study underlines that the current outbreak range of the aphid is mainly driven by temperature, in combination with the distribution of poplar stands, while past outbreak history could be explained by the recent climate warming occurring since the 1990s in combination with the genotypic composition of poplar stands. The demonstration of a threshold risk for outbreak triggering (threshold GIR index value above 45), makes the GIR model a useful tool for assessing the risks incurred by poplar stands at local scale, thus providing a starting point for the implementation of an effective forest management program to deal with the pest. Because the composition of poplar stands plays a role in curbing the increase of aphid populations, forest management should be driven towards more diversified poplar stands. 2. The model can easily be used with existing data and constitutes a basic structure that can be adapted to more complex aphid life cycles, for example those

alternating sexual and parthenogenetic stages affected by temperature in different ways. 3, Additional information is provided on the little known population dynamics of *P. passerinii*, a major emergent poplar pest and the only species in the sub-family Phloeomyzinae (Arzone and Vidano 1984).

In a broad ecological perspective, aphids may be key agents of forest disturbance because they are very sensitive organisms, likely to respond quickly to climate warming. As in the case of the woolly poplar aphid, other tree-dwelling species that are not current forest pests can be expected to become serious pests in the future.

**Acknowledgments** This study was supported by a grant from the French Ministry of Agriculture, Food, and Fisheries. We would like to thank Sylvain Pincebourde (IRBI, University of Tours) for his valuable comments and suggestions. We are grateful to Alain Guichard (LBLGC, University of Orléans) and Francis Goussard (INRA Orléans) for their technical support. We also would like to thank Eric Paillassa (Institute for Forestry Development, IDF) and Olivier Baubet (Forest Health Department, DSF, French Ministry of Agriculture, Food, and Fisheries) for their assistance.

**Electronic Supplemental Material (ESM)**

**Appendix 1** Characteristics of the French departments used in the model evaluation (Fig. 2b).

Year of first outbreak report	No. of department	Name of department	Mean Ln GIR value	Maximum Ln GIR value
1996	65	Hautes-Pyrénées	53.3	59.0
1996	82	Tarn-et-Garonne	57.3	60.0
1998	37	Indre-et-Loire	48.9	50.9
1999	32	Gers	62.7	65.0
1999	40	Landes	65.4	68.8
1999	47	Lot-et-Garonne	62.6	65.0
2001	24	Dordogne	57.7	68.7
2003	21	Côte-d'Or	46.4	53.4
2003	33	Gironde	66.1	67.8
2003	53	Mayenne	50.2	53.9
2003	71	Saône-et-Loire	50.9	55.1
2004	31	Haute-Garonne	57.9	61.3
2005	49	Maine-et-Loire	53.4	55.0
2006	1	Ain	54.5	59.4
2006	18	Cher	53.2	55.4
2006	45	Loiret	52.0	53.4
2006	86	Vienne	56.7	58.1
2007	10	Aube	46.0	48.4
2007	36	Indre	52.0	54.9
2007	39	Jura	45.1	51.2
2007	41	Loir-et-Cher	50.6	52.9
2007	42	Loire	46.1	51.0
2007	46	Lot	57.0	63.0
2007	79	Deux-sèvres	54.6	59.6
2007	89	Yonne	46.6	49.8
2008	72	Sarthe	46.3	49.5

### 3. ETUDE GENETIQUE DES POPULATIONS DE *P. PASSERINII*

Comme nous l'avons indiqué en première partie de ce chapitre, les modifications climatiques récentes et les pratiques sylvicoles ont joué un rôle important dans l'émergence et l'expansion du problème de puceron lanigère en France. Bien que ces résultats suggèrent l'implication de populations latentes favorisées par les modifications environnementales, ils ne nous donnaient pas d'indications sur l'origine des populations impliquées ni sur l'étendue des relations entre les différents foyers d'infestations, d'autant plus que la capacité de dispersion du puceron lanigère n'est pas connue. Un certain niveau d'isolement des populations issues des différentes régions populières conduirait à une différenciation génétique des populations de pucerons, tandis que des échanges entre foyers d'infestation dus à la dispersion naturelle ou anthropique du puceron conduiraient à une faible structure des populations. Dans un contexte de réchauffement climatique, on peut même faire l'hypothèse que les populations des régions plus au nord (Bourgogne, Centre, Pays de la Loire...) seraient issues de la colonisation et de l'installation de populations (ou de clones particuliers) du Sud-Ouest, une des premières régions infestées. Une étude génétique était donc nécessaire pour inférer l'histoire évolutive des populations du puceron lanigère, identifier leur origine géographique et identifier les populations impliquées dans l'émergence et l'expansion des pullulations. Dans le cadre de cette thèse, il s'agissait d'une part de connaître l'étendue de la diversité génétique des populations de *P. passerinii* à l'échelle de la France, puis de mesurer le niveau de différenciation génétique des populations, notamment entre les régions populières. D'autre part, il semblait aussi important de connaître les liens génétiques entre les populations françaises et certaines populations italiennes et espagnoles ; pays limitrophes du sud de la France dans lesquels les dates d'infestations sont antérieures (Della Beffa 1936 ; Aparisi 1971). Ces informations nous seront utiles pour le développement d'une stratégie de gestion efficace du ravageur.

Pour réaliser notre étude de génétique des populations, nous avons entamé, au début de la thèse en octobre 2007, une campagne d'échantillonnage en collaboration avec le Département Santé des Forêts (DSF), l'Office National des Forêts (ONF), le Centre Régional de la Propriété Forestière (CRPF) et l'Institut pour le Développement Forestier (IDF). Les correspondants observateurs du DSF étaient chargés de récolter, sur un des arbres présents dans des parcelles suivies régulièrement, des morceaux d'écorce présentant des pucerons. Un collaborateur italien, Giani Allegro, et un espagnol, Nicolas Pérez Hidalgo, nous ont permis de disposer également d'échantillons de leurs pays respectifs. Les récoltes étaient faites à hauteur d'homme, ou parfois au niveau du sol sur les racines superficielles ou la base du tronc, sur divers génotypes de peuplier, mais la majorité était l'eura-méricain 'I214' puisque c'est le principal génotype attaqué (cf. Tableau 1 de l'article 6). Cette campagne d'échantillonnage nous a permis d'obtenir des individus issus de 35 localités qui sont incluses dans les



### 3.1. Choix des marqueurs génétiques moléculaires

Un marqueur génétique est un caractère mesurable qui permet de révéler un polymorphisme. Le niveau de polymorphisme permet de détecter avec une précision plus ou moins fine des variations génétiques, d'estimer leurs fréquences et de suivre leur évolution pour comprendre les liens génétiques entre populations.

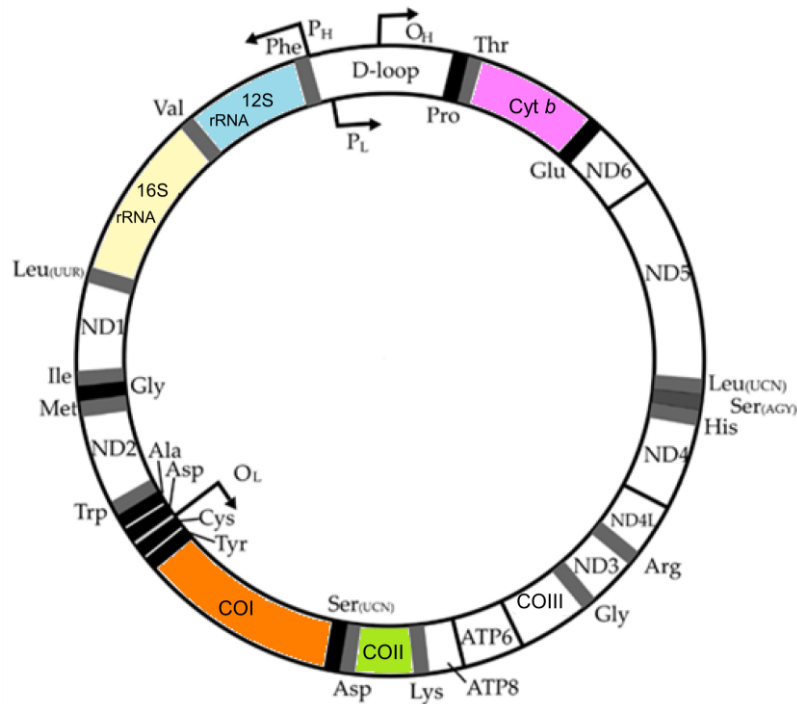
Les avancées technologiques des vingt dernières années permettent de disposer à l'heure actuelle de nombreux marqueurs génétiques moléculaires, c'est-à-dire mesurable au niveau de l'ADN (Loxdale & Lushai 1998 ; Sunnucks 2000). Chaque marqueur moléculaire présente des avantages et des inconvénients et le choix des marqueurs à utiliser est une étape cruciale qui dépend de la question génétique à traiter et du type d'organisme à étudier (organismes à reproduction sexuée ou clonale). Le niveau de sensibilité d'un marqueur moléculaire est une caractéristique importante à prendre en considération puisque celui-ci doit être suffisamment variable pour détecter de la variabilité génétique mais pas trop variable pour révéler les liens génétiques entre individus ou pour éviter les phénomènes d'homoplasie<sup>25</sup> (Hewitt 1996 ; Sunnucks 2000). En effet, les fragments d'ADN utilisés peuvent avoir des taux d'évolution différents (Navajas 1998), ce qui les rend plus ou moins informatifs.

Certains marqueurs moléculaires correspondent à des fragments d'ADN provenant du génome d'organites endosymbiotiques tel que le génome des mitochondries. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est circulaire et possède une organisation simple, c'est-à-dire sans intron dans les séquences codantes. Il est transmis maternellement (hérédité non mendélienne) sans recombinaison préalable. Cette hérédité de type maternel permet de suivre séparément le flux génique maternel du flux paternel. Les génomes mitochondriaux animaux sont typiquement constitués d'une succession de 37 gènes qui codent pour des ARN ribosomiaux, des ARN de transfert et des protéines impliquées dans la respiration (e.g. cytochrome oxydase), la réplication d'ADN, la transcription et la traduction (Fig. IV.2). Les mitochondries n'ont pas ce système de réparation de l'ADN. Par conséquent, le taux de mutation de l'ADNmt est plus élevé que celui du génome nucléaire. Toutefois, ce taux est variable selon les régions (Hewitt 2001). En effet, l'ADNmt possède des zones à taux d'évolution rapide, tandis que d'autres sont bien conservées, permettant la définition d'amorces universelles qui rendent possible son utilisation chez de très nombreuses espèces d'insecte (e.g. les gènes codant pour la cytochrome oxydase I et II, Fig. IV.2). Chez les pucerons, le polymorphisme de séquence des gènes mitochondriaux est généralement utilisé pour résoudre des questions d'ordre phylogénétique. Les marqueurs mitochondriaux ont notamment permis d'élucider les relations au sein des tribus d'Aphididae et de comprendre l'évolution du changement d'hôtes (von Dohlen & Moran 2000), et de

---

<sup>25</sup> Homoplasie : risque d'observer deux allèles identiques résultant d'histoires mutationnelles différentes

révéler des complexes d'espèces comme au sein de l'espèce *Schizaphis graminum* (Rondani) (Shufran et al. 2000). Les gènes mitochondriaux sont de manière générale peu utilisés pour étudier la structure génétique et le système de reproduction chez les pucerons en raison de leur faible variabilité et de leur mode d'héritabilité identique chez les lignées sexuées et asexuées (Simon et al. 1995 ; Hales et al. 1997). Néanmoins, leur utilisation au niveau intraspécifique, en tant qu'analyse préliminaire, peut révéler une certaine variabilité due à l'existence d'haplotypes<sup>26</sup> différents.



**Fig. IV.2** Représentation schématique de l'ensemble des gènes et régions constituant le génome mitochondrial : 12S et 16S rRNA, ARN ribosomiaux ; ND1 à ND6, sous-unités 1 à 6 de la NADH déshydrogénase ; *cyt b*, cytochrome *b* ; COI à COIII, sous-unités de la cytochrome *c* oxydase ; ATP6 et ATP8, sous-unités de l'ATP synthétase ; les ARN de transfert (ARNt) sont indiqués par le code de l'acide aminé correspondant. Les gènes indiqués par un code couleur sont les plus utilisés dans les études de génétique chez les insectes.

Les loci<sup>27</sup> microsatellites (ou STR 'Short Tandem Repeats' ou encore SSR 'Simple Sequence Repeats') sont des régions non codantes du génome nucléaire, et donc peu conservées et très variables. Les microsatellites sont très utilisés comme marqueurs moléculaires de part leur simplicité et leur grande répétition dans les génomes des eucaryotes ainsi que dans certains procaryotes (Estoup & Angers 1998 ; Tóth et al. 2000). Ce sont des fragments d'ADN composés de motifs simples de 2 à 6

<sup>26</sup> Haplotype : variant mitochondrial

<sup>27</sup> Locus (loci au pluriel) : emplacement précis d'un gène sur le chromosome qui le porte

nucléotides répétés en tandem jusqu'à plusieurs dizaines de fois. Les motifs les plus utilisés sont les di-, les tri- et les tétra-nucléotides. Ils sont caractérisés par un polymorphisme extrêmement élevé du fait de leur taux de mutation important (Estoup & Angers 1998). Il est généralement accepté que le premier mécanisme d'évolution des microsatellites est un glissement de l'enzyme polymérase lors de la réplication de l'ADN (Levinson & Gutman 1987 ; revu par Jarne & Lagoda 1996). Ce « bégaiement » induit des erreurs se manifestant le plus souvent par un ajout ou une soustraction d'un motif microsatellite. Ainsi, les allèles, c'est-à-dire les différentes formes d'un marqueur microsatellite, correspondent au nombre de répétitions du motif donné. Le polymorphisme des marqueurs microsatellites ne réside donc pas dans la séquence proprement dite mais dans le nombre d'unités de répétition (Fig. IV.3). Afin de déterminer le nombre de répétitions à un locus donné, il faut spécifiquement amplifier le microsatellite par réaction en chaîne par polymérase (ou PCR '*Polymerase Chain Reaction*'). Si un microsatellite n'est pas spécifique d'un locus, les régions flanquantes le sont. Une paire d'amorces spécifiques de ces régions flanquantes amplifiera donc ce seul microsatellite (Fig. IV.3). Les variations de longueur des fragments amplifiés ne diffèrent que de quelques bases. Par conséquent, la révélation du polymorphisme des microsatellites doit s'effectuer par électrophorèse sur gel très résolutif ou par détection de fluorescence sur séquenceur automatique. En résumé, le locus microsatellite se définit par un couple d'amorces PCR qui amplifie une région unique du génome contenant un motif répété.



**Fig. IV.3** Exemple représentant la variabilité entre deux individus pour un même locus microsatellite.

Les marqueurs microsatellites sont généralement neutres, c'est-à-dire non soumis aux pressions de sélection de l'environnement. Ainsi, quel que soit l'allèle<sup>28</sup> présent au locus marqueur, la valeur sélective de l'individu est la même. Ce sont des marqueurs multialléliques à hérédité mendélienne, utiles pour établir les relations de pedigree entre individus. Ils ont l'avantage d'être codominants, ce qui signifie qu'il est possible de révéler les deux copies de chaque locus microsatellite présentes sur les paires de chromosomes homologues dans les génomes diploïdes. Il est donc possible de distinguer

<sup>28</sup> Allèle : différentes formes que peut prendre un gène sur les chromosomes homologues.

les hétérozygotes et de connaître les génotypes des individus pour plusieurs loci analysés ; ce qui permet d'inférer les événements de recombinaison et les relations entre génotypes. Compte tenu de ces caractéristiques, les microsatellites sont des marqueurs de choix pour étudier la structure génétique des populations d'insectes et estimer les flux de gènes (Sunnucks 2000 ; Behura 2006). Appliqués aux études de génétique des populations de pucerons, ils permettent notamment de tester les hypothèses sur l'évolution du mode de reproduction des pucerons (Simon et al. 2002 ; Halkett et al. 2005) ou sur la spécialisation à la plante hôte (i.e. formation de race et la place de l'hôte dans les phénomènes de spéciation) (Sunnucks et al. 1997 ; Simon et al. 2003 ; Miller et al. 2005).

Les microsatellites ont ainsi été choisis dans la présente étude pour analyser la variabilité génétique ainsi que la structure génétique des populations de *P. passerinii*. Au commencement de cette thèse, il n'existait pas de marqueurs microsatellites disponibles pour étudier l'espèce *P. passerinii*. Certains loci microsatellites s'avèrent utilisables au-delà des limites de l'espèce au sein d'un même genre (Haak et al. 2000). Toutefois, *P. passerinii* est l'unique espèce décrite du genre *Phloeomyzus*, par conséquent nous ne disposons pas non plus de loci microsatellites provenant d'espèces proches. L'étude génétique de *P. passerinii* a donc commencé par la caractérisation d'un ensemble de loci microsatellites polymorphes pour ensuite étudier la variabilité et le niveau de différenciation génétique entre les populations de puceron.

### 3.2. Caractérisation de loci microsatellites chez *P. passerinii*

#### ❖ Présentation de l'article n°5 et principaux résultats

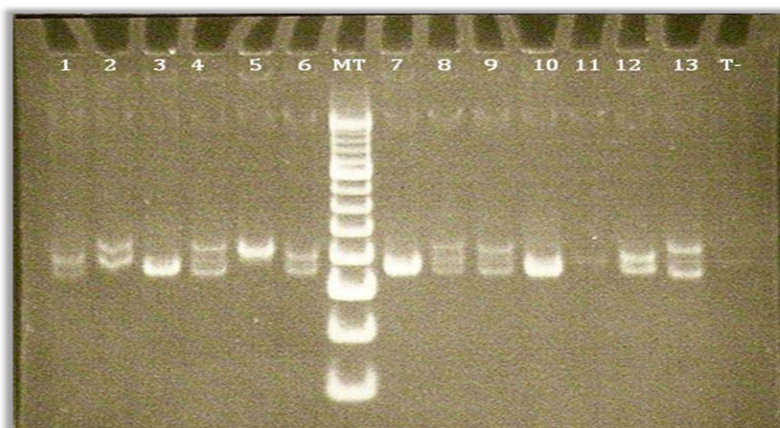
Le développement de marqueurs microsatellites repose sur deux étapes essentielles : (i) l'isolement et la conception d'amorces spécifiques et (ii) la recherche du polymorphisme.

L'isolement de loci microsatellites passe classiquement par les étapes : d'enrichissement initial pour créer une banque de fragments courts ( $\approx 500$  pb) d'ADN génomique, de récupération de l'ADN enrichi par PCR, de clonage de l'ADN enrichi récupéré et de séquençage des clones positifs. Compte tenu du caractère chronophage et coûteux de cette technique et de son faible rendement, une nouvelle méthode d'isolement de marqueurs microsatellites haut débit, maintenant disponible sur la plateforme Genoscreen (Lille, France) a été développée (Malausa et al. 2011). Cette méthode d'isolement est basée sur la création d'une banque enrichie en motifs microsatellitaires en utilisant des sondes microsatellites multiplexées et l'utilisation d'une technologie de séquençage haut débit nouvelle génération sur la plateforme de pyroséquençage 454 GS-FLX Titanium. Le logiciel iQDD (Meglécz 2010) permet ensuite de trier la grande quantité de séquences obtenues, de détecter les microsatellites

et enfin de concevoir les amorces. Compte tenu de la fiabilité et du fort rendement de cette procédure, même pour des espèces qui posaient problème avec les méthodes traditionnelles, un projet national d'isolement de marqueurs microsatellites de haute qualité pour une large gamme d'organismes non-modèles a été développé dès 2009. Ce projet 'AIP BioRessources EcoMicro' a regroupé 33 laboratoires [INRA, CNRS, USDA, Université de Montpellier 2, Université de Provence, Université de Toulouse, Université d'Orléans, Université Libre de Bruxelles, Université catholique de Louvain et Muséum d'Histoire Naturelle] et concerne environ 70 espèces d'origines taxonomiques variées dont *P. passerinii*. L'isolement des microsatellites chez *P. passerinii* a donc été réalisé à la plateforme Genoscreen de Lille sur un pool de femelles parthénogénétiques issues de six localités en Europe (France, Italie et Espagne). L'utilisation de cette technique à haut débit a permis d'isoler 619 marqueurs microsatellites chez *P. passerinii*, dont 462 motifs parfaits (i.e. constitués d'un seul motif répété à l'identique, cf. Fig. IV.3) et 157 motifs composés (i.e. constitués de plusieurs motifs répétés et imbriqués, e.g. (CA)<sub>5</sub>(GA)<sub>5</sub>).

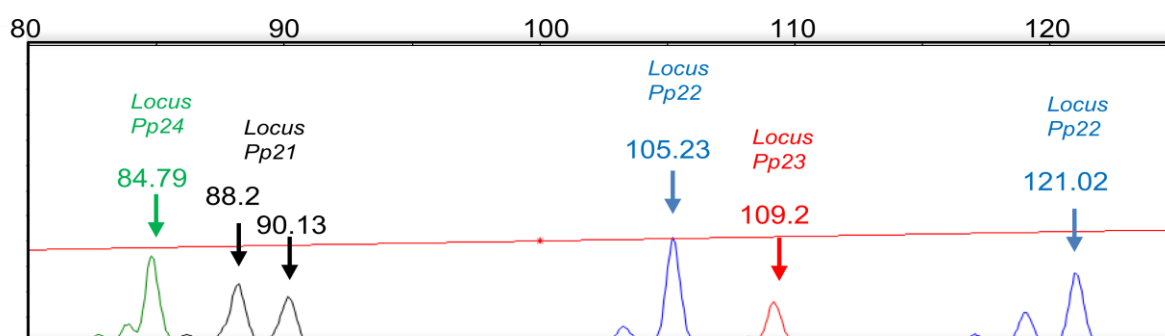
La recherche du polymorphisme a été réalisée au LBLGC uniquement sur les motifs microsatellites parfaits comme conseillé par Megléczy et al. (2010). Compte tenu du nombre important de loci, nous nous sommes basés sur un ensemble de critères pour sélectionner un nombre raisonnable de loci microsatellites à tester. Notons que notre choix s'est porté sur les motifs di- et tri-nucléotides comportant plus de six répétitions. Des détails supplémentaires sont apportés dans le paragraphe matériels et méthodes de l'article n°5. Nous avons ainsi sélectionné un total de 44 loci microsatellites dont 35 dinucléotides et neuf trinucleotides. Les fragments d'ADN contenant les microsatellites ont ensuite été amplifiés par PCR. De nombreuses expériences préliminaires effectuées avec des amorces non modifiées par fluorescence ont d'abord consisté à optimiser les conditions PCR pour chacun des loci. Une première évaluation du polymorphisme a été réalisée en faisant migrer les produits PCR de 35 individus provenant de localités différentes (27 localités françaises, 6 localités espagnoles et 2 localités italiennes) (Fig. IV.1) dans un gel de polyacrylamide 8 % [1.25 ml acrylamide, 12.5 µl TEMED, 50 µl persulfate d'ammonium 10 %, 1 ml TBE 5x, 4 ml H<sub>2</sub>O] plongé dans un tampon TBE 1x permettant la séparation des différents allèles. Après migration, les gels étaient plongés dans un bain de bromure d'éthidium (BET) puis visualisés sur une table UV équipée d'une caméra. La taille des fragments amplifiés était contrôlée à l'aide d'un marqueur de taille O'RangeRuler™ 20 bp DNA (Fermentas) (Fig. IV.4). Le but de ces expériences préliminaires était d'éviter de faire synthétiser directement une modification par fluorescence sur l'amorce forward de chacun des 44 couples d'amorces, ce qui aurait été relativement coûteux. Ces expériences ont permis de mettre en évidence 12 loci microsatellites d'intérêts [*Pp4*, *Pp14*, *Pp20*, *Pp21*, *Pp22*, *Pp23*, *Pp24*, *Pp25*, *Pp26*, *Pp27*, *Pp28*, *Pp29*]. Les amorces forward de chacun de ces 12 loci ont été synthétisées avec une

modification par fluorescence en position 5' de l'amorce 6-FAM (bleu), VIC (vert), NED (jaune) ou PET (rouge) (Applied Biosystems).



**Fig. IV.4** Migration pour un même locus microsatellite de 13 individus sur gel de polyacrylamide. MT : marqueur de taille, T- : témoin négatif.

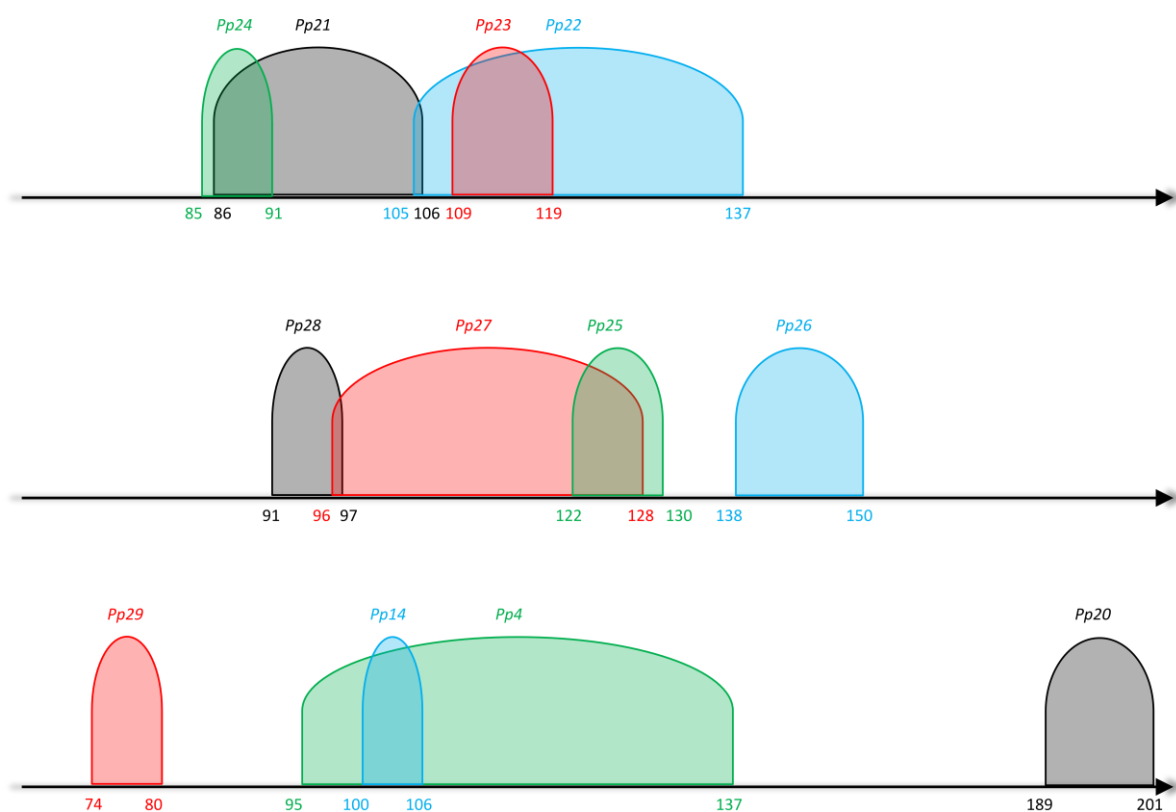
Les 12 loci microsatellites d'intérêts (i.e. 10 avec motifs dinucléotides et 2 avec motifs trinucleotides) ont été testés pour les 35 individus avec les amorces fluorescentes de manière à déterminer finement la taille des allèles et nous donner une idée de la variabilité de ces marqueurs pour nos futures études de structure génétique des populations en France. Les PCRs ont été réalisées de manière indépendante en utilisant à chaque fois 20 % d'amorces forward marquées par fluorescence. Les produits d'amplification étaient déposés sur microplaque en multiplexage [i.e., 4 produits PCR de fluorescence différente dans un même puits contenant également 9.6  $\mu$ l de formamide et 0.4  $\mu$ l de marqueurs de taille standard GenScan<sup>TM</sup>-500LIZ<sup>®</sup> (Applied Biosystems)] pour être détectés sur séquenceur automatique ABI 3100. La taille des allèles a été déterminée à l'aide du logiciel Peak Scanner<sup>TM</sup> v1.0 (Applied Biosystems) (Fig. IV.5).



**Fig. IV.5** Exemple d'analyse des pics de fluorescence à l'aide du logiciel PeakScanner<sup>TM</sup> v1.0 pour un individu à quatre loci microsatellites différents. Chaque locus voit ses allèles représentés par des pics de fluorescence d'une couleur donnée. L'individu analysé est donc homozygote aux loci *Pp23* et *Pp24* et hétérozygote aux loci *Pp21* et *Pp22*.

Le nombre d'allèles par locus variait de 2 à 10 allèles avec des gammes de taille variables selon les loci (Fig. IV.6) et l'hétérozygotie observée variait de 0,080 à 0,680. Sur les 35 individus

analysés, 25 génotypes multilocus (MultiLocus Genotypes ou MLGs) ont été identifiés, soulignant l'importance de la diversité génétique chez cette espèce. Ainsi la caractérisation de ces marqueurs a permis d'obtenir un outil puissant pour étudier la structure génétique des populations chez *P. passerinii* à l'échelle de la France.



**Fig. IV.6** Représentation schématique des valeurs minimales et maximales des allèles (en pb) pour chacun des 12 loci microsatellites utilisés. Les 12 loci sont analysés en multiplexage par groupe de quatre loci auxquels sont associés quatre fluorescences différentes [6-FAM (bleu), VIC (vert), NED (jaune, ici en noir pour une meilleure lisibilité) ou PET (rouge)].



ARTICLE N°5

Characterization of twelve microsatellite loci in the woolly  
poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Hemiptera :  
Aphididae : Phloeomyzinae)

**Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources**

**Database 1 October 2011 – 30 November 2011**

Pointeau S, Martin C, De Feraudy D, Lieutier F & Bankhead-Dronnet S

*Molecular Ecology Resources*, **12**, 374-376 (2012)

## Résumé

Cette étude fait un compte rendu des premiers marqueurs microsatellites disponibles chez l'espèce *Phloeomyzus passerinii*, seul représentant des Phloeomyzinae (Hemiptera: Aphididae). Ce puceron est un ravageur émergent dans les peupleraies du sud de l'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. L'isolement de 462 loci microsatellites a été réalisé en utilisant un protocole d'enrichissement biotine et un séquençage nouvelle génération sur la plateforme de pyroséquençage 454GS-FLX Titanium. Nous avons testé 44 marqueurs microsatellites (35 dinucléotides et 9 trinucloéotides) parmi lesquels 12 loci étaient polymorphes. Le niveau de diversité génétique a été évalué sur 35 individus parthénogénétiques collectés dans différentes localités de France, d'Espagne et d'Italie où les pullulations de ce puceron sont communes. Sur les 35 individus analysés, 25 génotypes multilocus ont été trouvés. Le nombre d'allèles varie de 2 à 10 par locus et l'hétérozygotie observée varie de 0.080 à 0.680 en utilisant un individu par génotype multilocus. Ces 12 loci pourraient être utiles dans le traitement de questions se rapportant à la structure génétique et la reproduction de *P. passerinii*.

## Characterization of twelve microsatellite loci in the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Hemiptera : Aphididae : Phloeomyzinae)

Sophie Pointeau, Carine Martin, David De Feraudy, François Lieutier & Stéphanie Bankhead-Dronnet

UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres, BP 6759, FR-45067 Orléans Cedex, France.

### Abstract

This study reports on the first microsatellite markers available for the species *Phloeomyzus passerinii*, the only species in the Phloeomyzinae (Hemiptera: Aphididae). This aphid is an emerging pest in poplar stands through southern Europe, North Africa and the Near East. Isolation of 462 microsatellite DNA loci was performed using biotin-enrichment protocol and new generation 454GS-FLX Titanium pyrosequencing. We tested 44 microsatellite markers (thirty-five dinucleotides and nine trinucleotides) among which 12 loci were polymorphic. The level of genetic diversity was assessed on 35 parthenogenetic individuals collected in different localities from France, Spain and Italy where aphid outbreaks are common. Out of the 35 individuals analysed, 25 multilocus genotypes were found. The number of alleles ranged from 2 to 10 per locus and the observed heterozygosities from 0.080 to 0.680 using one individual per multilocus genotype. These 12 loci might be of interest in addressing questions dealing with population genetic structure and reproduction of *P. passerinii*.

**Keywords** Tree-dwelling aphid · poplar pest · microsatellites · genetic diversity · *Phloeomyzus passerinii*

**Running title** Twelve microsatellite DNA loci characterized in *Phloeomyzus passerinii*

## Introduction

The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Hemiptera: Aphididae: Phloeomyzinae) is a tree-dwelling aphid that feeds in bark crevices of the trunk of *Populus* spp. Colonies are easy to pick out thanks to the white wax secreted by aphid individuals. While it is endemic of the Palaearctic area where levels of populations are usually low with a negligible impact on host trees (Blackman & Eastop 1994), *P. passerinii* has become an emerging pest in poplar stands causing important economic damage to southern Europe, North Africa and the Near East (Arzone & Vidano 1984; Blackman & Eastop 1994; Sadeghi et al. 2007). First severe outbreaks were recorded in Italy in the 1930s (Della Beffa 1936), in Spain in the 1940s (Aparisi 1971), and in south-western France in the mid-1990s (Maugard 1996). Parthenogenetic reproduction ensures many rapid, successive generations that lead to reduction in tree growth or even massive mortalities in poplar stands (Della Beffa 1936; Arzone & Vidano 1984). In recent years, severe outbreaks have become more frequent in the already known infested French departments, but always in poplar stands spared until then. Moreover, numerous newly-infested departments were also recorded northwards (Baubet and Carouille 2009). Preliminary studies suggested that outbreaks of local populations may have been enhanced by host plant availability and susceptibility as well as by the warming up since the mid-1990s (Pointeau et al 2011, Pointeau et al in prep.). Nevertheless, it is also likely that the northward populations may come from southern populations. Thus, a population genetic study will help us to assess these hypotheses. Likewise, to date the investment in sexual reproduction is not known within this species, of which only the alatae are sexuales, while it allows genetic intermingling between aphid lineages. To probe the genetic structure and the genetic contribution of both types of reproduction in *P. passerinii*, we need to develop sufficiently polymorphic genetic markers. Compared with other genetic markers showing little genetic variation, in particular in clonal aphid lineages (Simon et al. 1999), microsatellite loci have great potential for answering our questions and for providing such a sensitive tool for *P. passerinii*.

## Materials and methods

Microsatellite loci were isolated at Genoscreen (Lille, France) from one pooled sample of apterous parthenogenetic individuals from six different European localities, following a protocol based on the 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of microsatellite-enriched DNA library (Malauzu et al. 2011). The enrichment was performed using eight biotin-labelled oligonucleotides [(AG)<sub>10</sub>, (AC)<sub>10</sub>, (AAC)<sub>8</sub>, (AGG)<sub>8</sub>, (ACG)<sub>8</sub>, (AAG)<sub>8</sub>, (ACAT)<sub>6</sub>, (ATCT)<sub>6</sub>]. Screened motifs were chosen on the basis of microsatellite motif frequencies in 12 insect and vertebrate species for which genomes are published

(Martin et al. 2010). Primers corresponding to adapters were used to amplify the resulting enriched DNA. The enrichment and GS-FLX 454 Titanium were performed by Genoscreen (Lille, France). The open access program iQDD was used to sort and select the resulting sequences (Megléczy et al. 2010). A total of 462 sequences of at least 80 bp contained only perfect microsatellite motifs with a minimum of four repeats displaying flanking regions without tandem-repetitions.

A set of 44 loci was selected according to the following criteria: (i) di- and tri-nucleotide targeted motifs (ii) more than six repeats, (iii) annealing temperatures between 50 and 60 and, (iv) sizes of amplification products between 80 and 300 bp. For the 35 dinucleotides and 9 trinucleotides retained, polymorphism was assessed in separate polymerase chain reactions (PCRs) on 35 individuals collected in different localities through France (27 localities), Spain (6 localities) and Italy (2 localities). Genomic DNA was extracted from single apterous parthenogenetic individuals using the GenElute™ Mammalian Genomic DNA Kit (Sigma) and was eluted in 100 µl of the elution buffer provided in the kit. Amplifications were carried out using the GoTaq® Flexi DNA Polymerase package (Promega). The total reaction volume was 10 µl containing: 1 µl of genomic DNA (≈ 10 ng), 0.4 µM each primer, 200 µM each dNTP, 2 µl of 5x Mg<sup>++</sup> free Green GoTaq® Flexi buffer, 0.6 U of *Taq* DNA. MgCl<sub>2</sub> concentrations were optimized for each microsatellite locus (Table 1). PCR were performed using a MJ Research PTC-100 Thermal Cycler with the following cycling conditions: one denaturation step at 94 °C for 2 min followed by 30 cycles with denaturation step at 94 °C for 20 s, 20 s at the optimised locus-specific annealing temperature (Table 1) and an elongation step at 72 °C for 30 s; then a final elongation step at 72 °C for 5 min. Out of the 44 loci tested, 35 showed clean amplifications (i.e. single bands without smears or additional bands) and 12 showed variability on an 8 % thin polyacrylamide electrophoresis gel stained with ethidium bromide. For the 12 loci showing variability, forward primer was 5' end-labelled with a fluorescent dye, either 6-FAM, VIC, NED or PET (Applied Biosystems). Twenty percent of 5' end-labelled primer was used to perform the PCRs on the 35 aphid individuals. The amplified products were detected on an ABI-3100 automatic sequencer using GenScan™-500LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). Sizes of alleles were estimated using the Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems).

## Results and discussion

All the 35 individuals were successfully amplified at the 12 polymorphic loci. Two to 10 alleles were found per locus and the frequency of the most common ones, calculated with Genetix v4.05.2, varied from 0.31 to 0.94. As it has been observed in other aphids, the microsatellite loci exhibited a high sensitivity because they allow detecting a high number of multilocus genotypes (MLGs) (Sunnucks et al. 1997; Simon et al. 2001). Indeed, 25 different MLGs were found among the 35 parthenogenetic

individuals analysed. Since the two most common genotypes were represented six and five times in the sample, while the remaining genotypes were present no more than two times, this may affect standard population genetic analyses by the inclusion of these clonal copies of MLGs (Sunnucks et al. 1997). Therefore, analyses were carried out using all individuals, as well as including one individual per MLG. When all 35 individuals were considered, observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosities ranged from 0.114 to 0.771 and from 0.109 to 0.788 respectively (data not shown). In one individual-per-genotype data,  $H_O$  ranged from 0.080 to 0.680 and  $H_E$  from 0.150 to 0.801 (Table 1). No loci showed evidence for null alleles using Micro-checker v2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004). Finally, when all individual aphids were analyzed, there were no significant linkage disequilibria for forty-one tests out of sixty-six after applying Bonferroni correction to account for multiple comparisons, as tested in GENEPOP software (Raymond & Rousset 1995). Nevertheless, when LD was investigated in one individual per MLG, no linkage disequilibria was recorded. The sequence of the twelve microsatellite loci have been deposited in Genbank (see Table 1 for their accession numbers). This set of polymorphic markers should be useful to analyse population genetic structure and to infer the relative importance of asexual vs sexual reproduction in *P. passerinii*.

**Acknowledgments** This work is a part of the PhD thesis of S. Pointeau carried out under the directorship and supervision of F. Lieutier with the participation of S. Bankhead-Dronnet as a co-supervisor. It was supported by grants from the French Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et de la Pêche and the French Ministère de la Recherche et de l'éducation. Financial support for isolation of microsatellites was provided by the French Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AIP BioRessources EcoMicro. We are grateful to J-C. Simon (INRA-Rennes), T Malausa (INRA-Sophia-Antipolis) and J-F Martin (SupAgro Montpellier) for scientific guidance. Aphid sampling in this study was performed by the French Département de la Santé des Forêts (DSF) and the French Institut pour le Développement Forestier (IDF). We thank E. Magnoux (INRA-Orléans) for her help with the ABI-3100 automatic sequencer.

**Table 1** Primer sequences and polymorphism for 12 microsatellite DNA loci isolated from *Phloeomyzus passerinii*. Each locus was successfully genotyped for 35 parthenogenetic individuals from France, Italy and Spain. [5'Dye: fluorescent forward end-labelled primers;  $T_a$ : annealing temperature;  $MgCl_2$  concentration; Na: number of alleles; frequency of the most common allele, observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosities were calculated using one individual per multilocus genotype].

Locus	Motif	Size range (bp)	5' dye	Primer sequences (5'-3')	$T_a$ (°C)	[MgCl <sub>2</sub> ] mM	GenBank Accession	Na	Frequency of the most common allele	$H_O$	$H_E$ Nei (1978)
<i>Pp4</i>	(AC) <sub>13</sub>	95-137	VIC	F: ATTCTTCCACCAATTCATCG R: ATCACTAAACAAAGTAGGTATGTAAGT	48	1.2	JN230544	9	0.740	0.320	0.444
<i>Pp14</i>	(TG) <sub>9</sub>	100-106	6-FAM	F: CCGCCTAAATGTATACGTCG R: TACGGCCTATGCGGTTTATT	50	1.5	JN230545	3	0.500	0.600	0.548
<i>Pp20</i>	(GTC) <sub>7</sub>	189-201	NED	F: CAAGAAACGAACAGCCCAAT R: AACTCATTATGTGGAGGCCG	58	1.5	JN230546	2	0.520	0.400	0.509
<i>Pp21</i>	(AC) <sub>16</sub>	86-106	NED	F: CACAACCTTCCGGCTAAAAC R: CGTGCTGTTTACGTCTGTGT	52	1.0	JN230547	10	0.420	0.680	0.776
<i>Pp22</i>	(GA) <sub>13</sub>	105-137	6-FAM	F: CCTCGGATTACGGTATAGCAA R: CGGGTAGTTTCGGTTTTAGTTTT	53	1.5	JN230548	9	0.320	0.640	0.801
<i>Pp23</i>	(AC) <sub>14</sub>	109-119	PET	F: TGGCCTTTGAACCAATACAA R: GGTGGTTAAGGTGAGGACGTT	56	1.0	JN230549	3	0.460	0.560	0.610
<i>Pp24</i>	(TC) <sub>11</sub>	85-91	VIC	F: GTCGTCCAGCAACACATACG R: TTTTAGGGTCGGAAGACGAG	62	1.5	JN230550	4	0.680	0.440	0.504
<i>Pp25</i>	(AC) <sub>13</sub>	122-130	VIC	F: TTCGTGACGTTATCCGTTCA R: GGCGGAAACGTTTTCTTGTA	46	1.5	JN230551	5	0.460	0.680	0.705
<i>Pp26</i>	(TG) <sub>12</sub>	138-150	6-FAM	F: GACGAATCGCACGTTGTTT R: GCAGAAAACGACATTGCTCA	56	0.8	JN230552	2	0.920	0.080	0.150
<i>Pp27</i>	(AC) <sub>11</sub>	96-128	PET	F: GCCGTTTCGATAATACACGGT R: ATCGAGAACGGTCCCTACCT	63	1.0	JN230553	6	0.700	0.480	0.493
<i>Pp28</i>	(CA) <sub>11</sub>	91-97	NED	F: TGTAGTCATGTGGGACTGCC R: TTTATACCTGTGTGTGCGTGC	63	1.2	JN230554	3	0.640	0.560	0.523
<i>Pp29</i>	(GAC) <sub>9</sub>	74-80	PET	F: TGAAACGCGACGATTACTTG R: ATGTGTGCGCACTTGTGT	60	1.5	JN230555	2	0.920	0.160	0.150

### 3.3. Structure génétique des populations de *P. passerinii*

#### ❖ Présentation de l'article n°6 en préparation et résultats préliminaires

L'étude de la distribution géographique de la variabilité génétique (ou structure géographique) des populations d'insectes phytophages permet de proposer divers scénarios de leur histoire évolutive pour mieux comprendre leur origine géographique et les processus conditionnant leur évolution. La structure géographique des populations d'insectes résulte de l'interaction entre les processus génétiques et démographiques, ces derniers étant directement influencés par les facteurs écologiques tels que le climat, l'arbre hôte et la capacité de dispersion de l'espèce (Roderick 1996 ; Peterson & Denno 1998a,b). Chez les pucerons, la distribution géographique de la diversité génétique résulte également d'un troisième niveau d'interaction lié à la plasticité de leur mode de reproduction (cf. § 3.3.2 de l'introduction) (Simon et al. 1999 ; Llewellyn et al. 2003). En identifiant les génotypes des individus et en analysant leur distribution spatiale, il est possible de mettre en évidence les forces évolutives façonnant la composition génétique des populations. La comparaison des changements de fréquences géniques et génotypiques entre populations permet notamment d'estimer les flux de gènes qui, selon leur importance, peuvent limiter ou au contraire favoriser les différenciations génétiques entre populations (Slatkin 1987 ; Roderick 1996). Ces informations permettent notamment de comprendre les liens génétiques entre populations et d'inférer les relations entre les patrons de variation génétique et le comportement migratoire du puceron ou la dispersion d'origine anthropique du puceron. Cela permet de résoudre certains aspects de la biologie et de l'écologie des pucerons mais également de mettre en évidence et de comprendre les processus à l'origine de l'émergence et de l'expansion géographique des espèces ravageuses (Sunnucks et al. 1997 ; Simon et al. 1999 ; Haack et al. 2000 ; Llewellyn et al. 2003 ; Miller et al. 2005 ; Margaritopoulos et al. 2009).

Les objectifs de cette étude sont de réaliser une analyse de la diversité génétique sur un ensemble d'individus échantillonnés dans 35 localités en France, en Italie et en Espagne (cf. carte Fig. IV.1), puis de tester si le niveau de différenciation génétique entre les populations étudiées peut refléter une certaine partition entre grandes régions populicoles et/ou une connexion entre foyers d'infestation liée à la dispersion de certains génotypes. L'étude de structure génétique a été réalisée en considérant plusieurs échelles : (1) une échelle globale en considérant toutes les localités issues des trois pays, (2) une échelle inter-régionale en regroupant les 27 localités françaises selon les trois grandes régions populicoles françaises (Sud-Ouest, Centre-Ouest et Est) et (3) une échelle intra-localité qui vise à analyser le niveau de diversité génétique à l'échelle d'un arbre.

La structure génétique de *P. passerinii* a été évaluée en combinant trois marqueurs mitochondriaux (COI, COII et *Cytb*) et les 12 marqueurs microsatellites caractérisés dans l'article n°5.

Les trois fragments mitochondriaux ont été séquencés chez 1 individu par localité, soit 35 individus. L'utilisation de ces marqueurs permettait au préalable de vérifier le statut taxonomique des populations françaises, italiennes et espagnoles de *P. passerinii* incluses dans notre étude de génétique des populations, puisqu'ils sont aussi communément utilisés pour retracer les liens phylogénétiques au sein des genres d'Aphididae (Cœur d'Acier 2006, 2007). Les marqueurs microsatellites doivent être analysés pour 5 individus par localité. Toutefois, les expériences sont toujours en cours, les résultats présentés concernent donc l'analyse de 2 individus par localité.

Compte tenu du fait que nous ne disposons pas encore de l'ensemble des résultats de cette étude, la discussion de l'article n'est pas rédigée. En revanche, nous apportons dans cette présentation d'article une synthèse des principaux résultats obtenus à la date de rédaction du manuscrit. L'apport de ces résultats préliminaires pour ce travail de thèse sera discuté dans la conclusion générale.

#### *Analyse des gènes mitochondriaux*

Cette étude a mis en évidence 8 haplotypes, dont 1 haplotype majoritaire et 6 uniques dans l'analyse combinée des fragments COI, COII et *Cytb* pour les 35 individus. Les distances génétiques entre haplotypes sont faibles (< 1 %) indépendamment du fragment considéré et de l'origine géographique. La divergence des séquences d'ADNmt entre espèces pour les gènes COI, COII et *Cytb* est généralement comprise entre 2 % et 3 % (Fergusson 2002 ; Hebert et al. 2003). Les études réalisées chez les pucerons montrent une gamme de variation de cet ordre. Par exemple, la divergence des séquences des gènes COI/COII qui sépare les espèces d'*Uroleucon* (Aphididae : Aphidinae) sont comprises entre 3.6 % et 5.9 % pour un même sous-genre et entre 5.5 % et 6.8 % pour des espèces issues de sous-genres distincts. En revanche, les distances génétiques intraspécifiques chez les pucerons sont généralement inférieures à 2 %. On trouve par exemple pour les espèces du genre *Brachycaudus* des taux de divergence génétique intraspécifique pour le gène COI compris entre 0 et 1.5 % selon les espèces (Cœur d'Acier et al. 2007). Si l'on applique ces valeurs de divergence à nos données, l'ensemble des individus échantillonnés (35 individus issus de France, Espagne et Italie) doivent être considérés comme appartenant à une seule et même espèce.

#### *Polymorphisme des loci microsatellites étudiés*

Les taux d'hétérozygotie calculés avec les 70 individus (2 individus pour chacune des 35 localités) ou bien avec un seul représentant par génotype multiloci (MLG, c'est-à-dire différentes combinaisons alléliques sur l'ensemble des loci) sont légèrement différents (cf. Tableau 4 de l'article 6). En analysant un seul individu par MLG, le taux d'hétérozygotie observée des loci *Pp14*, *Pp25*, *Pp27* et *Pp29* a été augmenté, tandis que pour les autres loci il a été réduit. Globalement, une diversité

allélique élevée a été mise en évidence dans cette étude avec, pour les loci les plus variables, 6 allèles pour *Pp25* et *Pp27*, 10 allèles pour *Pp21* et *Pp22* et 11 allèles pour *Pp4*. Quand on s'attache à comparer *Pp4*, *Pp21* et *Pp22* pour lesquels 11, 10 et 10 allèles ont été identifiés respectivement, on serait tenté d'interpréter une variabilité génétique à peu près équivalente entre ces loci. Or, lorsque l'on regarde le taux d'hétérozygotie observée avec un seul représentant par MLG, on constate que *Pp4* a un taux d'hétérozygotie observée beaucoup plus faible (0.353) que *Pp21* (0.677) et *Pp22* (0.647). La fréquence de l'allèle le plus commun permet de mieux interpréter le taux d'hétérozygotie obtenu pour chaque locus microsatellite en fonction du nombre total d'allèles au locus considéré. Pour *Pp4*, il existe un allèle plus fréquemment rencontré, l'allèle 105 (fréquence égale à 0.700) majoritairement présent à l'état homozygote chez l'ensemble des individus (44 individus sur 70). Ceci explique au final le faible taux d'hétérozygotie de *Pp4*. En revanche, pour *Pp21* et *Pp22*, bien que les allèles 98 et 105 soit les plus communs, leur fréquence (0.441 et 0.324 respectivement) sont moins élevées. Si l'on considère l'ensemble des individus, les deux allèles les plus fréquents de *Pp21* et *Pp22* ne sont portés à l'état homozygote que par 9 individus et 1 individu respectivement. En regardant l'ensemble des allèles existant pour *Pp21* et *Pp22*, on dénombre 55 et 57 individus hétérozygotes sur 70 individus, ce qui explique un taux d'hétérozygotie observée plus élevé pour *Pp21* et *Pp22* que pour *Pp4*.

Dans cette étude, l'hétérozygotie observée pour chaque locus avec uniquement un individu par MLG est comprise entre 0.177 (*Pp29* avec 2 allèles) et 0.677 (*Pp21* avec 10 allèles). Cette variabilité génétique semble similaire à celle observée dans des populations françaises de *Sitobion avenae* (Simon et al. 1999).

Les trois régions populicoles ont montré une richesse allélique moyenne de 3 allèles par locus. De plus, leurs taux d'hétérozygotie étaient assez élevés, révélant une variabilité génétique suffisante pour pouvoir mieux comprendre leur structure génétique.

#### *Diversité génétique à l'échelle globale*

Au total, 34 génotypes multiloci (MLGs) ont été détectés pour les 70 individus. 31 MLGs étaient spécifiques, c'est-à-dire trouvés que dans une seule région à la fois. Les trois MLGs restant (MLG16, MLG22, MLG29) étaient, quant à eux, partagés par des individus issus d'au moins deux régions populicoles et même par des pays différents pour MLG16 (partagé par des individus espagnols, de l'Est et du Sud-Ouest de la France). Les indices de Shannon-Weaver révèlent que les régions Centre-Ouest et l'Espagne présentent la plus faible diversité clonale. Elle résultait dans les deux cas d'une représentation importante d'un seul MLG (MLG34 pour le Centre-Ouest et MLG16 pour l'Espagne). Cette prépondérance d'un seul génotype multiloci au sein d'une région pourrait être due à l'existence d'une lignée asexuée particulièrement efficace.

*Diversité génétique intra-localité*

A l'échelle d'une même localité, lorsque l'on retrouve sur le même arbre, le même MLG chez deux individus, ces derniers sont alors vraisemblablement des clones. Toutefois, nous avons pu démontrer qu'il existait une variabilité génétique significative, ne serait-ce qu'en analysant deux individus par localité, c'est-à-dire ici deux individus issus d'un même arbre mais avec des MLGs différents. En effet, sur les 27 localités françaises échantillonnées, 13 avaient une variabilité intra-arbre pour au moins un des 12 loci analysés. Deux localités espagnoles sur les six analysées, ainsi que les deux localités italiennes, présentaient aussi une variabilité génétique intra-arbre. Nous pouvons nous demander si cette variabilité génétique résulte finalement de la reproduction sexuée des ailés que nous pensions pourtant peu impliqués dans le cycle de vie de *P. passerinii* sous nos latitudes.

*Différenciation génétique entre 'régions' populicoles*

Le graphique d'ordination de l'analyse factorielle des correspondances (AFC) nous a permis d'observer une différenciation génétique des individus selon les trois premiers axes de l'AFC (Fig. 3). Des points correspondant à certaines localités du Centre-Ouest se distinguent du reste des localités en formant deux groupes distincts, un groupant les individus de la localité Froc et un autre comportant les individus des localités Ftou, Fthu, Fthi, Friv, Fbri et un individu de la localité Fcri. Les individus de la localité sicilienne se distinguent également du reste des localités. Les autres localités forment un groupe, notamment contenant la plupart des individus espagnols, deux du Sud-Ouest (FOrn) et un du Centre-Ouest (Fche) portant le même MLG. Toutefois, le dendrogramme NJ (Fig. 4) construit à partir des distances génétiques basées sur la proportion des allèles partagés entre les 34 MLGs nous a permis d'observer un regroupement génétique des MLGs en quatre groupes : le groupe I contenant des MLGs présents en Espagne et dans les trois régions populicoles Françaises, le groupe II et III regroupant des MLGs spécifiques de l'Italie et du Centre-Ouest de la France et enfin le groupe IV composé uniquement de MLGs provenant de France (région Est essentiellement et Centre-Ouest).

A l'échelle des trois grandes régions populicoles françaises, il s'est avéré que celles-ci étaient significativement différenciées génétiquement les unes des autres lorsque l'ensemble des individus était considéré, comme l'a montré le  $F_{ST}$  global s'élevant à 0,112 (intervalle de confiance 0.074 – 0.155 après bootstrap sur les loci). Une région donnée possède parfois des allèles uniques à certains loci, voire même des MLGs différents, ceci contribuant à accentuer le degré de différence vis-à-vis des autres régions. Toutefois, cette différenciation génétique diminuait lorsqu'un seul représentant par MLG était considéré ( $F_{ST}$  global = 0.039, I.C. 0.008 – 0.065). Seules les régions Sud-Ouest et Centre-Ouest ne sont plus significativement différenciées tandis que la région Est restait globalement bien différenciée des deux autres régions. Concernant les relations entre les localités d'Espagne et celles de

France, les individus espagnols étaient proches génétiquement de ceux de la région du Sud-Ouest de la France, ce résultat étant supporté par l'AFC et l'arbre de distance génétique inter-MLGs. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il a existé, ou existe encore, des échanges de gènes entre les populations de pucerons du Sud-Ouest de la France et celles d'Espagne. D'ailleurs, le MLG prédominant espagnol (MLG16) est présent dans des localités françaises du Sud de la France, mais aussi de la région Centre-Ouest de la France.

Les analyses bayésiennes préliminaires de structure génétique ont montré qu'il existait des clusters bien différenciés génétiquement entre eux, composés d'individus issus de la même région populicole (cluster jaune et rose constitués d'individus de la région Centre-Ouest et marron avec des individus de l'Est). Néanmoins, cette étude a aussi mis en évidence des clusters constitués d'individus provenant de régions populicoles différentes, notamment un groupe présentant un mélange d'individus issus des régions Centre-Ouest et Sud-Ouest (cluster vert), un autre regroupant des individus du Centre-Ouest et de l'Est (cluster rouge). Enfin deux individus issus d'une même localité du Centre-Ouest constituent un cluster à eux-seuls. La présence de groupes cohérents avec la géographie suggère qu'il existe des flux de gènes faibles et donc un certain isolement de ces populations. En revanche, l'existence de groupes constitués d'individus issus de différentes régions souligne que l'on ne peut pas exclure des événements de dispersion à longue distance, notamment entre la région Centre-Ouest et les deux autres régions (i.e. Sud-Ouest et Est).

#### *Flux de gènes et dispersion de *P. passerinii**

Globalement, les populations issues des grandes régions populicoles sont bien différenciées génétiquement. Toutefois, les analyses ont révélé une certaine connexion entre régions populicoles françaises ainsi qu'entre régions françaises et pays limitrophes (Italie et Espagne). On peut alors s'interroger sur la capacité migratoire des pucerons ailés sexués et des larves aptères produisant une cire cotonneuse facilement transportable par le vent. De même, les connexions entre pays pourraient être attribuées à des transports liés aux activités humaines. Les arbres abattus et transporté peuvent être stockés un certain temps et constitué un réservoir pour la dispersion. L'ensemble de ces résultats préliminaires devra être complété par des analyses portant sur un plus grand nombre d'individus à l'échelle d'une localité, mais aussi sur des peupleraies échantillonnées dans plusieurs régions selon des méthodes (par exemple des transects) permettant de mesurer les flux géniques à différentes échelles.



ARTICLE N°6

New insights from genetic study in an emergent tree-dwelling aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Sternorrhyncha: Aphididae)

Pointeau S, Martinez-Torres D, Martin C, Lieutier F & Bankhead-Dronnet S

En préparation



## **New insights from genetic study in an emergent tree-dwelling aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Sternorrhyncha: Aphididae)**

Sophie Pointeau<sup>1</sup>, David Martínez-Torres<sup>2</sup>, Carine Martin<sup>1</sup>, François Lieutier<sup>1</sup> & Stéphanie Bankhead-Dronnet<sup>1</sup>

1 *UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres, BP 6759, FR-45067 Orléans Cedex, France.*

2 *Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, Apartado de Correos 22085, 46071 Valencia, Spain*

**Keywords** Woolly poplar pest, phylogeny, nuclear DNA, population genetics, mitochondrial DNA, microsatellite

## Introduction

Many studies have inferred the global phylogeny of Aphididae (Hemiptera: Sternorrhyncha) either with morphology-based or molecular phylogenies (Heie 1987; Wojciechowski 1992; von Dohlen and Moran 2000; Martínez-Torres et al. 2001). Recent advances in molecular systematic highly support the grouping of the different subfamilies into three main evolutionary lineages named A + D (gathering the subfamilies Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae and Pterocommatinae); P + T (Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae and Thelaxinae) and L (only Lachninae) (Ortiz-Rivas et al. 2004; Ortiz-Rivas and Martínez-Torres 2010). However, further studies are needed to include subfamilies whose phylogenetic relationships are not yet known (Ortiz-Rivas and Martínez-Torres 2010). The systematic position of the small subfamily Phloeomyzinae (Aphididae) is not elucidated to date, either because morphological characters are very peculiar (Heie 1987), or because little support was found at higher-tribe levels in phylogeny (von Dohlen and Moran 2000) or because this subfamily was not considered in more recent molecular studies (Ortiz-Rivas et al. 2004; Ortiz-Rivas and Martínez-Torres 2010). Phloeomyzinae is a specialized tree-dwelling subfamily characterized by a peculiar combination of morphological and biological characters such as a parenchyma-feeding life-style, a flat position of wings in repose (only sexual morphs are alate), a rounded rudimentary cauda and pore-like siphunculi (Heie 1987, Nieto-Nafría and Mier-Durante 1998, Pointeau et al. submitted). The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) is the only described species in the Phloeomyzinae and is native from the Palearctic zone. Beside an unclear specific taxonomic position, no study has investigated the genetic variability of *P. passerinii* throughout its native range, in spite of possible slight morphological variations and the description of one sub-species in China (Smith 1974; Zhang and Zhong 1982; Blackman and Eastop 1994). Consequently, studies are also needed to validate the existence of one species across its native area.

*Phloeomyzus passerinii* is monoecious on *Populus* sp., where individuals feed on trunks and colonies are covered by white woolly wax (Arzone and Vidano 1984). Through its native range, populations of *P. passerinii* are present at low levels with a negligible impact on *Populus* species of the natural riparian woodlands (Blackman and Eastop 1994; Allegro and Cagelli 1996). However, *P. passerinii* has recently become the most significant pest in poplar stands of Southern Europe, North Africa and the Near-East, where heavy infestations led to tree growth reduction and even massive mortalities (Arzone and Vidano 1984; Blackman and Eastop 1994; Sadeghi et al. 2007). In southern Europe, first outbreaks were recorded in Italy in 1934 (Della Beffa 1936), in Spain in the 1940s (Aparisi 1971) and in South-Western France in the mid-1990s (Maugard 1996). In France, outbreaks have firstly become more frequent and more severe in the South-Western French administrative departments, before to be observed northward (Baubet and Carouille 2009).

Emergence and expansion of outbreaks of native forest insects may be driven by modifications in climate conditions, in quality and quantity of host trees, in host range-expansion due to introductions of new host species, or also by human-mediated dispersion of insects in a new ecosystem (Bale et al. 2002; Lieutier 2006; DeLucia et al. 2008). The possibility to achieve pest status also depends on the species life-history traits that condition its sensitivity to environmental changes (Bale et al. 2002). Aphids are particularly prone to become pests especially in the face of changes in plant resources and temperature, owing to their clonal reproduction and dispersal modes, their low developmental temperature threshold and short generation time without diapause (Bale et al. 2002, 2007; Braendle et al. 2006). Their reproductive mode is greatly influenced by temperature variations and often follows a latitudinal cline with predominance of anholocyclic clones (i.e. reproducing exclusively asexually) in regions with mildest winter, holocyclic clones (i.e. alternation between asexual and sexual reproductions) in areas with coldest winter, and intermediate clones (i.e. investment in both reproductive strategies simultaneously) in regions with fluctuating winter climate (Dedryver et al. 1998; Simon et al. 1999). Thus, aphids may become pest because temperature changes affect directly their demographic processes by increasing voltinism and improving winter survival of anholocyclic populations, as well as by enhancing the selective advantage of anholocyclic vs holocyclic clones (Blackman 1974; Bale et al. 2002; Hullé et al. 2010). Other factors may also trigger outbreaks of native forest insect in particular in aphids: the indirect effects of temperature changes on host tree resistance (Ayres and Lombardero 2000), the intensification of silvicultural practices such as the development of monoclonal plantations leading to reduction of tree genetic variability and high tree densities, the planting of trees in unadapted soils (Day and Leather 1997).

The genotypes of cultivated poplar (Pointeau et al. 2010) and temperature (Pointeau et al. submitted) play a significant role on *P. passerinii*'s demography. Both the increase of poplar stand areas planted with susceptible genotypes and the warming up since the mid-1990s constitute important modifications of environmental conditions that might have favoured local populations' outbreaks (Pointeau et al. submitted). New outbreaks might also result from the rapid spread of southern populations by individual or human-mediated dispersals. However, no study to date has probed the genetic structure and the reproductive mode of populations of *P. passerinii* throughout its outbreak range, which might allow a better understanding of the emergence processes.

To understand how phytophagous insects become new pest and spread, population genetic studies are very helpful by elucidating the distribution of their intraspecific genetic variation since the latter results from genetic processes directly influenced by the life historical and ecological traits such as dispersal (Roderick 1996; Peterson and Denno 1998a,b). Existence of an important gene flow will prevent from local genetic differentiation of populations, while the opposite will lead to spatial genetic subdivision of populations (Slatkin 1987). The heterogeneity of the habitat including host plant availability and suitability contributes to the level of gene flow (Mopper 1996; Peterson and Denno

1998a). Moreover, in aphids, plasticity of the reproductive strategies has important consequences on the genetic composition of populations. Indeed, the characterization of population genetic features of sexual and asexual lineages (mainly cereal aphids) revealed a high level of heterozygosity and low multilocus-genotypes (MLGs) diversity in asexual lineages (Sunnucks et al. 1997; Simon et al. 1999; Balloux et al. 2003).

The present study aims at (1) elucidating the phylogenetic relationship of the subfamily Phloeomyzinae with the other Aphididae subfamilies analyzed at two nuclear genes by Ortiz-Rivas and Martínez-Torres (2010) and (2) investigating the population genetic variability and the extent of its spatial distribution at several scales using three mitochondrial DNA fragments and 12 microsatellite loci, the latter being recently analyzed in Pointeau et al. (submitted).

## Materials and methods

### *Aphid sampling*

For the phylogenetic analysis, we used one individual of *P. passerinii* sampled from October in 2008. In the population genetic analyses, sampling took place between spring and autumn, mainly in 2009. Parthenogenetic apterous females of *P. passerinii* were collected from 35 localities in three countries of the Mediterranean basin, where significant outbreaks occurred: (i) twenty-seven localities in France, (ii) six in Spain and (iii) two in Italy. This study considered a *locality* to be one given poplar tree from which one or a few pieces of the same trunk bark covered by aphids were taken between soil level and breast height, and stored in absolute ethanol. Several poplar genotypes belonging to the hybrid *Populus x canadensis* Moench were sampled depending on the locality. The sampling sites, poplar genotype and date of capture are summarized in Table 1. Aphids were stored at -20 °C before analysis. Thirty-five individuals (one per locality) were first analysed at the three mtDNA fragments to look for population variability at these markers. Then to go into the population genetic study in greater depth, individuals from the same 35 localities were analyzed at 12 polymorphic microsatellite loci. We genotyped two individuals per locality [*we are analyzing 3 other individuals per locality to obtain a total of 5 individuals per locality for the final version of this paper*].

**Table 1** Sampling sites with their corresponding code, poplar genotype (all belonging to the hybrid *Populus x canadensis* Moench), dates of capture, collector's name and geographical coordinates. Sampling sites are grouped by 'regions' within France and by countries.

	Code	Country	Locality	Poplar genotype	Date	Collected by	Latitude	Longitude
<b>South-western France</b> 5 localities	Fcab	France	Cabas-Loumasses	I214	09/2009	J.-C. Costes	43°20' N	0°36' E
	Fmer	France	Merles	I214	06/2009	J. Hübelé	44°03' N	0°58' E
	Forn	France	Ornezan	I214	09/2009	J.-C. Costes	43°30' N	0°36' E
	Fpan	France	St Pantaléon de Larche	I214	11/2009	R. Nanot	45°08' N	1°26' E
	Fver	France	Verdun sur Garonne	I214	11/2009	J. Hübelé	43°51' N	1°14' E
<b>Estearn France</b> 9 localities	Fclu	France	Clux	I214	09/2009	J.-D. Robin	46°57' N	5°11' E
	Fcui	France	Cuiserey	I214	06/2009	J.-L. Edouard	47°22' N	5°20' E
	Fcul	France	Culin	I214	10/2009	B. Boutte	45°31' N	5°15' E
	Fdam	France	Damerey	I214	07/2009	J.-D. Robin	46°50' N	4°59' E
	Fdio	France	Diou	I214	10/2009	J. Daffix	46°32' N	3°44' E
	Fepe	France	Epervans	I214	06/2009	J.-D. Robin	46°44' N	4°54' E
	Ffra	France	Franxault	I214	07/2009	B. Huttinger	47°03' N	5°16' E
	Fsas	France	Sassenay	I214	06/2009	J.-D. Robin	46°49' N	4°55' E
	Ftal	France	Talmay	I214	06/2009	J.-L. Edouard	47°21' N	5°26' E
<b>Centre-western France</b> 13 localities	Fbri	France	Briollay	I214	06/2009	Y. Bivaud	47°33' N	0°30' O
	Fcha	France	Charost	I214	10/2007	S. Pointeau	46°59' N	2°07' E
	Fche	France	Chery	I214	10/2009	F. Boulanger	47°05' N	2°03' E
	Froc	France	La Roche Clermault	Blanc du Poitou	10/2009	Y. Marsaud	47°08' N	0°12' E
	Fcri	France	Crissay sur Manse	I214	09/2009	F. Massé	47°08' N	0°29' E
	Fgen	France	Genouilly	I214	10/2009	F. Boulanger	47°11' N	1°53' E
	Fmar	France	Maray	I214	11/2007	S. Pointeau	47°14' N	1°53' E
	Fmau	France	Maulette	Triplo	12/2009	F.-X. Saintonge	48°47' N	1°37' E
	Freb	France	Reboursin	Dorskamp	10/2008	F.-X. Saintonge	47°06' N	1°49' E
	Friv	France	Rivarenes	I214	09/2009	Y. Marsaud	47°15' N	0°21' E
	Fthi	France	Thizay	I214	09/2009	Y. Marsaud	46°53' N	1°54' E
	Fthu	France	Thuré	I214	06/2009	E. Sinou	46°49' N	0°27' E
	Ftou	France	Tourtenay	I214	09/2009	E. Sinou	47°02' N	0°07' O
<b>Spain</b> 6 localities	Ealc	Spain	Alcala de Ebro	I214	07/2009	N. Pérez Hidalgo	41°48' N	1°11' O
	Eboq	Spain	Boquiñeni	IMC	07/2009	N. Pérez Hidalgo	41°50' N	1°15' O
	Efun	Spain	Funes	I214	06/2009	N. Pérez Hidalgo	42°18' N	1°48' O
	Emil	Spain	Milagro	I214	07/2009	N. Pérez Hidalgo	42°14' N	1°45' O
	Evil	Spain	Villafranca	IMC	06/2009	N. Pérez Hidalgo	42°16' N	1°44' O
	Evilj	Spain	Villabre de la Jurisdicción	I214	07/2009	N. Pérez Hidalgo	43°15' N	6°07' O
<b>Italy</b> 2 loc.	Icas	Italy	Casale Monferrato	I214	09/2007	G. Allegro	45°08' N	8°27' E
	Icat	Italy	Catania	I214	10/2009	S.B. Legit	37°30' N	15°05' E

### DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from single apterous aphids of the parthenogenetic line using the GenElute™ Mammalian Genomic DNA Kit (Sigma) and was eluted in 100 µl of the elution buffer provided in the kit.

### Nuclear and mitochondrial DNA amplification and sequencing

To infer the phylogenetic relationship of the subfamily Phloeomyzinae within the Aphididae, a phylogenetic study was carried out using two nuclear genes of aphids as described in Ortiz-Rivas and Martínez-Torres (2010): the gene encoding the long-wavelength opsin (LWO) (Ortiz-Rivas et al. 2004) and the gene for the translation elongation factor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) (Normark 1999). Amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing of LWO sequences were carried out as previously described (Ortiz-Rivas et al. 2004). For the amplification of EF1 $\alpha$  sequences, the primers EFS175 [5'-GGAAATGGGAAAAGGCTCCTTCAAGTAYGCY-TGGG-3'] and EF2 [5'-ATGTGAGCAG-TGTGGCAATCCAA-3'] were used (Normark 1999).

The mitochondrial DNA (mtDNA) analysis aims at clarifying the real taxonomic status of the aphid populations used, but it also gives a first assessment of the structure of aphid populations. In this purpose, we amplified by PCR reactions three mtDNA fragments, i.e. cytochrome oxidase I (COI) and II (COII) and cytochrome *b* (*Cytb*), commonly used to resolve intrageneric phylogenetic relationships in aphids (Coeur d'Acier et al. 2006, 2007). Cytochrome oxidase I (COI) was amplified using DNA-barcoding PCR primers: LCO1490 [5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' (Folmer et al. 1994)] and HCO2198 [5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer et al. 1994)]. Amplification of cytochrome oxidase II (COII) was performed with primers mt2993+ [5'-CATTCATATTCAGAATTACC-3' (Stern 1994)] and A3772 [5'-GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT-3' (Normark 1996)]. In addition, cytochrome *b* (*Cytb*) sequences were produced using the new primers PhloCbF1 [5'-CATTATAAACTGATATTAATTTAGC-3'] and PhloCbR1 [5'-GGAATAGATCGTAAATTGAATATG-3'] designed using the only sequence of *P. passerinii* we were able to successfully amplified with primers CP1 [5'-GATGATGAAATTTTGGATC-3'] (Harry et al. 1998) and CB2 [5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3' (Jermin and Crozier 1994)]. All PCR reactions were performed using a MJ Research PTC-100 thermal cycler and the GoTaq® Flexi DNA Polymerase package (Promega). The DNA fragments were amplified in a 25 µl reaction volumes containing 1 µl of DNA extraction ( $\approx$  10 ng), 1 µM each primer, 200 µM each dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl of 5x Mg<sup>++</sup> free Green GoTaq® Flexi buffer and 0.6 U of *Taq* DNA polymerase. Samples were submitted to 35 cycles of amplification under the following conditions: denaturation step at 95 °C for 30 s, annealing for 1 min at temperature specific to each DNA fragment (COI: 48 °C, COII: 46

°C, *Cytb* and *EF1 $\alpha$* : 50°C) and extension at 72 °C for 1 min. An initial denaturation step at 95 °C for 2 min and a final extension step of 72 °C for 5 min were added.

All PCR products were purified using the GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) and directly sequenced on an ABI 3100 automatic sequencer. Sequencing was performed with the corresponding amplification primers using the BigDye® Terminator version 3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems) and purified using Sephadex® G50 (Sigma). All sequences were carefully checked 'by eye' before analysis and multiple alignments were performed using Clustal W (Thompson et al. 1994) as implemented in BioEdit v7.0.9.0 (Hall 1999).

### *Microsatellite genotyping*

Individual aphids were genotyped at 12 microsatellite loci previously isolated in *P. passerinii*: *Pp4*, *Pp14*, *Pp20*, *Pp21*, *Pp22*, *Pp23*, *Pp24*, *Pp25*, *Pp26*, *Pp27*, *Pp28*, *Pp29* (Pointeau et al. submitted). Amplifications were carried out in separate PCR reactions using a MJ Research PTC-100 Thermal Cycler and the GoTaq® Flexi DNA Polymerase package (Promega). The total reaction volume was 10  $\mu$ l containing: 1  $\mu$ l of genomic DNA ( $\approx$  10 ng), 0.4  $\mu$ M each primer, 200  $\mu$ M each dNTP, 2  $\mu$ l of 5x Mg<sup>++</sup> free Green GoTaq® Flexi buffer, 0.6 U of *Taq* DNA and locus-specific MgCl<sub>2</sub> concentrations (Pointeau et al. submitted). Twenty percent of the forward primer was 5' end-labelled with a fluorescent dye, either 6-FAM, VIC, NED or PET (Applied Biosystems). PCR were performed with the following cycling conditions: one denaturation step at 94 °C for 2 min followed by 30 cycles with denaturation step at 94 °C for 20 s, 20 s at the locus-specific annealing temperature (Pointeau et al. submitted) and an elongation step at 72 °C for 30 s; then a final elongation step at 72 °C for 5 min. The amplified products were detected on an ABI-3100 automatic sequencer using GenScan™-500LIZ® Size Standard. Sizes of alleles were estimated using the Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems).

### *Phylogenetic analyses*

Phylogeny was reconstructed using the aphid species representative of 11 aphid subfamilies (*sensu* Remaudière and Remaudière 1997) as previously described in Ortiz-Rivas and Martínez-Torres (2010). Species and genes analysed for each of them are listed in Table 2.

Computer analysis of nuclear genes (i.e. multiple alignments and determination of introns' positions) was done as described in Ortiz-Rivas and Martínez-Torres (2010). Sequences of nuclear genes were treated in a combined analysis by concatenating the sequences of the two genes belonging to the same species (or in some case different species from the same genus). The combined dataset

included the coding sequences of the two nuclear genes LWO and EF1 $\alpha$  for a total of 28 species. Because of saturation of nucleotide substitutions, the third codon positions were removed from the LWO as mentioned in previous studies (Martínez-Torres et al. 2001; Ortiz-Rivas et al. 2004; Ortiz-Rivas and Martínez-Torres 2010).

Maximum likelihood (ML) was used to reconstruct phylogenetic relationships from the combined dataset of the two nuclear genes. ML analysis was performed with PhyML (Guindon and Gascuel 2003), using the general time-reversible substitution model with a proportion of invariant sites and a gamma-distributed rate heterogeneity (GTR+I+G), as selected by hierarchical likelihood ratio tests (LRTs; Huelsenbeck & Rannala 1997) implemented in Modeltest v. 3.7 (Posada & Crandall 1998). Bootstrap was conducted performing 500 replicates.

**Table 2** Classification of aphid species (Remaudière and Remaudière 1997) used to infer the phylogenetic position of the subfamily Phloeomyzinae with Genbank accession numbers of DNA fragments analysed.

Subfamily	Tribe	Species	EF1 $\alpha$	LWO	
Anoeciinae		<i>Anoecia sp.</i>	FM174706 <sup>d</sup>	AJ53946319 <sup>d</sup>	
Aphidinae	Aphidini	<i>Aphis fabae</i>	AY219724 <sup>b</sup>	-	
		<i>Aphis spiraeicola</i>	-	FM177115 <sup>d</sup>	
		<i>Rhopalosiphum padi</i>	FM174699 <sup>d</sup>	FM177114 <sup>d</sup>	
	Macrosiphini	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	FM174698 <sup>d</sup>	AJ489281 <sup>c</sup>	
		<i>Megoura viciae</i>	FM174696 <sup>d</sup>	AF189714 <sup>a</sup>	
		<i>Myzus persicae</i>	FM174697 <sup>d</sup>	AJ489282 <sup>d</sup>	
Chaitophorinae	Chaitophorini	<i>Chaitophorus leucomelas</i>	FM174705 <sup>d</sup>	FM177104 <sup>d</sup>	
		<i>Peryphyllus bulgaricus</i>	FM174704 <sup>d</sup>	AJ489285 <sup>c</sup>	
Drepanosiphinae		<i>Drepanosiphum oregonensis</i>	FM174695 <sup>d</sup>	AJ489284 <sup>c</sup>	
Eriosomatinae	Fordini	<i>Aploneura lentisci</i>	FM163601 <sup>d</sup>	AJ489289 <sup>c</sup>	
		<i>Baizongia pistaciae</i>	FM163599 <sup>d</sup>	AJ489290 <sup>c</sup>	
		<i>Forda marginata</i>	FM163596 <sup>d</sup>	FM177108 <sup>d</sup>	
		<i>Geoica utriculata</i>	FM163600 <sup>d</sup>	FM177110 <sup>d</sup>	
		<i>Paracletus cimiciformis</i>	FM163597 <sup>d</sup>	FM177109 <sup>d</sup>	
		<i>Smynthuroides betae</i>	FM163598 <sup>d</sup>	FM177111 <sup>d</sup>	
	Pemphigini	<i>Pemphigus populi</i>	FM163603 <sup>d</sup>	AJ489288 <sup>c</sup>	
		<i>Thecabius sp.</i>	FM163602 <sup>d</sup>	FM177112 <sup>d</sup>	
	Hormaphidinae	Cerataphidini	<i>Cerataphis sp.</i>	FM174690 <sup>d</sup>	AJ539465 <sup>c</sup>
	Lachninae	Eulachnini	<i>Cinara tujafilina</i>	FM174684 <sup>d</sup>	AJ489294 <sup>c</sup>
			<i>Eulachnus rileyi</i>	FM174708 <sup>d</sup>	AJ489292 <sup>c</sup>
Lachnini		<i>Lachnus roboris</i>	FM174686 <sup>d</sup>	AJ489293 <sup>c</sup>	
		<i>Maculolachnus submacula</i>	FM174688 <sup>d</sup>	FM177103 <sup>d</sup>	
		<i>Pterochloroides pesicae</i>	FM174687 <sup>d</sup>	FM177102 <sup>d</sup>	
		<i>Tuberolachnus salignus</i>	FM174685 <sup>d</sup>	FM177113 <sup>d</sup>	
Mindarinae		<i>Mindarus abietinus</i>	FM174703 <sup>d</sup>	FM177107 <sup>d</sup>	
Phloeomyzinae		<i>Phloeomyzus passerinii</i>	XXXXXX	XXXXXX	
Pterocommatinae		<i>Pterocomma pilosum</i>	FM174701 <sup>d</sup>	AJ489283 <sup>c</sup>	
Theanaxinae		<i>Theanax suberi</i>	FM174702 <sup>d</sup>	AJ489287 <sup>c</sup>	

Note: Superscript letters indicate sequence from previous studies (a) Gao et al. (2000), (b) von Dohlen and Teulon (2003), (c) Ortiz-Rivas et al. (2004), (d) Ortiz-Rivas and Martínez-Torres (2010).

### Population genetic analyses

**Mitochondrial analyses.** The appropriateness of combining the three mitochondrial genes COI, COII and *Cytb* into a single analysis was assessed using the partition homogeneity test (Farris et al. 1994), as implemented in PAUP\*. The test was carried out with 1000 replicates MP searches on the randomly partitioned dataset. Because partition homogeneity test found no conflict between the three mtDNA fragments ( $P = 0.677$ ), we used the combined dataset for all further analyses. Uncorrected p-distances between haplotypes were calculated for each mitochondrial fragment with MEGA v5.0 (Tamura et al. 2011). Such an analysis allowed us to confirm the presence of one species as shown by low inter-haplotype genetic distances.

Population genetic variability was assessed for each mtDNA fragment by measuring the nucleotide diversity ( $\pi$ ) and haplotypic diversity ( $H_d$ ) computed using DnaSP v5.0 (Rozas et al. 2009). The geographical distribution of haplotypes was presented on the sampling map. Then, a statistical parsimony network based on the combined dataset was computed using TCS v1.21 (Clement et al. 2000), which estimates gene genealogies from DNA sequences following the method described in Templeton et al. (1992). Cladogram ambiguities were solved using topological and frequency criteria (Crandall and Templeton 1993; Pfenninger and Posada 2002).

### Microsatellite analyses.

**Genetic diversity.** Because inclusion of multiple copies of the same multilocus genotype (MLG), generated by clonal amplification due to parthenogenetic reproduction, may impact data interpretation, analyses were carried out including both all aphids, as well as using only one aphid per MLG (Sunnucks et al. 1997). Moreover, several scales were considered: (1) a global analysis of the 35 localities from France, Spain and Italy, (2) an analysis per French 'region' after the 27 localities had been grouped into three large poplar-planted 'regions' (see Table 2: South-Western, Eastern and Centre-Western France) and (3) an intra-locality analysis that gives a first assessment of the genetic variability at a tree-scale (since one locality consisted in one tree from one poplar stand). Although aphids were sampled on the same poplar genotype in some localities, the effects of poplar genotype diversity could not be considered because of large unequal sample size among genotypes.

First, standard genetic indices were calculated for the two first scales using GENETIX v4.05.2: number of alleles per locus ( $N_a$ ), frequency of the most common allele for each locus, observed and expected heterozygosities ( $H_o$  and  $H_e$ ) under Hardy-Weinberg assumptions (Nei 1978), and the mean number of alleles per locus in each of the three French "regions". Because the mean number of alleles at each locus is affected by sample size, allelic diversity among the three French 'regions' of variable sample sizes was compared using the average of the allelic richness for the 12 loci used as the measure of the within-region allelic richness calculated with FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1995). Multilocus  $F_{IS}$  values for each region (Weir and Cockerham 1984) were also calculated with Fstat.

Secondly, the MLG compositions within the three French 'regions', Spain and Italy and at the global scale were determined by two approaches. The genotypic diversity was first assessed using the following index:  $k = G / N$ , where  $G$  is the number of MLGs and  $N$  is the sample size. The Shannon-Weaver diversity index ( $H$ ) was then calculated to take into account both the number of MLGs and the evenness in their relative abundance, using the formula:  $H = -\sum_i p_i \ln p_i$ , where  $p_i$  is the relative abundance of each MLG (Shannon and Weaver 1949; Peet 1974; Vanoverbeke and De Meester 1977). The index was expressed as an  $e^H$  value that ranged from one (only one clone in the sample) to  $N$  (all MLGs are present in equal frequencies).

Finally, the genetic diversity at the locality scale was determined by identifying the individuals from the same tree that had different MLGs.

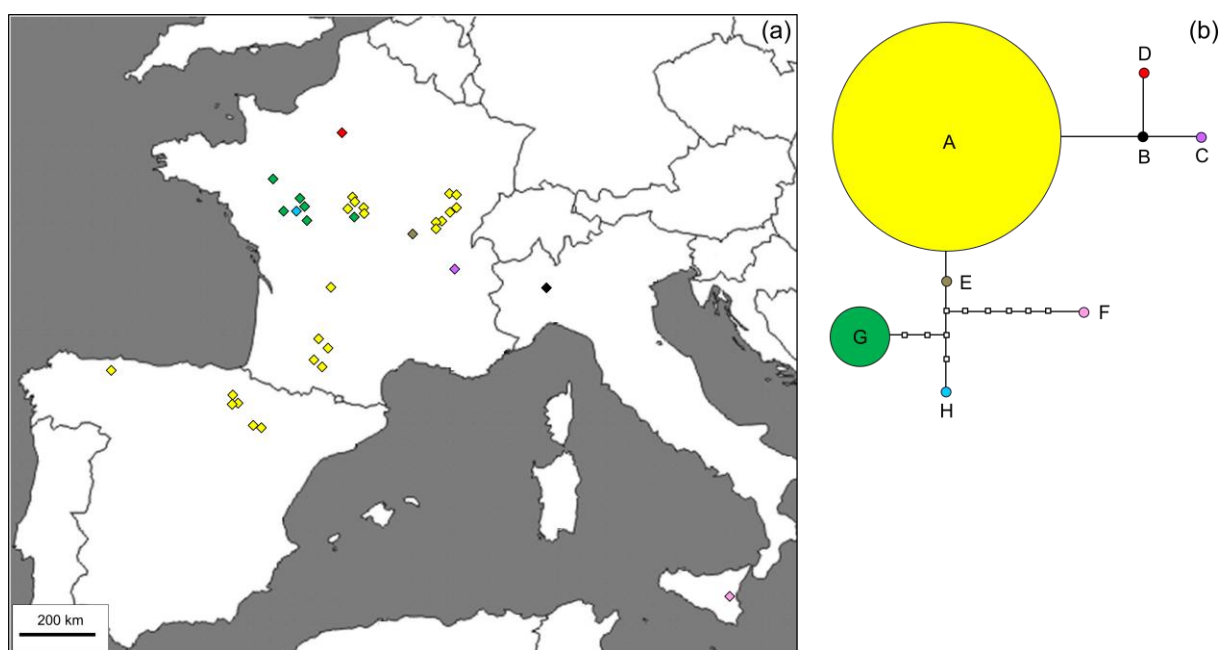
**Population structure.** In a first step, patterns of genetic differentiation were initially ordinated by factorial correspondence analysis (FCA) to maximize the correspondence between allele and individual scores. The GENETIX v4.05.2 software used for FCA also codes the alleles by the presence/absence of each feature including homozygous state (Belkhir et al. 1996–2001). Secondly, an unrooted neighbour-joining (NJ) tree of inter-MLG genetic distances was constructed using MEGA v5.0 (Tamura et al. 2011). Genetic distances were computed, using the Sharedst online program (J. Brzustowski; available at <http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/sharedst.php>), on the basis of pairwise shared allele distances between MLGs, defined as one minus half the mean number of shared alleles per locus. As a third approach, Wright's fixation indices for 'within- French region' deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $F_{IS}$ ), as well as pairwise French 'region' differentiation ( $F_{ST}$ ), were estimated following Weir & Cockerham (1984) using FSTAT. Deviation from random mating within populations ( $F_{IS}$ ) per locus and region was tested based on 1000 randomizations while by permutations for  $F_{ST}$  pairwise values.

Finally, we used a Bayesian method implemented in STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard et al. 2000) to determine the most likely number of genetic units underlying our 54 individuals in France and to assign them to a genetic cluster, without any prior information on the origin of each sampled aphid. The estimation procedure consists of running trial values of the number of populations  $K$  and then comparing the estimated log probability of data under each  $K$ ,  $\text{Ln}[\text{Pr}(X/K)]$ . We tried one run for each 54 values of  $K$ . Once we could determine that the expected number of clusters was between  $K = 2$  to 7, we performed ten independent runs from each of these eleven values of  $K$ , each run using 100000 iterations after a burn-in period of length 50000, with the admixture model including uncorrelated allele frequencies. For each value of  $K$ , the log-likelihood values were averaged and standard deviation calculated. The estimated number of clusters ( $K$ ) was taken to be the value of  $K$  with the highest  $\text{Ln}[\text{Pr}(X/K)]$  (Pritchard et al. 2000) [*we plan to improve the determination of the number of clusters by using the Evanno et al.'s method (2005)*].



## Population genetic analyses

**Mitochondrial analyses.** We obtained a final alignment of 35 sequences that were 1232 bp long including 706 bp in COI, 731 bp in COII and 695 bp in *Cytb* (Table 3). A total of eight haplotypes named from A to H were identified on the basis of 16 polymorphic sites which 5 were informative (Fig. 2, Table 3). Sequence divergence (uncorrected p-distance) between the eight haplotypes was between 0.10 % and 0.50 % using the combined dataset. The pairwise genetic distance (uncorrected p-distance) between haplotypes indicated values ranging from 0.001 - 0.003 for COII, while they varied between 0.001 - 0.007 for COI and 0.001 - 0.009 for *Cytb*. Nucleotide diversity ( $\pi$ ) was low and ranged from 0.0005 to 0.0022. Haplotypic diversity ( $Hd$ ) ranged from 0.332 to 0.495. Haplotype A was shared by 23 individuals mainly distributed from northern Spain to north-eastern France. Haplotype G was found in six individuals localized in north-western France. The six remaining haplotypes were single haplotypes found in one locality only (Fig. 2). The network revealed that haplotypes A, B, C, D formed a closely related group of haplotype. Haplotype H (Froc, Centre-western France) diverged from this group by three mutation steps, while it was four and six mutations steps for haplotype G (six remaining haplotypes of Centre-western France) and F (Fcul) respectively.



**Fig.2.** Geographic distribution of *Phloeomyzus passerinii* individuals and their associated haplotypes found in the combined analysis of COI, COII and *Cytb* sequences. (a) Geographic distribution of the individuals collected in 35 different localities represented with the colour of the different haplotypes for each individual. (b) Haplotype network of the eight haplotypes found in the analysis. Each line corresponds to a mutational step and each empty square to a missing intermediate. Haplotype frequencies are represented by the size of the circle.

**Table 3** Characteristics mitochondrial genes. HT: haplotypes,  $\pi$ : nucleotide diversity and  $H_d$ : haplotypic diversity.

Genes	Size (bp)	No. HT	$\pi$	$H_d$	p-distance between HT	Genbank accession
COI	706	8	0.0022	0.495	0.001-0.007	XXXXXX
COII	731	2	0.0005	0.332	0.001-0.003	XXXXXX
Cytb	695	6	0.0010	0.440	0.001-0.009	XXXXXX

**Microsatellite analyses.**

**Genetic diversity.** Two alleles (at *Pp26* and *Pp29*) to 11 alleles (at *Pp4*) were found per locus overall the 70 individuals sampled from 35 localities in France, Spain and Italy, leading to a total of 34 different multilocus genotypes (MLGs). The frequency of the most common allele varied from 0.307 to 0.936 while observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosities ranged from 0.129 to 0.800 and from 0.121 to 0.796 respectively (Table 4, see *a*). In one individual-per-genotype data, the most common allele ranged from 0.324 to 0.912, while  $H_O$  varied from 0.059 to 0.706, and  $H_E$  from 0.163 to 0.803 (Table 4, see *b*). When French localities were grouped by 'region' and only with one representative per MLG, Centre-Western France showed the highest allelic richness with 3.75 alleles per locus, followed by the Eastern France with 3 alleles per locus, and finally South-Western France with 2.5 alleles per locus (Table 5). Observed heterozygosities were very close between 'regions' and ranged from 0.403 to 0.486.

**Table 4** Characteristics of the 12 polymorphic microsatellite loci in *Phloeomyzus passerinii* from France, Italy and Spain. Allelic diversity and heterozygosities were calculated on (*a*) 70 parthenogenetic individuals and (*b*) one representative per each of 34 multilocus genotypes (MLGs). [Na: number of alleles;  $H_O$ : observed heterozygosity;  $H_E$ : expected heterozygosity calculated according to Nei (1978)].

Locus	Na	Size range (bp)	Frequency of the most common allele		$H_O$		$H_E$	
			(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
<i>Pp4</i>	11	95-137	0.700	0.735	0.357	0.353	0.491	0.454
<i>Pp14</i>	3	100-106	0.557	0.485	0.586	0.588	0.515	0.549
<i>Pp20</i>	2	189-201	0.521	0.500	0.586	0.412	0.503	0.508
<i>Pp21</i>	10	86-106	0.364	0.441	0.800	0.677	0.796	0.761
<i>Pp22</i>	10	105-137	0.307	0.324	0.800	0.647	0.791	0.803
<i>Pp23</i>	3	109-119	0.450	0.456	0.571	0.500	0.632	0.622
<i>Pp24</i>	4	85-91	0.686	0.677	0.457	0.353	0.490	0.504
<i>Pp25</i>	6	106-130	0.557	0.471	0.686	0.706	0.613	0.700
<i>Pp26</i>	2	138-150	0.864	0.912	0.214	0.059	0.236	0.163
<i>Pp27</i>	6	96-128	0.743	0.691	0.443	0.529	0.432	0.502
<i>Pp28</i>	3	91-97	0.614	0.603	0.657	0.559	0.547	0.553
<i>Pp29</i>	2	74-80	0.936	0.912	0.129	0.177	0.121	0.163

**Table 5** Genetic diversity among the three French 'regions' (defined in Table 1) calculated using all individuals as well as with one representative per multilocus genotype (MLG). n: number of individuals;  $N_A$ : mean number of alleles per locus; A: mean allelic richness using rarefaction size as indicated between square brackets;  $H_O$  and  $H_E$ : observed and expected heterozygosity (with standard deviation SD); multilocus  $F_{IS}$

Region	n	$N_A$	A	$H_O$	$H_E$ (Nei 1978)	Multilocus $F_{IS}$
<i>All individuals</i>						
South-Western France	10	2.500	2.500 [10]	0.533 (0.328)	0.433 (0.238)	-0.249
Eastern France	18	3.000	2.819 [10]	0.421 (0.290)	0.435 (0.248)	0.032
Centre-Western France	26	3.750	3.255 [10]	0.481 (0.279)	0.484 (0.254)	0.007
<i>One individual per MLG</i>						
South-Western France	6	2.500	2.500 [6]	0.486 (0.296)	0.450 (0.239)	-0.090
Eastern France	12	3.000	2.592 [6]	0.403 (0.286)	0.445 (0.240)	0.098
Centre-Western France	13	3.750	3.130 [6]	0.474 (0.233)	0.523 (0.243)	0.097

When investigating clonal diversity in the total sample and within 'regions', we detected 3 specific MLGs within South-Western France, 12 in Eastern France, 10 in Centre-Western France, 2 in Spain and 4 in Italy (i.e. 31 specific MLGs for a total of 50 aphids). Three MLGs (MLG16, MLG22 and MLG29 in italic in Table 6) were common among at least two regions. None of these MLGs was present in all three countries, neither in all three French 'regions'. The comparison of the Shannon-Weaver diversity indices among French 'regions' revealed that Eastern France had the highest evenness in the relative abundance of MLGs ( $e^H = 11.34$  relatively close to 18, the theoretical value if all MLGs had equal frequencies), while it reached  $e^H = 8.03$  in Centre-Western (to be compared with the value of 26) because eleven aphids shared the MLG34. It was the same cause in Spain (10 aphids with the MLG16) to explain the low evenness value ( $e^H = 1.76$ ).

When investigating genetic diversity at the locality scale, i.e. on a given tree, we counted 13 localities revealing that the two aphids sampled on the same tree had different MLGs (2 trees in South-Western France, 3 in Eastern France, 4 in Centre-Western France. 2 in Spain and the 2 trees in Italy).

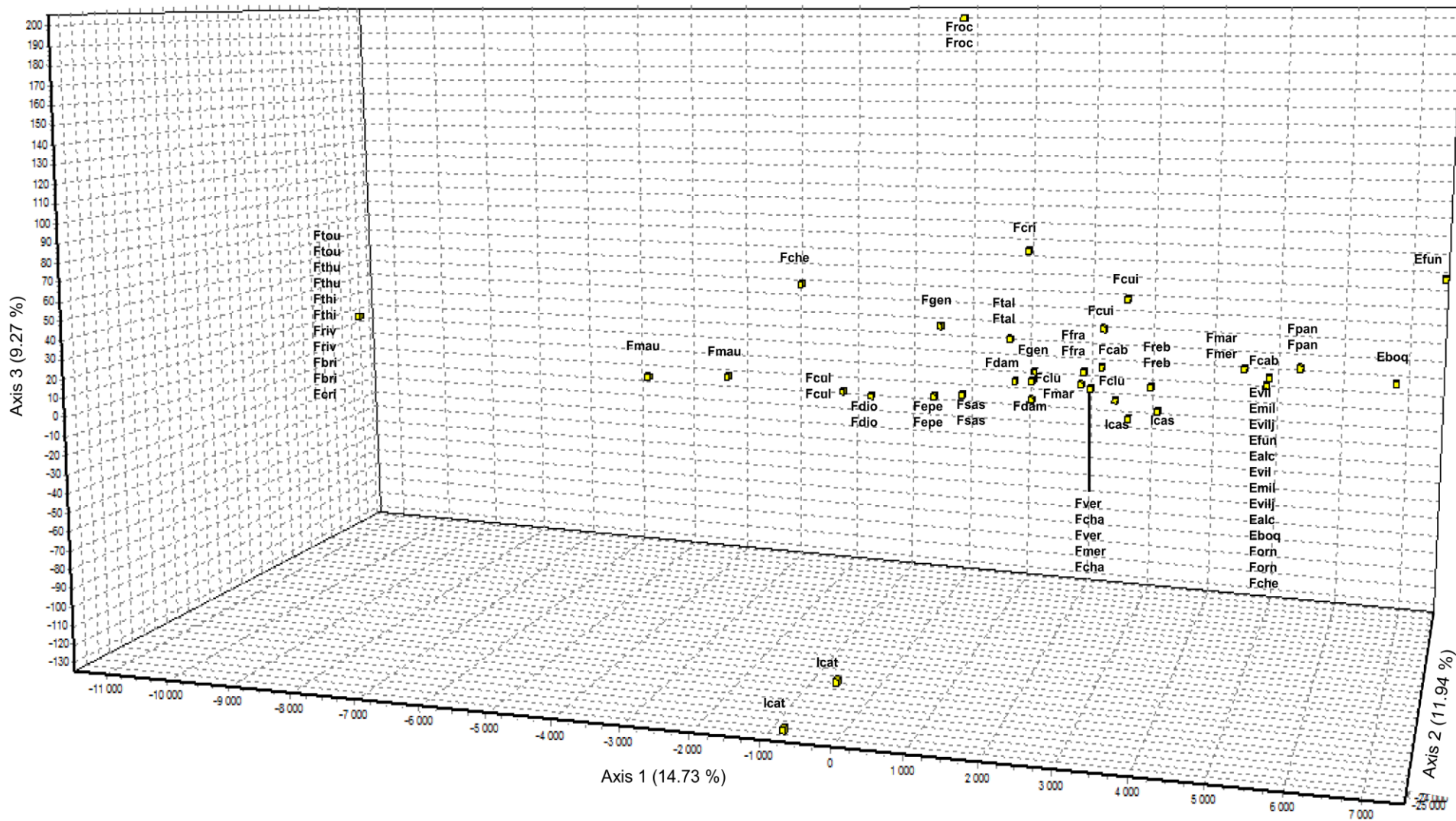
**Table 6** Multilocus genotypes (MLGs) identified from the analysis of 70 *P. passerinii* individuals collected in 35 localities grouped in three French “regions”, Spain and Italy. *N*: sample size; *G*: total number of MLGs in the sample; *k*: genotypic diversity;  $e^H$ : Shannon-weaver diversity index ranging from one (if only MLG is detected) to *N* (all MLGs have equal frequencies)

Multilocus genotype (MLG)	South-Western France	Eastern France	Centre-Western France	Spain	Italy	Total
MLG1	0	0	1	0	0	1
MLG2	0	2	0	0	0	2
MLG3	0	0	0	0	1	1
MLG4	0	0	0	0	1	1
MLG5	0	0	1	0	0	1
MLG6	1	0	0	0	0	1
MLG7	0	2	0	0	0	2
MLG8	2	0	0	0	0	2
MLG9	0	0	1	0	0	1
MLG10	0	2	0	0	0	2
MLG11	0	1	0	0	0	1
MLG12	0	1	0	0	0	1
MLG13	0	0	1	0	0	1
MLG14	0	2	0	0	0	2
MLG15	0	0	1	0	0	1
MLG16	2	0	1	10	0	13
MLG17	0	0	0	1	0	1
MLG18	0	1	0	0	0	1
MLG19	0	2	0	0	0	2
MLG20	0	1	0	0	0	1
MLG21	0	0	2	0	0	2
MLG22	3	0	2	0	0	5
MLG23	0	0	1	0	0	1
MLG24	0	2	0	0	0	2
MLG25	1	0	0	0	0	1
MLG26	0	1	0	0	0	1
MLG27	0	1	0	0	0	1
MLG28	0	0	0	1	0	1
MLG29	1	0	1	0	0	2
MLG30	0	0	0	0	1	1
MLG31	0	0	0	0	1	1
MLG32	0	0	1	0	0	1
MLG33	0	0	2	0	0	2
MLG34	0	0	11	0	0	11
Specific MLGs	3	12	10	2	4	31
<i>N</i>	10	18	26	12	4	70
<i>G</i>	6	12	13	3	4	38
<i>k</i>	0.60	0.67	0.50	0.25	1.00	0.54
$e^H$	5.45	11.34	8.03	1.76	4.00	21.81

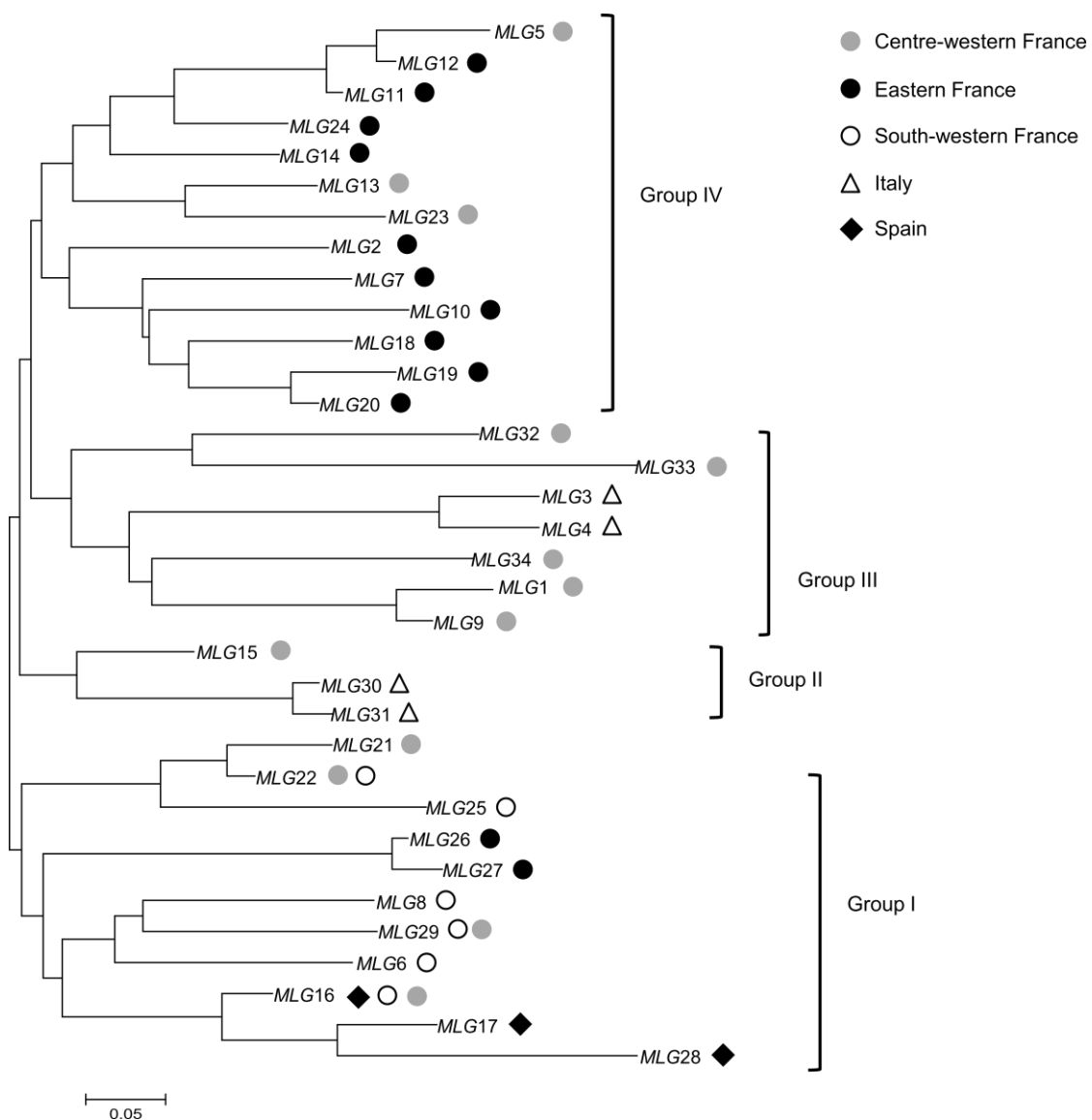
**Population structure.**

Factorial correspondence analysis revealed that the two first factorial components (axis-1 and axis-2) accounted for 26.7% of the total genetic variation. Some localities plotted into areas of the multivariate space, which were distant from the other localities (Fig. 3): (i) the ten individuals all from Centre-Western France Ftou, Fthu, Fthi, Friv, Fbri and one individual from Fcri shared the same MLG and were separated from the rest mainly by the axis-1; (ii) the two aphids from Froc (again Centre-Western France) up on the positive part of axis 3; (iii) the two individuals from Sicilia (Fcat) on the negative part of axis-3. Spatial distribution of the other individuals consisted into a large scatter diagram mainly extended along axis-1. The overlapping of the majority of Spanish individuals and two individuals from Forn (South-Western France) and one from Fche (Centre-Western) corresponded to the sharing of the same MLG.

Fig. 3. Factorial correspondence analysis (FCA) based on the genotypes at 12 microsatellite loci of 70 *P. passerinii* individuals from France, Spain and Italie (see Table 1 for sampling codes).



The unrooted tree based on allele-sharing distances among MLGs showed four groups (I, II, III and IV, Fig. 4) giving some information on the way the 31 unique and 3 common MLGs were clustered. First, all MLGs found in Spain (diamond) were grouped together in the Group I, as well as all MLGs detected in South-Western France (open circle) which three of them (the common ones named MLG22, MLG16 and MLG29) were also detected in Centre-Western France. While the majority of MLGs found in Eastern France (filled circle) were most clustered in the same Group IV with only two MLGs (MLG 26 and MLG 27) associated to Group I, MLGs detected in Centre-Western France (grey circle) were distributed across the entire tree. We also should notice that MLGs from Italy were associated to Centre-Western MLGs and divided between clusters II and III.



**Fig. 4.** Neighbour-joining tree based on the shared allele distances between multilocus genotypes (MLGs) calculated with 12 microsatellite loci. Only one individual per MLG was used.

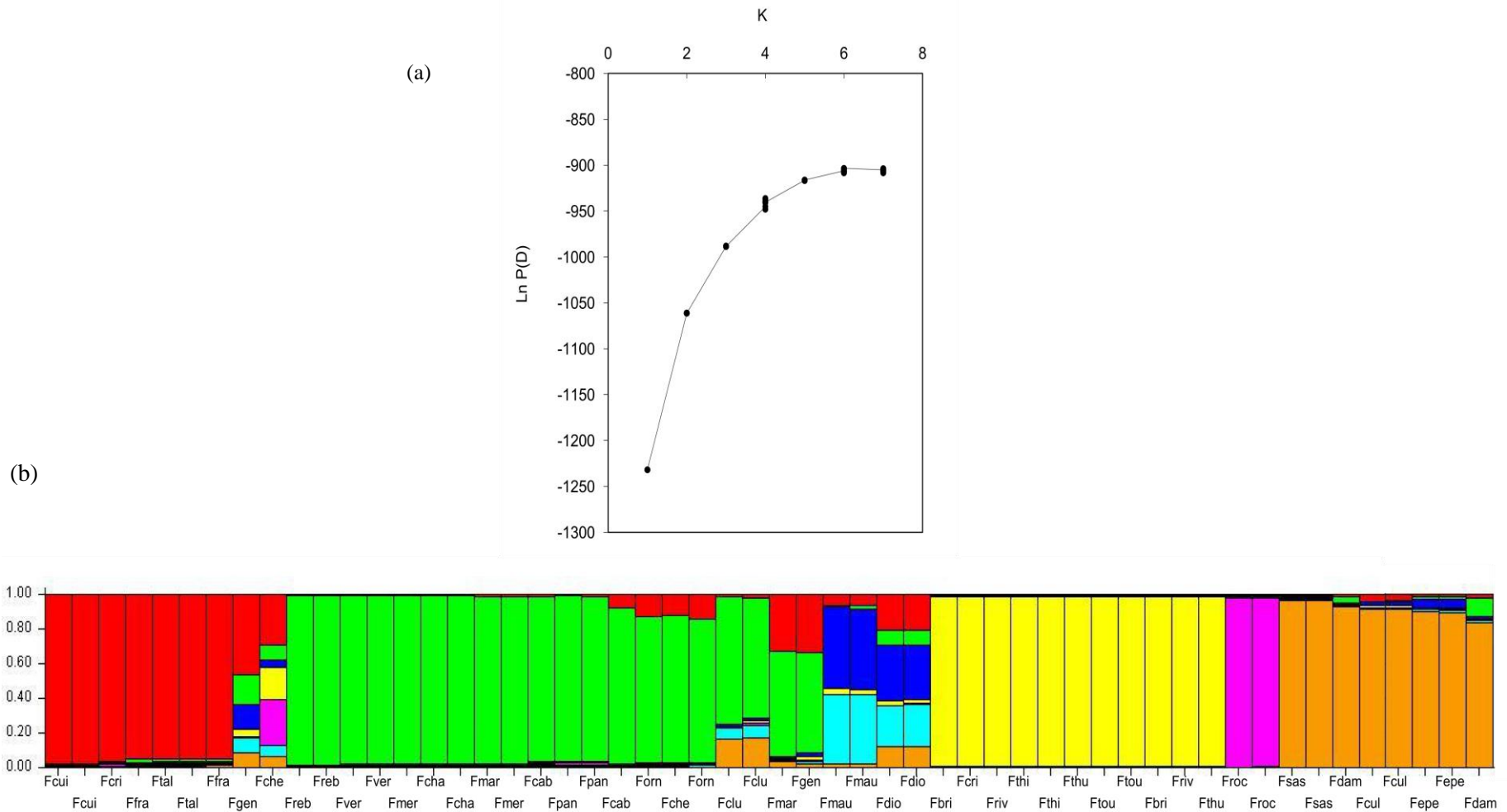
There was no evidence for significant Hardy-Weinberg deviation in each of the three analysed French “regions”, suggesting the absence of a within region substructure. However, between-region genetic subdivision reached a global  $F_{ST}$  equal to 0.112 and 0.039 using all individuals and one representative per each 31 MLG respectively, and it was significantly different from zero after bootstrap process. Furthermore, using all 54 French individuals, all pairwise region differentiation estimates (pairwise  $F_{ST}$ ) ranged from 0.096 to 0.140 with all being significant ( $P < 0.0167$ ) after Bonferroni correction for multiple tests, while South-western and Centre-Western France were not significant anymore when only one representative per MLG was analysed (Table 7).

**Table 7** Pairwise  $F_{ST}$  between all pairs of French ‘regions’ (containing a total of 27 localities) using all individuals of *Phloeomyzus passerinii* (below diagonal) as well as with one representative per multilocus genotype (MLG) for each region (above diagonal). Significant  $F_{ST}$  values are in bold as showed a p-value lower than 0.0167 (indicative adjusted nominal level (5%) for multiple comparisons).

French ‘regions’	South-western France	Eastern France	Centre-western France
	<i>One individual per genotype</i>		
<i>All individuals</i> South-western France	-	<b>0.076</b>	0.032
Eastern France	<b>0.109</b>	-	<b>0.025</b>
Centre-western France	<b>0.140</b>	<b>0.096</b>	-

In order to infer population structure to multilocus individual genotypes using STRUCTURE, we obtained posterior probabilities for different assumed numbers of subpopulations K. The likelihood increased up to  $K = 7$ , showing that our data are best explained by a division on 7 clusters (Fig. 5). All the individuals from South-Western France were grouped into the same ‘green’ cluster that also included eight individuals from Centre-Western France (2 Fcha, 2 Fmar, 2 Feb, 1 Fche, 1Fgen). The ‘red’ cluster was also an admixture of individuals from Eastern France (2 Fcui, 2Ffra and 2 Ftal) and from Centre-Western France (one individual from Fcri). However, two of the seven clusters were entirely composed of individuals from Centre-Western France: the ‘yellow’ cluster and the ‘pink’ one, which was only represented by the two individuals collected from La Roche-Clermault (Froc with the MLG33). Another cluster was also consistent with geographic location since aphids came from the same Eastern region: the ‘brown’ cluster with individuals from Fsas, Fcul, Fdam and Fepe. Interestingly, some individuals were difficult to be assigned to a particular cluster: two individuals from Centre-Western France, Fche (n°33 on Fig. 5) and Fgen (n°40), and the two individuals included in the two ‘blue’ clusters (one aphid from Fdio in Centre-Western and the two other aphids from Fmau in Centre-Western France).

**Fig. 5** Results from the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE for 70 individuals of *Phloeomyzus passerinii*: (a) Mean of likelihood  $\text{Ln}P(D)$  over 10 *Structure* runs for successive  $K$  values (from 1 to 7); (b) Genetic clustering of the 70 individuals, assuming seven population clusters ( $K = 7$ ). Each individual is represented by a vertical line, which is partitioned into  $K$  coloured segments that represent the individuals's estimated membership fractions in  $K$  clusters.



**Acknowledgments** This work is a part of the PhD thesis of S. Poiteau carried out under the directorship and supervision of F. Lieutier with the participation of S. Bankhead-Dronnet as a co-supervisor. It was supported by grants from the French Ministry of Agriculture, Food and Fisheries (MAAP) and the French Ministry of Research and Education (MER). We are grateful to collectors having contributed to aphid sampling (Table 1). We thank D. de Feraudy (Université d'Orléans) for his assistance in molecular biology and E. Magnoux (INRA-Orléans) for her help with the ABI-3100 automatic sequencer.



# Conclusion générale

---



En s'insérant dans la problématique générale des insectes ravageurs émergents en milieu forestier, ce travail de thèse visait à comprendre les processus à l'origine de l'émergence et de l'expansion des pullulations et des dégâts d'un puceron indigène, *Phloeomyzus passerinii*, sur une essence autochtone, le peuplier. Il s'agissait notamment d'éclaircir la biologie de l'insecte et ses interactions avec son hôte et de déterminer si les pullulations étaient liées à des conditions environnementales favorisant des populations locales ou à l'expansion vers le nord de populations méridionales. Ce travail devait aussi apporter les bases du développement de méthodes de prévision des risques et de prévention des dégâts en peupleraies. Nous avons abordé cette problématique en adoptant une approche pluridisciplinaire. Une première approche, centrée sur les interactions entre le peuplier et *P. passerinii*, a mis en évidence le mode d'alimentation du puceron, l'impact de la résistance du peuplier sur les préférences et les performances du puceron. Une seconde approche, modélisatrice, a évalué le lien entre le réchauffement climatique et les pullulations soudaines et spectaculaires de *P. passerinii* tout en considérant l'arbre hôte, et a prédit les risques pour les zones non infestées. Enfin, une approche génétique a retracé l'histoire évolutive des populations du puceron pour déterminer leur origine géographique et les liens entre foyers d'infestations.

Je présenterai d'abord une synthèse des résultats, en les resituant en regard des objectifs de l'étude et en discutant leurs limites. Je présenterai ensuite les perspectives de ce travail, pour remédier à certaines limites de l'étude et pour ouvrir de nouvelles pistes de recherches.

## SYNTHESE

Les résultats ont répondu aux objectifs que nous nous étions fixés. D'une part, ils ont mis en évidence un modèle particulier d'interaction arbre-puceron qui pourrait expliquer l'originalité des dégâts du puceron lanigère du peuplier. D'autre part, ils ont montré que les pullulations spectaculaires de puceron lanigère pouvaient s'expliquer par une action combinée de deux facteurs environnementaux, la température et l'arbre hôte, sur les performances des populations locales. Bien que les populations issues des grandes régions populicoles apparaissent globalement bien différenciées, cette étude révèle cependant qu'il ne faut pas négliger une certaine connexion entre régions résultant d'évènements de dispersion sur de longues distances. Enfin, nous pouvons proposer des bases pour le développement de méthodes de prévision des risques et de prévention des dégâts.

### ❖ Particularités des interactions peuplier – puceron lanigère

L'étude détaillée du mode d'alimentation ainsi que l'analyse des performances du puceron et de son comportement alimentaire sur des génotypes de sensibilité variée a conduit à une meilleure connaissance des interactions peuplier – puceron lanigère. Des informations ont été apportées sur les

étapes de la colonisation de l'hôte et sur la manière dont les facteurs de la résistance du peuplier pouvaient affecter le processus de colonisation.

Nous avons mis en évidence que *P. passerinii* s'alimentait de manière continue dans un tissu non vasculaire : le parenchyme cortical. Le cheminement des stylets du puceron dans les tissus corticaux s'effectue de manière directe selon un passage intra- et intercellulaire au cours duquel le stylet traverse les cellules du parenchyme cortical de part en part, probablement en ingérant leur contenu. La présence du suber à la surface de l'écorce implique que la sélection du site d'insertion des stylets s'effectue sans piqûres gustatives brèves, lesquelles se déroulent généralement au niveau des cellules de l'épiderme (Powell 1991 ; Tjallingii & Hogen-Esch 1993). La présence d'une gaine salivaire non ramifiée, d'un trajet intra- et intercellulaire direct et l'absence de piqûres intracellulaires (potentiel drop, Tjallingii 1985b) suggèrent que *P. passerinii* n'oriente pas particulièrement ses stylets pour rechercher un site d'alimentation favorable. L'adéquation de l'arbre est donc potentiellement perçue avant l'insertion des stylets ou au cours de leur cheminement dans le parenchyme cortical lors de la traversée des cellules ou de l'apoplaste. Le puceron maintient ensuite une phase d'alimentation soutenue dans le parenchyme cortical, ce qui caractérise l'acceptation de l'hôte. Toutefois, l'étude n'a pas pu conclure sur le mécanisme permettant au puceron de maintenir une ingestion soutenue dans un tissu non vasculaire tel que le parenchyme cortical.

Nous avons aussi montré que les génotypes de peuplier affectaient les performances du puceron lanigère de manière multifactorielle, en influant sur sa capacité de fixation, sa vitesse de développement larvaire et sa fécondité. Ce résultat suggère que divers facteurs de résistance, à propriétés antibiotiques et antixénotiques peuvent affecter le processus de colonisation. Parmi les trois génotypes de peuplier que nous avons étudiés en détail, des propriétés antibiotiques et antixénotiques ont été mises en évidence au niveau du parenchyme cortical. La qualité nutritionnelle du génotype, la présence de métabolites secondaires ou la mise en place d'une réponse hypersensible dans le parenchyme peuvent être évoquées mais nous ne sommes pas, pour le moment, en mesure de conclure sur les mécanismes de résistance impliqués. De plus, nos résultats ne nous ont pas permis de révéler de propriétés antixénotiques de surface, certainement en raison du faible nombre de génotypes testés. Il est probable néanmoins que des caractéristiques physiques ou des composés organiques volatils présents dans l'écorce de certains génotypes puissent gêner ou empêcher l'acceptation de l'arbre comme hôte potentiel avant même l'insertion des stylets du puceron.

Enfin, nous n'avons pas pu définir les conséquences du mode d'alimentation de *P. passerinii* sur les tissus corticaux de peuplier. En conditions naturelles cependant, des nécroses corticales sont observées (DSF 2006), qui pourraient résulter de l'induction d'une réaction hypersensible. Ce type de réaction de défense est en effet communément observé au niveau des tissus lignifiés suite à une blessure mécanique ou une infestation aphidienne (cf. Chapitre I, partie 1 § 1.2.2.3). Le niveau de résistance d'un arbre pourrait alors être lié à sa capacité à mettre en place rapidement et efficacement

ce type de réponse. En outre, cette étude a montré que l'existence d'une réponse hypersensible est une hypothèse possible pour expliquer la résistance du génotype euraméricain 'Brenta'.

D'un point de vue évolutif, le comportement alimentaire de *P. passerinii* apparaît atypique vis-à-vis de la plupart des autres pucerons et autres hémiptères Sternorrhynches, qui sont pour la plupart phloémophages et dont les stylets cheminent de manière intercellulaire, s'orientant jusqu'au phloème grâce à la perception de la composition des tissus périphériques lors des piqûres intracellulaires (Raven 1983 ; Tjallingii 1985b ; Tjallingii & Hogen-Esch 1993). La comparaison des signaux EPG chez les Sternorrhynches montre des comportements différents mais qui semblent refléter les liens de parenté évolutive des organismes au sein de ce vaste groupe (von Dohlen & Moran 1995 ; Sauvion & Rahbé 1999). Le comportement alimentaire de *P. passerinii* se distingue d'abord de celui des thrips qui détruisent les nombreuses cellules du mésophylle en s'alimentant de leur contenu (Kindt et al. 2003). Il se distingue également de celui des aleurodes qui effectuent peu de piqûres intracellulaires (Janssen et al. 1989). Enfin, il diffère également des cochenilles et des pucerons, dépourvus de chémorécepteurs à l'extrémité des stylets (Wensler & Filshie 1969), qui effectuent des piqûres intracellulaires moyennement fréquentes et brèves (20 s) pour les premiers, et très fréquentes et brèves (5-15 s) pour les seconds (Tjallingii 1985b ; Tjallingii & Hogen-Esch 1993 ; Calatayud et al. 1994).

Les pucerons dont les stylets restent localisés dans le parenchyme cortical au niveau des parties lignifiées induisent généralement la formation d'un tissu nourricier dans lequel ils s'alimentent de manière continue (cf. Chapitre I, partie 1 § 1.1.5). Chez les Aphididae, ce comportement alimentaire s'apparente à celui des pucerons phloémophages (e.g. *Eriosoma lanigerum*, Sandanayaka et al. 2003). En revanche, chez les Adelgidae plus primitifs, le comportement alimentaire présente certaines particularités communes à *P. passerinii*, comme l'absence de piqûres intracellulaires et la présence d'ondes EPG spécifiques liées à une alimentation soutenue dans le parenchyme cortical (Cardoso 2007). Finalement, la position systématique basale des Phloeomyzinae au sein des Aphididae mise en évidence par notre étude phylogénétique nous a permis de proposer que ce mode d'alimentation particulier de *P. passerinii* est vraiment primitif, probablement antérieur à l'apparition de la phloémophilie stricte chez les pucerons Aphididae.

### ❖ Processus d'émergence et d'expansion des pullulations

Les deux facteurs environnementaux que nous avons étudiés, température et arbre hôte, semblent avoir été des facteurs déterminants de l'émergence et de l'expansion des pullulations en France. D'après les projections du modèle, le risque d'infestation semble accru lorsque l'indice GIR moyen pour au moins un point du département est supérieur à 45. Selon cette hypothèse, le Sud-Ouest du pays était donc climatiquement favorable aux pullulations avant 1996, bien qu'aucun dégât n'ait été

enregistré alors. Cette apparente contradiction s'explique par l'utilisation massive à partir des années 1990 de génotypes euraméricains très sensibles au puceron lanigère, en particulier le génotype 'I214'. A partir de 1989, la zone climatiquement favorable aux pullulations s'est étendue vers le nord. Le gradient décroissant Sud-Nord de climat favorable, combiné à la présence de génotypes moins sensibles au nord, peut expliquer l'émergence des pullulations dans le Sud-Ouest, suivi d'une expansion vers le Nord. Enfin, la superposition de la zone climatiquement favorable aux pullulations à celle des trois principales zones popuicoles permet de délimiter convenablement la zone actuelle de pullulation en France.

Cette étude a néanmoins certaines limites. En raison de contraintes matérielles, les performances du puceron lanigère ont pu être évaluées seulement pour quatre températures. Son optimum de développement n'a pas pu être déterminé avec précision, conduisant à une surestimation du nombre de générations, ce qui a certainement eu un impact sur les projections du modèle pour les quatre scénarii de réchauffement climatique. De plus, notre modèle a considéré que la croissance des populations de *P. passerinii* était constante au cours de la période active. Or, la dynamique des populations de pucerons des arbres se caractérise par une évolution saisonnière de leur densité marquée par deux pics d'abondance, un à la fin du printemps et un plus ou moins marqué à l'automne suivis d'une chute d'abondance à la saison estivale, ce qui résulte principalement de facteurs densité-dépendants liés à la compétition intraspécifique (cf. Chapitre I, partie 1 § 1.1.4). Enfin, des études sur *Elatobium abietinum* ont montré que la phénologie et le taux de mortalité hivernale des formes anholocycliques sont des facteurs déterminants de la dynamique des populations de pucerons (Powell & Parry 1976 ; Westgarth-Smith et al. 2007). Une prise en compte de ces paramètres qui dépendent directement de la température aurait certainement amélioré les prédictions du modèle.

Concernant l'approche génétique, les marqueurs mitochondriaux ont permis de valider le statut spécifique de l'ensemble des populations échantillonnées en France, en Espagne et en Italie et ont permis, malgré une faible variabilité, de révéler huit haplotypes. L'isolement de loci microsatellites a conduit à la mise au point de 12 marqueurs polymorphes. Le développement et l'utilisation de ces marqueurs a révélé, à l'échelle française, une importante diversité génétique, avec 28 génotypes multiloci pour un total de 54 individus. L'utilisation des marqueurs microsatellites a aussi montré que deux individus issus d'un même arbre dans certaines localités n'avaient pas nécessairement les mêmes génotypes multiloci. Ce résultat suggère une intervention non négligeable de la reproduction sexuée au cours du cycle de vie de *P. passerinii*, des phénomènes de recombinaison ou la coexistence de lignées associées à des variants de cycle de vie. Toutefois, une étude supplémentaire avec un échantillonnage plus important (plusieurs individus récoltés sur des arbres différents au sein d'une même peupleraie, et ceci pour plusieurs peupleraies d'une même région) serait nécessaire pour conclure sur cet aspect de la biologie du puceron.

D'autre part, la comparaison des caractéristiques génétiques des foyers d'infestation a mis en évidence une différenciation génétique entre pucerons provenant des grandes régions populières. Toutefois, ces résultats doivent être nuancés puisque lorsque les analyses étaient réalisées avec un seul individu par génotype multiloci, les régions Centre-Ouest et Sud-Ouest n'étaient plus différenciées significativement, ce qui souligne bien que la présence de multiples copies clonales peut biaiser les indices de diversité et de structure génétiques dans les études sur les organismes parthénogénétiques. Les analyses bayésiennes préliminaires de structure génétique ont montré qu'il existait des clusters bien différenciés génétiquement entre eux, composés d'individus issus de la même région populière, que l'on pourrait identifier comme de 'vraies' populations (deux populations dans la région Centre-Ouest et une population dans la région Est), sous réserve d'un plus grand nombre d'individus analysés par arbre. Certains de ces clusters concordent d'ailleurs avec nos résultats mitochondriaux montrant un partage d'un même haplotype mitochondrial. Néanmoins, cette étude a aussi mis en évidence des clusters constitués d'individus provenant de régions populières différentes, notamment un groupe présentant un mélange d'individus issus des régions Centre-Ouest et Sud-Ouest, un autre regroupant des individus du Centre-Ouest et de l'Est. La présence de groupes cohérents avec la géographie suggère qu'il existe des flux de gènes faibles et donc un certain isolement de ces populations. Une faible dispersion des individus due à l'absence de formes parthénogénétiques ailées chez cette espèce, qui limite nécessairement la dispersion pendant la période active du puceron (Mars à Novembre), pourrait expliquer ce relatif isolement. En revanche, l'existence de groupes constitués d'individus issus de différentes régions souligne que l'on ne peut pas exclure des événements de dispersion à longue distance, notamment entre la région Centre-Ouest et les deux autres régions (i.e. Sud-Ouest et Est). L'absence de connexions entre les régions Sud-Ouest et Est peut s'expliquer par la présence du Massif Central et l'absence de peupliers entre ces deux zones. La dispersion peut être réalisée par les individus ailés sexués à l'automne. Enfin, comme c'est souvent le cas pour les espèces ravageuses forestières, le transport d'arbres infestés et abattus pour être exploités peut aussi jouer un rôle, d'autant que les grumes peuvent rester longtemps au sol dans la nouvelle région et ainsi constituer un foyer de départ. Il serait ainsi intéressant de réaliser des tests biologiques complémentaires à nos études génétiques en analysant la capacité de vol et de dispersion passive des larves et des ailés par le vent chez cette espèce.

Les localités européennes étudiées en complément, ont permis de montrer que les populations espagnoles étaient relativement proches génétiquement des populations du Sud-Ouest de la France, en dépit de la présence des Pyrénées séparant les deux régions. On peut se demander si les populations du Sud-Ouest de la France ne seraient pas issues d'individus provenant de populations espagnoles, et si des individus ne seraient pas remontés progressivement vers le Nord de la France. Le contraire est aussi envisageable. Pourtant, on se serait attendu à ce que les Pyrénées constituent une barrière géographique naturelle aux flux de gènes, mais au vu des résultats il n'en paraît rien. De même, les

individus issus des deux localités italiennes sont plus proches génétiquement de ceux du Centre-Ouest de la France que de l'Est. La dispersion liée au transport de bois semblerait être l'hypothèse la plus probable dans ces cas de figure. Par conséquent, il serait intéressant d'augmenter la taille de l'échantillonnage dans les différents pays concernés afin d'approfondir les connaissances sur l'histoire évolutive et l'origine des populations de *P. passerinii* en France et en Europe.

Suite aux résultats de modélisation du GIR et de génétique, nous sommes en mesure de conclure finalement que l'émergence et l'expansion des populations de *P. passerinii* sont dus à des populations locales favorisées successivement par un réchauffement du climat, l'augmentation des surfaces populeuses et l'utilisation de génotypes sensibles. Il ne faut toutefois pas négliger l'existence de dispersions à longue distance qui pourraient être imputables aussi bien à la dispersion naturelle du puceron qu'au transport de bois.

#### ❖ **Apport de l'étude à la prévision des risques et à la prévention des dégâts**

D'une manière générale, nos résultats confirment le caractère général sensible de *Populus nigra* et des hybrides euraméricains (en particulier 'I214), en comparaison des autres espèces ou hybrides de peupliers (*P. deltoides*, *P. trichocarpa*, *P. x interamericana*). Néanmoins, nos travaux ont révélé une gamme de sensibilité variée au sein des hybrides euraméricains. Ainsi, en analysant seulement deux génotypes euraméricains de sensibilité contrastée, nous avons ainsi pu mettre en évidence des propriétés antixénétiques et antibiotiques impliquant des mécanismes de résistance distincts. De plus, le criblage de génotypes en laboratoire s'est avéré concordant avec les résultats au champ en ce qui concerne des critères simples d'évaluation des niveaux de résistance tels que performances démographiques et taux de colonisation du puceron. Ces résultats, combinés aux nombreuses possibilités d'hybridation qu'offre le peuplier, ouvrent des perspectives favorables au développement de génotypes de peuplier résistants, par le biais de la sélection variétale.

Par ailleurs, les pullulations de puceron lanigère résultant d'une amélioration des conditions environnementales qui favorisent des populations locales, l'amélioration des conditions environnementales leur permettrait certainement d'atteindre un niveau épidémique. A l'heure actuelle, l'absence de pullulations à l'extrême Nord du pays, alors même que la présence de la plante hôte n'est pas un facteur limitant, peut s'expliquer par un climat plutôt défavorable. Néanmoins, la présence importante dans cette zone de génotypes interaméricains peu sensibles ( $\approx 50\%$ ) limite le risque. Nos résultats soulignent l'intérêt de conserver une forte diversité génotypique dans les peupleraies.

Dans l'état actuel de nos connaissances, en combinaison avec les données de l'arbre hôte, le modèle GIR peut s'avérer un outil utile pour prédire les zones à risques. Toutefois, compte tenu de ses limites déjà discutées et du fait que les changements environnementaux agissent de manière complexe

et multifactorielle, il paraît nécessaire de poursuivre les recherches pour développer un modèle plus fiable.

Enfin, la mise en évidence d'une certaine connexion entre foyers d'infestation potentiellement liée à des transports de bois souligne l'importance d'une vigilance accrue du transport des grumes. Cette surveillance doit non seulement s'effectuer à l'échelle nationale mais également pour les grumes provenant des pays limitrophes de la France qui sont également d'important producteurs de bois de peuplier.

## PERSPECTIVES

### ❖ Interactions peuplier – puceron lanigère

Bien que les interactions entre *P. passerinii* et son hôte soient maintenant mieux comprises, plusieurs points restent à élucider, notamment les mécanismes de résistance susceptibles d'affecter les processus de colonisation. Comprendre l'origine des différences de performance du puceron selon les génotypes de peuplier nous semble une voie de recherche à prospecter, dans le but d'utiliser les mécanismes de résistance en sélection variétale. Il serait intéressant à ce sujet de tester l'impact de la composition en acides aminés et de certains métabolites secondaires du parenchyme cortical sur les préférences et les performances du puceron. De nombreux composés phénoliques présents dans l'écorce de peuplier sont en effet impliqués dans les mécanismes de défense contre les phytophages, agissant comme inhibiteurs de digestion, ou par leur action toxique ou dissuasive (Philippe & Bohlmann 2007). Il faudrait également vérifier l'implication d'une réponse hypersensible dans la résistance du génotype 'Brenta', puisque cette dernière pourrait résulter d'une interaction gène-pour-gène. Ainsi, elle pourrait présenter non seulement un grand intérêt pour la sélection variétale, mais aussi pour l'étude des mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires de la résistance au puceron chez une essence ligneuse forestière. Il serait intéressant aussi d'élargir la gamme de critères de sélection variétale en réalisant une étude combinant les données physiologiques et EPG sur une gamme de génotypes plus large, afin de mettre en évidence une éventuelle antixénose de surface et identifier les mécanismes de résistance correspondants. Ceci permettrait de limiter le processus de colonisation du puceron avant l'insertion des stylets. Enfin, il semblerait judicieux d'élucider les mécanismes d'ingestion soutenue dans le parenchyme cortical, des difficultés de mise en place d'un tel mécanisme pouvant être impliquées dans les propriétés antixénotiques du peuplier.

Comme nous l'avons déjà évoqué, le comportement alimentaire de *P. passerinii* pourrait induire une réaction de défense dans les tissus corticaux du peuplier, contribuant aux différences de sensibilité entre génotypes. Les nécroses corticales déjà rapportées pourraient être ainsi consécutives à la mise en place d'une réaction hypersensible induite par l'alimentation du puceron. Toutefois, parallèlement à

ces réactions de défense, certains pucerons sont capables d'induire des modifications tissulaires favorisant leur développement. La vitesse de formation et d'extension des lésions observées suite aux attaques de *P. passerinii* pourraient donc aussi bien aboutir à une dégradation qu'à une amélioration du substrat pour l'insecte et, de ce fait, indiquer aussi bien une résistance qu'une sensibilité du peuplier. Une étude combinant des approches histologiques et histochimiques est ainsi menée actuellement au laboratoire afin de caractériser les modifications tissulaires et biochimiques qu'engendrent les attaques des individus de *P. passerinii* chez son arbre hôte, en parallèle à l'examen des performances de ceux-ci. Les premiers résultats de cette étude montrent que *P. passerinii* induit des modifications tissulaires améliorant la qualité de son substrat nutritif, comme le suggèrent les meilleures performances de l'insecte sur des peupliers ayant déjà subi une infestation (dire la période) (Deprost E. rapport de Master 2 ; Dardeau F, thèse en cours). Si ces résultats se confirment, il se pourrait que les performances du puceron mesurées sur certains génotypes aient été quelque peu sous-estimées. De même, il faudrait vérifier que les ondes EPG ne soient pas modifiées ou qu'il n'existe pas d'ondes en lien avec la mise en place de ce tissu nourricier.

Par la suite, une étude qui testerait l'héritabilité de la résistance avec un nombre de génotypes plus important pour chaque espèce et hybride de peuplier pourrait être envisagée. Dans ce cadre, il serait intéressant d'estimer l'impact du puceron sur les populations naturelles de *P. nigra* qui, comme le confirme notre étude, semble particulièrement sensible. Cela faciliterait la mise en évidence de génotypes de *P. nigra* résistants au puceron et donc utilisables pour l'amélioration des génotypes euraméricains et permettrait de connaître les risques encourus au niveau des ripisylves et forêts alluviales où cette essence est fréquemment représentée.

#### ❖ **Prévision des risques de pullulations**

Bien que la température semble être un facteur déterminant de l'émergence et l'expansion des dégâts de puceron lanigère en France, plusieurs points restent encore à étudier afin d'affiner les modalités d'utilisation de ce facteur dans la prédiction des risques. Il serait notamment utile de clarifier les liens unissant la hausse des températures et la réponse densité dépendante des populations. En effet, la compétition intraspécifique, générée par l'abondance croissante des individus, pourraient conduire à une réduction de leur taille et par suite à une réduction significative de la fécondité, qu'il serait important de considérer pour pondérer la réponse démographique du puceron à la température. Dans la mesure où il n'y a pas de morphe parthénogénétique ailé chez *P. passerinii*, l'impact de la compétition intraspécifique sur le taux de migration n'apparaît pas en revanche être un facteur important à considérer. Enfin, il serait également intéressant, à l'aide d'une étude combinant des approches biologique et génétique utilisant les marqueurs microsatellites, de tester la présence de variants de cycle de vie chez *P. passerinii* et leur distribution à l'échelle de la France. S'il s'avère qu'il

n'y en a pas, la part relative de la reproduction sexuée et de la reproduction parthénogénétique pourrait être estimée en fonction de la température. En complément, il faudrait également recueillir des informations sur le taux de survie hivernale des individus parthénogénétiques et la phénologie du puceron. Ceci permettrait de mieux appréhender localement la réponse démographique du puceron à la température en connaissant la part de la reproduction parthénogénétique dans son cycle de vie, la contribution potentielle des individus parthénogénétiques à la première génération de printemps et la durée de la période active du puceron. Si ces paramètres pouvaient être facilement mesurables à l'aide d'indicateurs simples, il pourrait alors être aisé de les intégrer dans un modèle plus complet aboutissant à des prédictions plus réalistes.

Le niveau de sensibilité des génotypes de peuplier est également apparu comme un facteur déterminant de l'émergence et de l'expansion des dégâts de puceron. Il est donc essentiel de considérer le niveau de sensibilité au puceron des futurs génotypes. Néanmoins, l'expression phénotypique de la résistance résultant de l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux, il serait également utile de connaître l'effet de ces derniers sur la physiologie de la résistance. Des sécheresses plus fréquentes et plus intenses, accompagnant la hausse des températures, pourraient avoir un impact important sur le niveau de résistance des arbres et par conséquent sur les performances du puceron. La capacité de réponse des peupliers à la sécheresse devrait alors être prise en compte dans les critères de sélection variétale des futurs génotypes.

Enfin, d'autres paramètres, en dehors de ceux que nous avons étudiés, pourraient constituer de bons candidats pour être intégrés dans un modèle de prédiction des risques de dégâts dans un contexte de changements environnementaux. C'est le cas de l'action de la température sur les prédateurs et parasitoïdes du puceron mais également de la réponse de ces parasitoïdes à une augmentation de la densité de pucerons.

### ❖ Etude génétique

Les résultats présentés dans l'étude de diversité et de structure génétique des populations ne sont que des résultats préliminaires. Il serait intéressant d'approfondir ces analyses en augmentant la taille de l'échantillonnage afin de mieux évaluer la diversité génétique à l'échelle d'un arbre (voire même en échantillonnant à différentes hauteurs), à l'échelle d'une même peupleraie et également pour une même région populicole avec plusieurs peupleraies. De plus, s'il s'avère que pour de telles échelles d'étude, la variabilité aux 12 loci n'est pas suffisante, il est envisageable de tester le polymorphisme d'autres loci parmi les nombreux autres microsatellites isolés chez *P. passerinii*.

Enfin, il serait intéressant d'utiliser les marqueurs microsatellites pour compléter cette étude en réalisant une analyse de la structure génétique en relation avec l'arbre hôte, en analysant en parallèle le niveau de performance (agressivité) de certains génotypes multiloci de puceron. Cela

permettrait de tester l'hypothèse de la présence de races d'hôte ou de biotypes. En particulier, il pourrait être intéressant d'évaluer le niveau de différenciation génétique existant entre populations de pucerons se développant sur les hybrides cultivés en peupleraies et les populations vivant sur l'hôte naturel *P. nigra* dans les zones de ripisylve. La mise en évidence de races d'hôte permettrait d'évaluer avec précisions si les populations vivant dans les zones de ripisylve peuvent facilement passer sur des peupliers cultivés et vice-versa. L'existence de races d'hôte adaptées à des génotypes différents de peuplier cultivés soulignerait aussi l'intérêt d'utiliser une forte diversité variétale en peupleraie pour limiter les populations de puceron.

# Références bibliographiques

---



- Abbot P, Withgott JH (2004) Phylogenetic and molecular evidence for allochronic speciation in gall-forming aphids (*Pemphigus*). *Evolution*, **58**, 539–553.
- Agrell J, McDonald EP, Lindroth RL (2000) Effects of CO<sub>2</sub> and light on tree phytochemistry and insect performance. *Oikos*, **88**, 259-272.
- Alfaro-Tapia A, Verdugo JA, Astudillo LA, Ramírez CC (2007) Effect of epicuticular waxes of poplar hybrids on the aphid *Chaitophorus leucomelas* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Applied Entomology*, **131**, 486-492.
- Allegro G (1997) Nuove infestazioni di Afide lanigero del pioppo (*Phloeomyzus passerinii* Sign.) in Pianura Padana. *Sherwood Foreste ed alberi oggi*, **27**, 41-45.
- Allegro G, Cagelli L (1996) Susceptibility of *Populus nigra* L. to the woolly poplar aphid (*Phloeomyzus passerinii* Sign.). *Forest Genetics*, **3**, 23-26.
- Allegro G, Augustin S, Delplanque A, Giorcelli A, Steenackers M, Pinon J (1995) Interdisciplinary research for poplar improvement (Task 2 ‘Genetics of resistance and virulence: molecular, biochemical and conventional approaches’. Sub-Task 2.3 ‘Biochemical markers’). AIR1-CT92-0.349. *Final Technical Report*, 79-110.
- Allegro G, Picco F, Bianco B (1996) Resistance behavior to *Phloeomyzus passerinii* of some recently-selected Italian poplar clones. In: *Proceedings of the 20<sup>th</sup> session of the International Poplar Commission, part I, Budapest, Hungary*, 199-208.
- Almeida RPP, Backus EA (2004) Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae): EPG waveform characterization and quantification. *Annals of the Entomological Society of America*, **97**, 838-851.
- Alsop FJ, Laughlin TF (1991) Changes in spruce-fir avifauna of Mt. Guyout, Tennessee 1967-1985. *Journal of the Tennessee Academy of Science*, **66**, 207-209.
- Alspach PA, Bus VGM (1999) Spatial variation of woolly apple aphid (*Eriosoma lanigerum*, Hausmann) in a genetically diverse apple planting. *New Zealand Journal of Ecology*, **23**, 39-44.
- Alston FH, Briggs JB (1970) Inheritance of hypersensitivity to rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* in apple. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, **12**, 257-258.
- Alvarez AE, Tjallingii WF, Garzo E, Vleeshouwers V, Dicke M, Vosman B (2006) Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing Solanum species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **121**, 145-157.
- Alverson DR, English WR (1990) Dynamics of pecan aphids, *Monelliopsis pecanis* and *Monellia caryella*, on field-isolated single leaves of pecan. *Journal of Agricultural Entomology*, **7**, 29-38.
- Amman GD, Speers CF (1965) Balsam woolly aphid in the southern Appalachians. *Journal of Forestry*, **63**, 18-20.
- Andrewartha HG, Birch LC (1954) *The distribution and abundance of animals*. Chicago University Press, Chicago.
- Andrewartha HG, Birch LC (1984) *The ecological web: More on the distribution and abundance of animals*. Chicago University Press, Chicago.
- Annala E (1969) Influence of temperature upon the development and voltinism of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Annales Zoologici Fennici*, **6**, 161-27.
- Aparisi C (1971) Noticia sobre el afido lanigero del chopo *Phloeomyzus passerinii* Signoret, y ensayos para su tratamiento. *Plagas Forestales*, 3-11.
- Arimura G-I, Huber DPW, Bohlmann J (2004) Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (–)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *The Plant Journal*, **37**, 603-616.

- Armstrong A (2000) National Trials Network: preliminary results and update. In: *Rotation Coppice and Wood Fuel Symposium: from research to renewable energy*, Forestry Commission (eds Armstrong A, Claridge J), pp. 12-15. Edinburgh, Forest Research, Farnham, Surrey.
- Arru GM (1974) Metodo per valutare la resistenza dei pioppi all'Afide lanigero (*Phloeomyzus passerinii* Sign.). *Cellulosa e Carta*, **25**, 45-49.
- Arru GM, Lapietra G (1979) Breeding poplars for resistance to insect pests. In: *Proceedings of the Meeting Concerning Poplars in France and Belgium*, Orléans, Geraardsbergen.
- Arzone A (1987) Contributo alla conoscenza dei limitatori di *Phloeomyzus passerinii* (Sign.). *Annali Accademia di Agricoltura di Torino*, **129**, 139-158.
- Arzone A, Vidano C (1984) Indagini su *Phloeomyzus passerinii* (Sign.) in Piemonte. *Annali della Facolta di Scienze Agrari della Universita degli Studi di Torino*, **13**, 337-356.
- Asante SK, Danthanarayana W, Heatwole H (1991). Bionomics and population growth statistics of apterous virginoparae of woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum*, at constant temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **60**, 261-270.
- Auclair JL (1963) Aphid feeding and nutrition. *Annual Review Entomology*, **8**, 439-490.
- Augustin S (1991) Relations *Melasoma* (Coleoptera, Chrysomelidae) peupliers de la section Leuce (Salicaceae). Etude de quelques facteurs physiques et chimiques impliqués dans l'alimentation et le développement de ces insectes. Thèse de doctorat, Université d'Orléans, France.
- Augustin S, Courtin C, Delplanque A (1993) Poplar clones effect on development, mortality, and fecundity of *Chrysomela* (= *Melasoma*) *populi* L. and *Chrysomela tremulae* F. (Col., Chrysomelidae). *Journal of Applied Entomology*, **116**, 39-49.
- Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, **47**, 817-844.
- Ayres MP, Lombardero MJ (2000) Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens. *The Science of the Total Environment*, **262**, 263-286.
- Backus EA, Hunter WB, Arne CN (1988) Technique for staining leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) salivary sheath and eggs within unsectioned plant tissue. *Journal of Economic Entomology*, **81**, 1819-1823.
- Bakke A (1983) Host tree and bark beetle interaction during a mass outbreak of *Ips typographus* in Norway. *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, **96**, 118-125.
- Balch RE (1952) Studies on the Balsam woolly aphid, *Adelges piceae* (Ratz.) and its effects on balsam fir, *Abies balsamea* (L.) Mill. Canada Department of Agriculture, Vol. 867.
- Balch RE, Clark J, Bonga JM (1964) Hormonal action in production of tumours and compression wood by an aphid. *Nature*, **22**, 721-722.
- Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID *et al.* (2002) Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, **8**, 1-16.
- Bale JS, Ponder KL, Pitchard J (2007) Coping with stress. In: *Aphids as crop pests* (eds van Emden HF, Harrington R), pp. 287-310. CAB International, Wallingford.
- Ball J, Carle J, Del Lungo A (2005) Contribution of poplars and willows to sustainable forestry and rural development. *Unasylva*, **221**, 3-9.
- Balloux F, Lehmann L, de Meeûs T (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics*, **164**, 1635-1644.
- Barbosa P, Schaefer PW (1997) Comparative analysis of patterns of invasion and spread of related Lymantriids. In: *Forests and Insects* (eds Watt AD, Stork NE, Hunter MD), pp. 153-176. Cambridge University Press, UK.
- Barnéoud C, Bonduelle P, Dubois JM (1982) Manuel de populiculture. *Association Forêt-Cellulose*, Paris.

- Barrio, E., Latorre, A., Moya, A., 1994. Phylogeny of the *Drosophila obscura* species group deduced from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **39**, 478–488.
- Battisti A, Stastny M, Netherer S, Robinet C, Schopf A, Roques A, Larsson S (2005) Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures. *Ecological Application*, **15**, 2084-2096.
- Baubet O (2007) Bilan de la santé des forêts en 2006. Le puceron lanigère du peuplier étend son aire de répartition. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris.
- Baubet O, Carouille F (2009) Bilan de la santé des forêts en 2008. Peupleraie française : entre rouille et puceron lanigère, l'inquiétude demeure. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris.
- Baubet O, Goudet M (2010) Bilan de la santé des forêts en 2009. Situation du puceron lanigère en 2009. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris.
- Behura SA (2006) Molecular marker systems in insects : current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, **15**, 3087-3113.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2001) GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Berg EE, Henry JD, Fastie CL, De Volder AD, Matsuoka SM (2006) Spruce beetle outbreaks on the Kenai Peninsula, Alaska, and Kluane National Park and Reserve, Yukon Territory: Relationship to summer temperatures and regional differences in disturbance regimes. *Forest Ecology and Management*, **227**, 219-232.
- Bernays EA, Chapman RF (1994) Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, NY.
- Berryman AA (1981) Effect of site characteristics on insect population dynamics. In: *XVII UFRO World Congress, Japan*, 541-549.
- Berryman AA (2002) Population cycles, the case for trophic interactions. Oxford University Press, Oxford.
- Bezemer TM, Jones TH, Knight KJ (1998) Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on populations of the peach potato aphid *Myzus persicae* and its parasitoid *Aphidius matricariae*. *Oecologia*, **116**, 128–135.
- Bezemer TM, Knight KJ, Newington JE, Jones TH (1999) How general are aphid responses to elevated CO<sub>2</sub>? *Annals of the Entomological Society of America*, **92**, 724-730.
- Bidart-Bouzat MG, Imeh-Nathaniel A (2008) Global change effects on plant chemical defences against insect herbivores. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**, 1339-1354.
- Biddle PG, Tinsley TW (1967) Virus diseases of forest trees. In: Report on *Forest Research, commonwealth, Forest Institute, Oxford*, 156-159.
- Biggs J B (1967) Sources of pest resistance in the genus *Malus*. *Report of East Malling Research Station for 1966*, 166-169.
- Biggs AR (1985) Suberized boundary zones and the chronology of wound response in tree bark. *Phytopathology*, **75**, 1991-1195.
- Biggs AR (1992) Anatomical and physiological responses of bark tissues to mechanical injury. In: *Defense mechanisms of woody plants against Fungi* (Eds. Blanchette RA, Biggs AR), pp. 13-40. Springer-Verlag, Berlin.
- Biggs AR, Merrill W, Davis DD (1984) Discussion: response of bark tissues to injury and infection. *Canadian Journal of Forest Research*, **14**, 351-356.
- Birch LC (1948) The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology*, **17**, 15-26.
- Blackman RL (1974) Life-cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bulletin of Entomological Research*, **63**, 595-607.
- Blackman RL, Eastop VF (1994) Aphids on the World's Trees: an Identification and Information Guide. CAB International in association with The Natural History Museum, Wallingford.
- Blackman RL, Eastop VF (2000) Aphids on the World's crops: an Identification and Information Guide. Wiley and Sons, New York.

- Blackman RL, Eastop VF (2006) Aphids on the World's herbaceous plants and shrubs. Wiley and Sons, Hoboken
- Blackman RL, Eastop VF (2007) Taxonomic issues. In: *Aphids as crop pests* (eds van Emden HF, Harrington R), pp. 1-29. CAB International, Wallingford.
- Blackman RL, Spence JM (1996) Ribosomal DNA is frequently concentrated on only on X chromosome in permanently apomictic aphids, but this does not inhibit male determination. *Chromosome Research*, **4**: 314-320.
- Blytt HJ, Guscar TK, Butler LG (1988) Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. *Journal of Chemical Ecology*, **14**, 1455-1465.
- Boerner C, Schilder FA (1932) Aphidoidea, blattläuse. *Sorauer's Handbuch der Pflanzenkrankheiten*, **5**, 551-673.
- Bonani JP, Fereres A, Garzo E, Miranda MP, Appezzato-Da-Gloria B, Lopes JRS (2010) Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **134**, 35-49.
- Braendle C, Davis GK, Brisson JA, Stern DL (2006) Wing dimorphism in aphids. *Heredity*, **97**, 192-199.
- Broadway RM, Duffey SS (1986) Plant proteinase-inhibitors –mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect physiology*, **32**, 827-833.
- Broberg CL, Borden JH, Gries R (2005) Olfactory and feeding preferences of *Cryptorhynchus lapathi* L. (Coleoptera: Curculionidae) among hybrid clones and natural poplars. *Environmental Entomology*, **34**, 1606-1613.
- Broberg CL, Borden JH (2005) Hybrid poplar clones with *Populus maximowiczii* parentage demonstrate postoviposition antibiosis to *Cryptorhynchus lapathi* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, **98**, 2254-2259.
- Brown MW, Glenn DM, Wisniewski ME (1991) Functional and anatomical disruption of apple roots by the woolly apple aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, **84**, 1823-1826.
- Bumroongsook S, Harris MK (1991) Nature of conditioning effect on pecan by the blackmargined aphid. *Southwestern Entomologist*, **16**, 267-275.
- Caillaud CM, Pierre JS, Chaubet B, Pietro JP (1995) Analysis of wheat resistance to the cereal aphid *Sitobion avenae* using electrical penetrations graphs and flow charts combined with correspondence analysis. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **75**, 9-18.
- Caillaud CM, Niemeyer HM (1996) Possible involvement of the phloem sealing system in the acceptance of a plant as host by an aphid. *Experientia*, **52**, 927-931.
- Calatayud PA, Rahbé Y, Tjallingii WF, Tertuliano M, Le Rü B (1994) Electrically recorded feeding behaviour of cassava mealybug on host and non-host plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **72**, 219-232.
- Campbell DC, Dreyer DL (1990). The role of plant matrix polysaccharides in aphid-plant interactions. In: *Aphid-Plant Genotype Interactions* (eds Campbell RK, Eikenbary RD), pp. 149-170. Elsevier, Amsterdam.
- Campbell A, Frazer BD, Gilbert N, Gutierrez AP, Mackauer M (1974) Temperature requirements of some aphids and their parasites. *Journal of Applied Ecology*, **11**, 431-438.
- Cardoso JT (2007) Morfologia, bioecologia e comportamento alimentar de *Pineus boernerii* Annand, 1928 (Hemiptera: Adelgidae) em *Pinus* spp. (Pinaceae). Dissertation, University Federal of Paraná, Brazil.
- Carroll AL, Régnière J, Logan J, Taylor SW, Bentz BJ, Powell JA (2006) Impacts of climate change on range expansion by the mountain pine beetle. Mountain Pine Beetle Initiative Working Paper 2006-14, Canada.
- Carter CI (1977) Impact of green spruce aphid on growth: can a tree forget its past? Forestry Commission. Research and Development Paper 116, Edinburgh.
- Chapman RF, Bernays EA, Simpson SJ (1981) Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odors. *Journal of Chemical Ecology*, **7**, 881-888.
- Chararas C (1979) Ecophysiologie des insectes parasites des forêts. Chararas, Paris.

- Chodjai M (1977) Poplar pests of Iran and the Mideast. In: *Proceedings: symposium on eastern cottonwood and related species*. Greenville, Mississippi (eds Thielges BA, Land SB Jr), pp. 295-300. Louisiana State University Division of Continuing Education. Baton Rouge, USA.
- Cholodkovsky NA (1921) [Note on the Poplar Aphid, *Schizoneura passerinii*.] *Bulletin Sub-Section Control Plant Pests attached to the Petrograd Committee of Rural Economy*, **2**, 3-6.
- Clarke HRG, Lawrence SD, Flakerud J, Korhnaek TE, Gordon MP, Davis JM (1998) Chitinase accumulates systematically in wounded poplar trees. *Physiologia Plantarum*, **103**, 154-161.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1659.
- Coeur d'Acier A, Joussetin E, Martin J-F, Rasplus JY (2006) Phylogeny of the genus *Aphis* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **42**, 598-611.
- Coeur d'Acier A, Cocuzza G, Joussetin E, Cavalieri V, Barbagallo S (2007) Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Zoologica Scripta*, **37**, 175-193.
- Cole RA (1994) Locating a resistance mechanism to the cabbage aphid in two wild Brassicas. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **71**, 23-31.
- Coley PD, Bryant JP, Chapin FS (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**, 895-899.
- Collins CM (2001) Aspects of the ecology of two stem-feeding willow aphid species. PhD thesis. Berkshire.
- Collins CM, Leather SR (2001) Effect of temperature on fecundity and development of the Giant Willow Aphid, *Tuberolachnus Salignus* (Sternorrhyncha: Aphididae). *European Journal of Entomology*, **98**, 177-182.
- Collins CM, Fellowes MDE, Sage RB, Leather SR (2001a) Host selection and performance of the giant willow aphid, *Tuberolachnus salignus* Gmelin - implications for pest management. *Agricultural and Forest Entomology*, **3**, 183-189.
- Collins CM, Rosado RG, Leather SR (2001b) The impact of the aphids *Tuberolachnus salignus* and *Pterocomma salicis* on willow trees. *Annals of Applied Biology*, **138**, 133-140.
- Constabel CP, Major IT (2005) Molecular biology and biochemistry of induced insect defense in *Populus*. In: *Recent Advances in Phytochemistry, Vol. 39 Chemical Ecology and phytochemistry of Forest Ecosystems* (ed. Romeo J), pp. 119-143. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Constabel CP, Yip L, Patton JJ, Christopher ME (2000) Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, **124**, 285-295.
- Coyle DR, Mc Millin JD, Hall RB, Hart ER (2002) Cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) defoliation impact on *Populus* growth and aboveground volume in a short-rotation woody crop plantation. *Agricultural and Forest Entomology*, **4**, 293-300.
- Coyle DR, Nebeker TE, Hart ER, Mattson WJ (2005) Biology and management of insect pests in North American intensively managed hardwood forest systems. *Annual Review of Entomology*, **50**, 1-29.
- Crandall KA, Templeton AR (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, **134**, 959-969.
- Crane MB, Greenslade RM, Masee AM, Tydeman HM (1936) Studies on the resistance and immunity of apples to the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausm.). *Journal of Pomology*, **14**, 137-163.
- Crozier L, Dwyer G (2006) Combining population-dynamic and ecophysiological models to predict climate-induced insect range shifts. *American Naturalist*, **167**, 853-866.
- Cummins JN, Forsline PL, Mackenzie JD (1981) Woolly apple aphid colonization on *Malus* cultivars. *Journal of American Society of Horticultural Science*, **106**, 26-30.

- Dale VH, Joyce LA, McNulty S, Neilson RP (2000) The interplay between climate change, forests, and disturbance. *The Science of the Total Environment*, **262**, 201-204.
- Dale VH, Joyce LA, McNulty S *et al.* (2001) Climate change and forest disturbances. *Bioscience*, **51**, 723-734.
- Day KR, Leather SR (1997) Threats to forestry by insect pests in Europe. In: *Forests and Insects* (eds Watt AD, Stork NE, Hunter MD), pp. 177-206. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dedryver CA, Le Gallic JF, Gauthier JP, Simon JC (1998) Life cycle of the cereal aphid *Sitobion avenae* F.: polymorphism and comparison of life history traits associated with sexuality. *Ecological Entomology*, **23**, 123-132.
- Dedryver C-A, Hullé M, Le Gallic J-F, Caillaud MC, Simon J-C (2001) Coexistence in space and time of sexual and asexual populations of the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Oecologia*, **128**, 379-388.
- Delfino MA (2005) Checklist of aphid-plant associations in Peru. *Ecología Aplicada*, **4**, 143-148.
- Della Beffa G (1936) Contributo alla conoscenza degli insetti parassiti dei pioppi. II *Phloeomyzus passerinii* Sign. (Afidelanidero dei pioppi). *Bolletino Laboratorio Sperimentale e Osservatorio Fitopatologia*, **13**, 17-23.
- Delplanque A (1998) Les insectes associés aux peupliers. INRA-MEMOR, Bruxelles, Belgique.
- DeLucia EH, Casteel CL, Nability PD, O'Neill BF (2008) Insects take a bigger bite out of plants in a warmer, higher carbon dioxide world. *PNAS*, **105**, 1781-1782.
- Dixon AFG (1969) Population dynamics of the sycamore aphid *Drepanosiphum platanoides* (Schr.) (Hemiptera: Aphididae): Migratory and trivial flight activity. *Journal of Animal Ecology*, **38**, 585-606.
- Dixon AFG (1970) Quality and availability of food for a sycamore aphid population. In: *Animal Populations in Relation to their food Resources* (ed. Watson A), pp. 271-287. Blackwell Science, Oxford.
- Dixon AFG (1971a) The role of aphids in wood formation. I. The effect of the sycamore aphid, *Drepanosiphum platanoides* (schr.) (Aphididae), on the growth of sycamore, *Acer pseudoplatanus* (L.). *Journal of Applied Ecology*, **8**, 165-179.
- Dixon AFG (1971b) The role of aphids in wood formation. II. The effect of the lime aphid, *Eucallipterus tiliae* L. (Aphididae), on the growth of lime, *Tilia x vulgaris* Hayne. *Journal of Applied Ecology*, **8**, 393-399.
- Dixon AFG (1971c) The role of intra-specific mechanisms and predation in regulating the numbers of the lime aphid, *Eucallipterus tiliae* L. *Oecologia*, **8**, 179-193.
- Dixon AFG (1990) Evolutionary aspects of parthenogenetic reproduction in aphids. *Acta phytopathology and Entomology Hungarica*, **25**, 41-56.
- Dixon AFG (1997) Adaptations of phytophagous insects to life on trees, with particular reference to aphids. In: *Forests and Insects* (eds Watt AD, Stork NE, Hunter MD), pp. 1-14. Chapman & Hall, London.
- Dixon AFG (1998) Aphid ecology, an optimization approach. Chapman & Hall, London.
- Dixon AFG (2003) Climate change and phenological asynchrony. *Ecological Entomology*, **28**, 380-381.
- Dixon AFG (2005) Insect herbivore-host dynamics: tree-dwelling aphids. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dixon AFG, Kindlmann P, Jarošik V (1995) Body size distribution in aphids: relative surface area of specific plant structures. *Ecological Entomology*, **20**, 111-117.
- Dixon AFG, Kindlmann P, Sequeira R (1996) Population regulation in aphids. In: *Frontiers of population ecology* (eds Floyd RB, Sheppard AW, De Barros), pp. 103-114. CSIRO, Melbourne.
- Dixon AFG, Wellings PW, Carter C, Nichols (1993) The role of food quality and competition in shaping the seasonal cycle in the reproductive activity of the sycamore aphid. *Oecologia*, **95**, 89-92.
- Docherty M, Hurst DK, Holopainen JK, Whittaker JB, Lea PJ, Watt AD (1996) Carbon dioxide-induced changes in beech foliage cause female beech weevil larvae to feed in a compensatory manner. *Global Change Biology*, **2**, 335-341.
- Docherty M, Wade FA, Hurst DK, Whittaker JB, Lea PJ (1997) Responses of tree sap-feeding herbivores to elevated CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology*, **3**, 51-59.
- Donaldson JR, Lindroth RL (2008) Effects of variable phytochemistry and budbreak phenology on defoliation of aspen during a forest tent caterpillar outbreak. *Agricultural and Forest Entomology*, **10**, 399-410.

- Doom D, Hille Ris Lambers D (1962) Over het massaal voorkomen van de Schimmelluis *Phloeomyzus redelei* HRL op populieren in 1961 in Nederland. *Nederlands Bosbouw tijdschr*, **34**, 202-208.
- Douglas AE (1998) Nutritional interactions of insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review Entomology*, **43**, 17-37.
- Douglas AE (2003) The nutritional physiology of aphids. *Advances in Insect Physiology*, **31**, 73-140.
- Douglas AE, van Emden HF (2007) Nutrition and symbiosis. In: *Aphids as crop pests* (eds van Emden HF, Harrington R), pp. 115-134. CAB International, Wallingford.
- Dreyer DL, Jones KC, Jurd L, Campbell BC (1987) Feeding deterrence of some 4-hydroxycoumarins and related compounds: relationship to host-plant resistance of alfalfa towards pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Journal of Chemical Ecology*, **13**, 925-930.
- DSF, Département Santé des Forêts (2006) Information santé des forêts. Puceron lanigère du peuplier. Ministère de l'Agriculture et de la pêche, Paris.
- DSF, Département Santé des Forêts (2007) Puceron lanigère du peuplier. Avertissement santé des forêts N°07-02. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris.
- Duffey SS, Stout MJ (1996) Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of insect Biochemistry and physiology*, **32**, 3-37.
- Eastop VF (1973) Deductions from the present day host plants of aphids and related insects. In: *Insect/plant relationships, Vol. 6* (ed. van Emden HF), pp. 157-178. London symposium of the Royal Entomological Society.
- Eckenwalder JE (1996) Systemics and evolution of *Populus*. In: *Biology of Populus and its implications for management and conservation, Part II, Ch.19*. (eds Stettler RF, Bradshaw HD Jr, Heilman PE, Hinckley TM), pp. 7-30. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa.
- Edmunds GF, Alstad DN (1978) Coevolution in insect herbivores and conifers. *Science*, **199**, 941-945.
- EEA (2004) Impacts of Europe's changing climate. An indicator-based assessment. European Environment Agency, Copenhagen, pp 107 [http://www.eea.europa.eu/publications/climate\\_report\\_2\\_2004](http://www.eea.europa.eu/publications/climate_report_2_2004)
- EEA (2008) Impacts of Europe's changing climate. European Environment Agency report, EEA Briefing 3/2008, URL, [http://www.eea.europa.eu/publications/briefing\\_2008\\_3](http://www.eea.europa.eu/publications/briefing_2008_3).
- Esau K (1977) Anatomy of seed plants. John Wiley & Sons, NY.
- Esper J, Büntgen U, Franck D, Nievergelt D, Liebhold A (2007) 1200 years of regular outbreaks in alpine insects. *Proceedings of the Royal Society B*, **276**, 671-679.
- Estoup A, Angers B (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. In: *Advances in molecular ecology* (ed. Carvalho GR), pp. 55-86. IOS Press, Amsterdam.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.
- FAO (2001) Global Forest Resources Assessment 2000. Main Report. FAO Forestry Paper 140, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 479 pp.
- Favret C, Voegtlin DJ (2004) Speciation by host-switching in pinyon *Cinara* (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**, 139-151.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10**, 315-319.
- Felton GW, Donato KK, Broadway RM, Duffey SS (1992) Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of diatery-protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, **38**, 277-285.
- Fereres A, Moreno A (2009) Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus research*, **141**, 158-168.
- Fergusson JWH (2002) On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*, **75**, 509-516.

- Fernandes GW (1990) Hypersensitivity: a neglected plant resistance mechanism against insect herbivores. *Environmental Entomology*, **19**, 1173–1182.
- Folland CK, Karl TR, Christy JR *et al.* (2001) Observed climate variability and change. In: *The scientific basis. Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (eds Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ *et al.*), pp. 99-181. Cambridge University Press. Cambridge.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294-299.
- Forneck A, Kleinmann S, Blaich R, Anvari SF (2002). Histochemistry and anatomy of phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) nodosities on young roots of grapevine (*Vitis* spp). *Vitis*, **41**, 93-97.
- Frantz A, Plantegenest M, Mieuze L, Simon J-C (2006) Ecological specialization correlates with genotypic differentiation in sympatric host-populations of the pea aphid. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 392-401.
- Frelich LE (2002) Forest dynamics and disturbance regimes: studies from temperate evergreen – deciduous forests. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gao N, Foster RG, Hardie J (2000) Two opsin genes from the vetch aphid, *Megoura viciae*. *Insect Molecular Biology*, **9**, 197–202.
- Garuphalos I, Tsitsones K (1965) *Phloeomyzus [Phloeosinus] passerinii* in Poplar plantations in Greece. *Das. Chron*, **7**, 420-248.
- Giliomee JH, Strydom DK, van Zyl HJ (1968) Northern Spy, Merton and Malling-Merton rootstocks susceptible to woolly aphid, *Eriosoma lanigerum*, in the Western Cape. *South African Journal of Agricultural Science*, **11**, 183–186.
- Giordanengo P (2009) EPG-Calc 4.9, a php program to calculate EPG parameters. Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France. <http://www.u-picardie.fr/PCP/UTIL/epg.php>
- Goudet J (1995) FSTAT (vers 1.2) : A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
- Granett J, Walker MA, Kocsis L, Omer AD (2001) Biology and management of grape phylloxera. *Annual Review of Entomology*, **46**, 387-412.
- Grimaldi D, Engels MS (2005) Evolution of the insects, Cambridge University Press, UK.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum Likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696–704.
- Gulmon SL, Mooney HA (1986) Costs of defense and their effects on plant productivity. In: *Economy of Plant form and Function* (ed. Givnish TJ), pp. 681–698. Cambridge University Press, Cambridge.
- Haack L, Simon J-C, Gauthier J-P, Plantegenest M, Dedryver C-A (2000) Evidence for predominant clones in a cyclically parthenogenetic organism provided by combined demographic and genetic analyses. *Molecular Ecology*, **9**, 2055-2066.
- Habib R, Ghani M (1970) Eriosomatinae on poplars and their natural enemies in West Pakistan. Technical *Bulletin, Commonwealth Institute of Biological Control*, **13**, 58.
- Hale BK, Bale JS, Pritchard J, Masters GJ, Brown V (2003) Effects of host plant drought stress on the performance of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.): a mechanistic analysis. *Ecological Entomology*, **28**, 666-677.
- Hales DF, Tomiuk J, Wöhrmann K, Sunnucks P (1997) Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: a review. *European Journal of Entomology*, **94**, 1–55.
- Halkett F, Simon, J-C, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**, 194-201.
- Hall WJ (1928) Notes on the Aphididae of Egypt. *Bulletin, Ministry of Agriculture, Egypt*, 68.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.

- Halperin J (1981) Use of trunk injections for pest control on ornamental trees in Israel. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie*, **3**, 294-297.
- Hance T, van Baaren J, Vernon P, Boivin G (2007) Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *Annual Review of Entomology*, **52**, 107-126.
- Hardie J, Isaacs R, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1994) Methyl salicylate and (-)-(1R,5S)-myrtenal are plant derived repellents for black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. (Homoptera: Aphididae). *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 2847-2855
- Harrell MO, Benjamin DM, Berbee JG, Burkot TR (1981) Evaluation of adult cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta* (Coleoptera: Chrysomelidae), feeding preference for hybrid poplars. *Great Lakes Entomologist*, **14**, 181-184.
- Harrewijn P, Tjallingii WF, Mollema C (1996) Electrical recording of plant penetration by western flower thrips. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **79**, 345-353.
- Harrewijn P, Piron PGM, Ponsen MB (1998) Evolution of vascular feeding in aphids: an electrophysiological study. *Experimental and Applied Entomology*, **9**, 29-34.
- Harrington R, Bale JS, Tatchell GM (1995) Aphids in a changing climate. In: *Insects in a changing environment* (eds Harrington R, Stork NE), pp. 125-155. Academic Press, New York.
- Harrington R, Woiwod I, Sparks T (1999) Climate change and trophic interactions. *TREE*, **14**, 146-150.
- Harrington R, Fleming RA, Woiwod IP (2001) Climate change impacts on insect management and conservation in temperate regions. *Agricultural and Forest Entomology*, **3**, 233-240.
- Harrington R, Clark SJ, Welhalm SJ *et al.* (2007) Environmental change and the phenology of European aphids. *Global Change Biology*, **13**, 1550-1564.
- Harry M, Solignac M, Lachaise D (1998) Molecular evidence for parallel evolution of adaptative syndromes in fig-breeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**, 542-551.
- Hatcher PE, Paul ND (1994) The effect of elevated UVB radiation on herbivory of pea by *Autographa gamma*. *Entomologica Experimentalis et Applicata*, **71**, 227-233.
- Havill NP, Footitt RG (2007) Biology and Evolution of Adelgidae. *Annual Review of Entomology*, **52**, 325-349.
- Havill NP, Raffa KF (1999) Effects of elicitation treatment and genotypic variation on induce resistance in *Populus*: Impacts on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) development and feeding behaviour. *Oecologia*, **120**, 295-303.
- Havill NP, Raffa KF (2000) Compound effects of induced plant responses on insect herbivores and parasitoids: implications for tritrophic interactions. *Ecological Entomology*, **25**, 171-179.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Serie B. Biological Science*, **270**, 313-321.
- Heidger CM, Lieutier F (2004) Possibility to utilize tree resistance to insects in forest pest management in central and western Europe. In: *Mechanisms and deployment of resistance in trees to insects* (eds Wagner MR, Clancy KM, Lieutier F, Paine TD), pp. 239-263. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Heie OE (1987) Palaeontology and phylogeny. In: *Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. 2A* (eds Minks AK, Harrewijn P), pp. 367-39. Elsevier, Amsterdam.
- Hemming JDC, Lindroth RL (1995) Intraspecific variation in aspen phytochemistry – effects on performance of gypsy moths and forest tent caterpillars. *Oecologia*, **103**, 79-88.
- Henry ML (2010) The constraints of selecting for insect resistance in plantation trees. *Agricultural and Forest Entomology*, **13**, 111-120.
- Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, **67**, 283-335.
- Hewer A, Will T, van Bel AJE (2008) How plants show aphids the way to sieve tubes. In: *Symposium Plant Interactions with Aphids and Other Insects with Piercing Mouthparts*, Wageningen.

- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247-276.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zone and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, **10**, 537-549.
- Hille Ris Lambers D (1931) Notes on the Aphididae of Venezia Tridentina, with descriptions of new species. Part II. *Memoria Museo Storia Naturale, Venezia Tridentina*, **1**, 29-38.
- Hille Ris Lambers D (1966) Polymorphism in Aphididae. *Annual Review of Entomology*, **11**, 47-78.
- Holopainen JK, Heijari J, Oksanen E, Alessi GA (2010) Leaf volatile emissions of *Betula pendula* during autumn coloration and leaf fall. *Journal of Chemical Ecology*, **36**, 1068-1075.
- Hori M (2007) Onion aphid (*Neotoxoptera formosana*) attractants, in the headspace of *Allium fistulosum* and *A. tuberosum* leaves. *Journal of Applied Entomology*, **131**, 8-12.
- Horváth G (1896) Eine alte und drei neue Aphiden-Gattungen. *Wiener Entomologische Zeitung*, Jahrg.
- Huelsenbeck JP, Rannala B (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, **76**, 227-232.
- Hullé M (1998) Les pucerons des arbres fruitiers – Cycle biologique et activité de vol. INRA Edition, Paris.
- Hullé M, Coeur d'acier A, Bankhead-Dronnet S, Harrington R (2010) Aphids in the face of global changes. *Comptes Rendus Biologies*, **333**, 497-503.
- Hwang S-Y, Lindroth RL (1997) Clonal variation in foliar chemistry of aspen: effects on gypsy moths and forest tent caterpillars. *Oecologia*, **111**, 99-108.
- Hoyt SC, Madsen HF (1960) Dispersal behavior of the first instar nymphs of the woolly apple aphid. *Hilgardia*, **30**, 267-299.
- Jackson DL, Dixon AFG (1996) Factors determining the distribution of the green spruce aphid, *Elatobium abietinum*, on young and mature needles of spruce. *Ecological Entomology*, **21**, 358-364.
- Jactel H, Menassieu P, Raise G (1994) Infestation dynamics of *Dioryctria sylvestrella* Ratz. (Lepidoptera: Pyralidae) in pruned maritime pine. *Forest Ecology and Management*, **67**, 11-22.
- Jactel H, Menassieu P, Raise G, Burban C (1996) Sensitivity of pruned maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) to *Dioryctria sylvestrella* Ratz. (Lepidoptera: Pyralidae) in relation to tree vigour and date of pruning. *Journal of Applied Entomology*, **120**, 153-157.
- Jactel H, Brockerhoff E, Duelli P (2005) A test of the biodiversity-stability theory: meta-analysis of tree species diversity effects on insect pest infestation, and re-examination of responsible factors. *Forest Diversity and Function*, **176**, 235-262.
- Jaenike J (1990) Host specialization in phytophagous insects, *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**, 243-273.
- Janssen JAM, Tjallingii WF, van Lenteren (1989) Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **52**, 69-81.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 424-429.
- Jarošik V, Dixon AFG (1999) Population dynamics of a tree-dwelling aphid: regulation and density-independent processes. *Journal of Animal Ecology*, **68**, 726-732.
- Jarvis A, Reuter HI, Nelson A, Guevara E (2006) Hole-filled seamless SRTM data V3, International Centre for Tropical Agriculture (CIAT). <http://srtm.csi.cgiar.org/>.
- Jeanneau Y (1968) Considérations sur la tumoration induite par *Eriosoma lanigerum* hausm. Sur *Pirus malus* L. et mise en évidence d'un gradient pathogène. *Bulletin de la Société Botanique de France*, **115**, 529-540.
- Jermiin L, Crozier RH (1994) The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution*, **38**, 282-294.

- Jones CG, Coleman JS (1991) Plant stress and insect herbivory: towards an integrated perspective. In: *Response of plants to multiple stresses* (eds Mooney HA, Winner WE, Pell AJ), San Diego.
- Jönsson AM, Harding S, Bärning L, Ravn HP (2007) Impact of climate change on the population dynamics of *Ips typographus* in southern Sweden. *Agricultural & Forest Meteorology*, **146**, 70-81.
- Jousselin E, Genson G, Coeur d'acier A (2010) Evolutionary lability of a complex life cycle in the aphid genus *Brachycaudus*. *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 295.
- Kainulainen P, Holopainen J, Palomäki V, Holopainen T (1996) Effects of nitrogen fertilization on secondary chemistry and ectomycorrhizal state of Scots pine seedlings and on growth of grey pine aphid. *Journal of Chemical Ecology*, **22**, 617-636.
- Karahroodi ZR, Sadeghi E & Azdo Z (2006) Study of differences between populations of mummy aphid *Phloeomyzus passerinii* Sign. on 21 clones of *Populus* in nursery. In: *IUFRO 8.01.03-Patterns and processes in forest landscape. Consequences of human management*.
- Kause A, Ossipov E, Haukioja E, Lempa K, Hanhimäki S, Ossipova S (1999) Multiplicity of biochemical factors determining quality of growing birch leaves. *Oecologia*, **120**, 102-112.
- Kaye JP, Hart SC (1997) Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology and Evolution*, **12**, 139-143.
- Kellow AV, Sedgley M, van Heeswijck R (2004) Interaction between *Vitis vinifera* and grape phylloxera: changes in root tissue during nodosity formation. *Annals of Botany*, **93**, 581-590.
- Kennedy JS, Booth CO, Kershaw WJS (1959) Host finding by aphids in the field: *Aphis fabae* Scop. (Gynoparae) and *Brevicoryne brassicae* L.; with a re-appraisal of the role of host finding behaviour in virus spread. *Annals of Applied Biology*, **47**, 424-444.
- Kennedy JS, Booth CO, Kershaw WJS (1961) Host finding by aphids in the field. III. Visual attraction. *Annals of Applied Biology*, **49**, 1-21.
- Kerslake JE, Kruuk LEB, Hartley SE, Woodin SJ (1996) Winter moth outbreaks on Scottish heather moorlands: effects of host plant and parasitoids on larval survival and development. *Bulletin of Entomological Research*, **86**, 155-164.
- Kidd NAC, Jervis MA (1997) The impact of parasitoids and predators on forest insect populations. In: *Forests and Insects* (eds Watt AD, Stork NE, Hunter MD), pp. 49-68. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kimmins FM (1986) Ultrastructure of the stylet pathway of *Brevicoryne brassicae* in host plant tissue, *Brassica oleracea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **41**, 283-290.
- Kimmins FM (1988) Transmission electron microscopy (TEM). In: *Aphids, their Biology, Natural Enemies and Control, Vol 2B* (eds Minks AK, Harrewijn P), pp 47-54. Elsevier, Amsterdam.
- Kimmins FM, Tjallingii WF (1985) Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **39**, 135-143.
- Kindlmann P, Dixon AFG (1989) Development constraints in the evolution of reproductive strategies: telescoping of generations in parthenogenetic aphids. *Functional Ecology*, **3**, 531-537.
- Kindlmann P, Dixon AFG (1996) Population dynamics of a tree-dwelling aphid: individuals to populations. *Ecological Modelling*, **89**, 23-30.
- Kingston KB, Powell KS (2007) Characterizing the root-feeding habits of grape Phylloxera using electrical penetration graph. In: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Grapevine Phylloxera Symposium* (eds Powell KS, Trethowan CJ). *Acta Horticultura*, **733**, 33-45.
- Kiritani K (2006) Predicting impacts of global warming on population dynamics and distribution of arthropods in Japan. *Population Ecology*, **48**, 5-12.

- Klein Tank AMG, Wijngaard JB, Können GP *et al.* (2002) Daily dataset of 20th-century surface air temperature and precipitation series for the European Climate Assessment. *International Journal of Climatology*, **22**, 1441–1453. <http://eca.knmi.nl>.
- Klepzig KD, Robinson DJ, Smalley EB, Raffa KF (1997) Effects of feeding by two folivorous arthropods on susceptibility of hybrid poplar clones to a foliar pathogen. *Great Lakes Entomologist*, **30**, 99-104.
- Klingler J, Powell G, Thompson GA, Isaacs R (1998) Phloem specific aphid resistance in *Cumis melo* line AR 5: effects on feeding and performance of *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **86**, 79-88.
- Kogan M, Ortman EF (1978) Antixenosis-A new term proposed to define Painter's "non-preference" modality of resistance. *Bulletin of the Entomological Society of America*, **24**, 175-176.
- Koricheva J (2002) Meta-analysis of sources of variation in fitness costs of plant antiherbivore defenses. *Ecology*, **83**, 176–190.
- Koricheva J, Larsson S, Haukioja E, Keinänen M (1998a) Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, **83**, 212-226.
- Koricheva J, Larsson S, Haukioja E (1998b) Insect performance on experimentally stressed woody plants: a meta-analysis. *Annual Review of Entomology*, **43**, 195-216.
- Kring JB (1972) Flight behaviour of aphids. *Annual Review of Entomology*, **17**, 461–492.
- Kumar R (1991) La lutte contre les insectes ravageurs : la situation de l'agriculture africaine. Edward Arnold Ltd, London.
- Kunkel H (1967) Systematische Übersicht über die Verteilung zweier Ernährungsformtypen bei den Sternorrhynchen (Rhynchota, Insecta). *Zeitschrift Angewandte Zoologie*, **54**, 37-74.
- Kurz WA, Dymond CC, Stinson G *et al.* (2008) Mountain pine beetle and forest carbon feedback to climate change. *Nature*, **452**, 987-990.
- Lange H, Økland B, Krokene P (2006) Thresholds in the life cycle of the spruce bark beetle under climate change. *Interjournal for Complex Systems*, **1648**, 1-10.
- Lapietra G, Allegro G (1990) Suscettibilità a *Phloeomyzus passerinii* Sign. dei cloni di pioppo coltivati in Italia. *Informatore Fitopatologico*, **40**, 41-44.
- Larsson S (1989) Stressful times for the plant stress-insect performance hypothesis. *Oikos*, **56**, 277–283.
- Larsson S (2002) Resistance in trees to insects. In: *Mechanisms and Deployment of resistance in trees to insects* (eds Wagner MR, Clancy KM, Lieutier F, Paine TD), pp.1-30. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Larsson S, Björkman C (1993) Performance of chewing and phloem-feeding insects on stressed trees. *Scandinavian Journal of Forest Research*, **8**, 550–559.
- Leclant F (1998) Les Homoptères Sternorrhyncha : I-Les pucerons, pp. 173-196. MEMOR, Bruxelles.
- Le Roux V, Dugravot S, Campan E, Dubois F, Vincent C, Giordanengo P (2008) Wild Solanum resistance to aphids: antibiosis or antixenosis? *Journal of Economic Entomology*, **101**, 584-591.
- Lett J-M, Granier M, Grondin M *et al.* (2001) Electrical penetration graphs from *Cicadulina mbila* on maize, the fine structure of its stylet pathways and consequences for virus transmission efficiency. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **101**, 93-109.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 203-221.
- Lichtenstein J (1886) Monographie des pucerons du peuplier. Imprimerie Centrale du Midi, Montpellier.
- Liebhold AM, McDonald WL, Bergdahl D, Mastro VC (1995) Invasions by exotic forest pests: a threat to forest ecosystems. *Forest Science Monographs*, **30**, 49.
- Lieutier F (2004) Host resistance to bark beetles and its variations. In: *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis* (eds Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire J-C, Evans HF). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

- Lieutier F (2006) Changing forest communities: role of tree resistance to insects in insect invasions and tree introductions. In: *Invasive forest insects, introduced forest trees, and altered ecosystems – Ecological pest management in global forests of a changing world* (ed. Paine TD), pp. 15-52. Springer, Dodrecht.
- Lieutier F, Berryman AA (1988) Preliminary histological investigations on the defense reactions of three pines to *Ceratocystis clavigera* and two chemical elicitors. *Canadian Journal of Forest Research*, **18**, 1243-1247.
- Lieutier F, Yart A, Garcia J, Ham M-C (1990) Cinétique de croissance des champignons associés à *Ips sexdentatus* Boern. et à *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera : Scolytidae) et des réactions de défense des pins sylvestres (*Pinus sylvestris* L.) inoculés. *Agronomie*, **10**, 243-256.
- Lindroth RL, Hemming JDC (1990) Responses of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) to tremulacin, an aspen phenolic glycoside. *Environmental Entomology*, **19**, 842-847.
- Lindroth RL, Hwang S-Y (1996) Clonal variation in foliar chemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.). *Biochemical Systematics and Ecology*, **24**, 357-364.
- Lindroth RL, Hsia MTS, Scriber JM (1987a) Characterization of phenolic glycosides from quaking aspen. *Biochemical Systematics and Ecology*, **15**, 677-680.
- Lindroth RL, Hsia MTS, Scriber JM (1987b) Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **15**, 681-686.
- Lindroth RL, Arteel GE, Kinney KK (1995) Responses of three saturniid species to paper birch grown under enriched CO<sub>2</sub> atmospheres. *Functional Ecology*, **9**, 306-311.
- Llewellyn M (1972) The effect of the lime aphid, *Eucallipterus tiliae* L. (Aphididae) on the growth of the lime, *Tilia x vulgaris* (Hayne). I. Energy requirements of the aphid population. *Journal of Applied Ecology*, **9**, 261-282.
- Llewellyn KS, Loxdale HD, Harrington R, Brookes CP Clark SJ, Sunnuck P (2003) Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites. *Molecular Ecology*, **12**, 21-34.
- Logan JA, Régnière J, Powell JA (2003) Assessing the impacts of global warming on forest pest dynamics. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **1**, 130-137.
- Lombaert E, Boll R, Lapchin L (2006) Dispersal strategies of phytophagous insects at a local scale: adaptative potential of aphids in an agricultural environment. *BMC Evolutionary Biology*, **6**, 75-88.
- Loomis WE (1932) Growth-differentiation balance vs carbohydrate-nitrogen ration. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, **29**, 240-245.
- Lorio PL (1986) Growth-differentiation balance: a basis for understanding southern pine beetle-tree interactions. *Forest Ecology and Management*, **14**, 259-273.
- Loustau D, Bosc A, Colin A *et al.* (2005) Modeling climate change effects on the potential production of French plains forests at the sub-regional level. *Tree Physiology*, **25**, 813-823.
- Loxdale HD (2001) Tracking flying insects using molecular markers. *Antenna*, **25**, 242-250.
- Loxdale HD, Lushai G (1998) Molecular markers in entomology. *Bulletin of entomological research*, **88**, 577-600.
- Loxdale HD, Lushai G (2007) Population genetic issues: the unfolding story using molecular markers. In: *Aphids as crop pests* (eds van Emden HF, Harrington R), pp. 31-67. CAB International, Wallingford.
- Lyth M (1985) Hypersensitivity in apple to feeding by *Dysaphis plantaginea*: effects on aphid biology. *Annals of Applied Biology*, **107**, 155-161.
- Macheix JJ, Fleuriot A, Jay-Allemand C (2005) Les composés phénoliques des végétaux – un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- Mackenzie JD, Cummins JN (1982) Differentiation of *Malus* clones into resistance classes by their effects on the biology of *Eriosoma lanigerum* Hausmn. *Journal of American Society of Horticultural Science*, **107**, 737-740.

- Mackenzie A, Dixon AFG (1991) An ecological perspective of host alternation in aphids (Homoptera: Aphidinea: Aphididae). *Entomologia Generalis*, **16**, 265-284.
- Malausa T, Gilles A, Megléc E *et al.* (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 638-644.
- Marchetti E, Civolani S, Leis M, Chicca M, Tjallingii WF, Pasqualini E, Baronio P (2009) Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs. *Bulletin of Insectology*, **62**, 203-208.
- Martin JF, Pech N, Megléc E *et al.* (2010) Representativeness of microsatellite distributions in genomes, as revealed by 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics*, **11**, 560.
- Margaritopoulos JT, Kasprovicz L, Malloch GL, Fenton B (2009) Tracking the global dispersal of a cosmopolitan insect pest, the peach potato aphid. *BMC Ecology*, **9**, 13.
- Martínez-Torres D, Buades C, Latorre A, Moya A (2001) Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **20**, 437-449.
- Mason W (1985) Clones to replace seedlings? *Forestry and British Timber*, **14**, 24-26.
- Mattson WJ, Haack RA (1987) The role of drought stress in provoking outbreaks of phytophagous insects. In: *Insect outbreaks* (eds Barbosa P, Schultz JC), pp. 365-407. Academic Press, San Diego.
- Mattson WJ, Lawrence RK, Haack RA, Herms DA, Charles PJ (1988) Defensives strategies of woody plants against different insect-feeding guilds in relation to plant ecological strategies and intimacy of association with insects. In: *Mechanisms of woody plant defenses against insects; search for pattern* (eds Mattson WJ, Léveux J, Bernard-Dagan C), Springer, NY.
- Mattson WJ, Hart EA, Volney WJA (2001) Insects pests of *Populus*: Coping with the inevitable. In: *Poplar culture in North America* (eds Dickmann DI, Isebrands JG, Eckenwalder JE, Richardson J), pp. 219-245. NRC Research Press, Ottawa, ON.
- Mattson WJ, Vanhanen H, Veteli T, Sivonen S, Niemela P (2007) Few immigrant phytophagous insects on woody plants in Europe: legacy of the European crucible? *Biological invasions*, **9**, 957-974.
- Maugard F (1996) Attaque d'un ravageur inhabituel dans le Sud-ouest de la France : le puceron lanigère du peuplier. Les cahiers du DSF, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris.
- Maugard F (2005) Principaux problèmes sanitaires des peupliers cultivés en France. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Département Santé des Forêts.
- Maugard F, Baubet O (2004) Bilan de la santé des forêts en 2003. Le puceron lanigère du peuplier accentue sa présence dans le Sud-Ouest et étend sa zone d'épidémie vers le Nord. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité, Paris.
- McCarty J (2001) Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology*, **15**, 320-331.
- McClintock JA (1930) The source of apple seed in relation to pestson seedlings. *Proceedings of American Society of Horticultural Science*, **27**, 120-123.
- McCloud ES, Berenbaum MR (1994) Stratospheric ozone depletion and plant-insect interactions: effects of UVB radiation on foliage quality of *Citrus jambhiri* for *Trichoplusia ni*. *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 525-539.
- McLean DL, Kinsey MG (1964) A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. *Nature*, **202**, 1358-1359.
- McLean DL, Kinsey MG (1984) The precibarial valve and its role in the feeding behaviour of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Annals of the Entomological Society of America*, **30**, 26-31.
- Meehl GA, Stocker TF, Collins WD *et al.* (2007) Global Climate Projections. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (eds Solomon S, Qin D, Manning M *et al.*). Cambridge University Press. Cambridge.
- Megléc E, Costedoat C, Dubut V *et al.* (2010) QDD : A user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, **26**, 403-404.

- Messenger PS (1959) Bioclimatic studies with insects. *Annual Review of Entomology*, **4**, 183-206.
- Meyer JS, Ingersoll CG, McDonald LL, Boyce MS (1986) Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology*, **67**, 1156-1166.
- Miles PW (1989a). The response of plants to the feeding of Aphidoidea: principles. In: *Aphids: their Biology, Natural Enemies and Control, vol. 2C* (eds Minks AK, Harrewijn P), pp.1-21. Elsevier, Amsterdam.
- Miles PW (1989b) Specific responses and damage caused by Aphidoidea. In: *Aphids: their Biology, Natural Enemies and Control, Vol 2C* (eds Minks AK, Harrewijn P), pp. 23-47. Elsevier, Amsterdam.
- Miles PW (1990) Aphid salivary secretions and their involvement in plant toxicoses. In: *Aphid-Plant genotype interactions* (eds Campbell RK, Eikenbary RD), pp. 131-147. Elsevier, Amsterdam.
- Miles PW (1999) Aphid saliva. *Biological Reviews*, **74**, 41-85.
- Miller NJ, Kift NB, Tatchell GM (2005) Host-associated populations in the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius* (L.). *Heredity*, **94**, 556-564.
- Miranda MP, Fereres A, Appezzato-da-Gloria B, Lopes JRS (2009) Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalogonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa* in citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **130**, 35-46.
- Mittler TE (1954) The feeding and nutrition of aphids. PhD thesis, University of Cambridge, UK.
- Moharramipour S, Rajabi-Mazhar N, Sadeghi SE (2004) A comparison of population parameters of woolly poplar aphid *Phloeomyzus passerinii* Sign. on twelve poplar clones. *Journal of the Entomological Society of Iran*, **24**, 116-122.
- Mopper S (1996) Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 235-238.
- Moran NA (1988) The evolution of host plant alternation in aphids: the evidence for specialization as a dead end. *American naturalist*, **132**, 681-706.
- Moran NA (1990) Aphid life cycles: two evolutionary steps. *American Naturalist*, **136**, 135-138.
- Moran NA (1992) The evolution of aphid life cycles. *Annual Review of Entomology*, **37**, 321-348.
- Mordvilko A (1908) Beiträge zur biologie der pflanzenläuse, Aphididae Passerinii. *Biologische Zentralblatt*, **28**, 631-638.
- Mordvilko A (1934) On the evolution of aphids. *Arch Naturgesch*, **3**, 1-60.
- Morot-Gaudry JF (1997) Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Quae.
- Muller-Starck G, Zeihe M (1992) Genetic variation in European populations of forest trees, J.D. Sauerlander's Verlag, Frankfurt am Main.
- Müllick DB (1977) The non-specific nature of defense in bark and wood during wounding, insect and pathogen attack. *Recent Advances in Phytochemistry*, **11**, 395-441.
- Navajas M (1998) Host plant associations in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): insights from molecular phylogeny. *Experimental and Applied Acarology*, **22**, 201-214.
- Nef L, Menu JF (1994) Internationally important damaging poplar insects. Results of an inquiry among the members of the International Poplar Commission. In: *Proceedings of Meeting FAO/IPC Izmit, Turkey*.
- Nei M (1978) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, NY.
- Nelson AC, Kursar TA (1999) Interactions among plant defense compounds: a method for analysis. *Chemoecology*, **9**, 81-92.
- Netherer S, Schopf A (2010) Potential effects of climate change on insect herbivores in European forests-General aspects and the pine processionary moth as specific example. *Forest Ecology and Management*, **259**, 831-838.
- Newman JA (2003) Climate change and cereal aphids: the relative effects of increasing CO<sub>2</sub> and temperature on aphid population dynamics. *Global Change Biology*, **10**, 5-15.
- Newman JA, Gibson DJ, Parsons AJ, Thornleys JHM (2003) How predictable are aphid population responses to elevated CO<sub>2</sub>? *Journal of Animal Ecology*, **72**, 556-566.

- Nicol D, Armstrong KF, Wratten SD *et al.* (1998) Genetic diversity of an introduced pest, the green spruce aphid *Elatobium abietinum* (Hemiptera : Aphididae) in New Zealand and the United Kingdom. *Bulletin of Entomological Research*, **88**, 537-543.
- Niemeyer HM (1990) The role of secondary plant compound in aphid-host interactions. In: *Aphid-plant genotype interactions* (eds Campbell RK, Eikenbary RD), pp. 1987-204. Elsevier Science, Amsterdam.
- Niemeyer HM (1991) Secondary plant chemicals in aphid-host interactions. In: *Aphid-Plant Interactions: Population to molecules* (eds Peters DC, Webster JA, Chloubert CS), pp. 101-111. Washington: USDA.
- Nieto-Nafría JM, Mier-Durante MP (1998) Fauna Iberica. Hemiptera Aphididae I. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Normark BB (1996) Phylogeny and evolution of parthenogenetic weevils of the *Aramigus tessellates* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini): evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, **50**, 734-745.
- Normark BB (1999) Evolution in a putatively ancient asexual aphid lineage : recombination and rapid karyotype change. *Evolution*, **53**, 1458-1469.
- Normark BB (2000) Molecular systematics and evolution of the aphid family Lachnidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**, 131-140.
- Nottingham SF, Hardie J, Dawson GW, Hick AJ, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1991a) Behavioural and electrophysiological responses of aphids to host- and non-host plant volatiles. *Journal of chemical Ecology*, **17**, 1231-1242.
- Ohmart CP, Edwards PB (1991) Insect herbivory on Eucalyptus. *Annual Review of Entomology*, **36**, 637-357.
- Orondo SBO, Day RK (1994) Cypress aphid (*Cinara cupressi*) damage to a cypress (*Cupressus lusitanica*) stand in Kenya. *International Journal of Pest Management*, **40**, 141-144.
- Ortego J, Difabio ME, Mier Durante MP (2004) Nuevos registros y actualización de la lista faunística de los pulgones (Hemiptera: Aphididae) de la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, **63**, 19-30.
- Ortiz-Rivas B, Moya A, Martínez-Torres D (2004) Molecular systematics of aphids (Homoptera: Aphididae): new insights from the long-wavelength opsin gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**, 24-37.
- Ortiz-Rivas B, Martínez-Torres D (2010) Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) and the basal position of the subfamily Lachninae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **55**, 305-317.
- Osier TL, Lindroth RL (2001) Effects of genotype, nutrient availability, and defoliation on aspen phytochemistry and insect performance. *Journal of Chemical Ecology*, **27**, 1289-1313.
- Osier TL, Lindroth RL (2004) Long-term effects of defoliation on quaking aspen in relation to genotype and nutrient availability: plant growth, phytochemistry and insect performance. *Oecologia*, **139**, 55-65.
- Osier TL, Hwang S-Y, Lindroth RL (2000a) Effects of phytochemical variation in quaking aspen *Populus tremuloides* clones on gypsy moth *Lymantria dispar* performance in the field and laboratory. *Ecological Entomology*, **25**, 197-207.
- Osier TL, Hwang S-Y, Lindroth RL (2000b) Within- and between-year variation in early season phytochemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones. *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, 197-208.
- Oven P, Torelli N (1994) Wound response of the bark in healthy and declining silver firs (*Abies alba*). *IAWA Journal*, **15**, 407-415.
- Owen DF (1978) Why do aphids synthesize melezitose? *Oikos*, **31**, 264-267.
- Owen DF (1980) How plants may benefit from the animals that eat them? *Oikos*, **35**, 230-235.
- Owen DF, Wiegert RG (1976) Do consumers maximise plant fitness? *Oikos*, **27**, 488-492.
- Paillassa E (2009) Le puceron lanigère, nouvelle "pest" des peupleraies. *Forêt-entreprise*, **186**, 55-58.
- Paillassa E (2010) Où trouver les cultivars de peuplier pour les plantations 2009-2010 ? *Forêt-entreprise*, **190**, 48-51.

- Paine TD (2006) Invasive forest insects, introduced trees, and altered ecosystems - Ecological pest management in global forests of a changing world, Springer, Dordrecht.
- Painter RH (1951) Insect resistance in crop plants. Macmillan, NY.
- Painter RH (1958) Resistance of plants to insects. *Annual Review of Entomology*, **3**, 267-290.
- Pallett RN, Sale G (2004) The relative contributions of tree improvement and cultural practice toward productivity gains in *Eucalyptus* pulpwood stands. *Forest Ecology and Management*, **193**, 33-43.
- Palo RT (1984) Distribution of birch (*Betula* spp), Willow (*Salix* spp), and poplar (*Populus* spp) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, **10**, 499-520.
- Panda N, Khush GS (1995) Host plant resistance to insects. CAB International, Wallingford.
- Parnesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **37**, 637-669.
- Parnesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, **421**, 37-42.
- Parsons TJ, Bradshaw HD, Gordon MP (1989) Systemic accumulation of specific messenger-RNAs in response to wounding in poplar trees. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **86**, 7895-7899.-325.
- Paul TA, Darby P, Green CP, Hodgson CJ, Rossiter JT (1996) Electrical penetration graphs of the damson-hop aphid, *Phorodon humili* on resistant and susceptible hops (*Humulus lupulus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **80**, 335-342.
- Paxton JD (1981) Phytoalexins - A Working Redefinition. *Journal of Phytopathology*, **101**, 106-9.
- Pearson RG, Dawson TP (2003) Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography*, **12**, 361-371.
- Peccoud J, Simon J-C, von Dohlen C, Coeur d'acier A, Plantegenest M, Vanlerberghe-Masutti F, Jousset E (2010) Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification. *Comptes Rendus Biologies*, **333**, 474-487.
- Peet RK (1974) The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **5**, 285-307.
- Penteado SRC (2007) *Cinara atlantica* (Wilson) (Hemiptera: Aphididae) um estudo de biologia e associações. Dissertation, University Federal of Paraná, Brazil.
- Pépin R, Boumendil J (1982) Préservation de l'ultrastructure du sclérote de *Sclerotinia tuberosa* (Hedw.) Fuckel (champignon discomycète). Un modèle pour la préparation des échantillons imperméables et hétérogènes. *Cytologia*, **47**, 359-372.
- Percy KE, Awmack CS, Lindroth RL *et al.* (2002) Altered performance of forest pest under atmospheres enriched by CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. *Nature*, **420**, 403-407.
- Petelle M (1980) Aphids and melezitose: a test of Owen's 1978 hypothesis. *Oikos*, **35**, 127-128.
- Petelle M (1984) Aphid honeydew sugars and soil nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, **16**, 203-206.
- Peters DJ, Constabel CP (2002) Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *The plant Journal*, **32**, 701-712.
- Peterson MA, Denno RF (1998a). The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. *American Naturalist*, **152**, 428-446.
- Peterson MA, Denno RF (1998b) Life history strategies and the genetic structure of phytophagous insect populations. In: *Genetic structure and Local Adaptation in Natural Insect Populations: Effect of Ecology, Life History, and Behavior* (eds Mopper S, S.H. Strauss), pp. 263-322. Chapman & Hall, NY.
- Pettersson J, Tjallingii WF, Hardie J (2007) Host-plant selection and feeding. In: *Aphids as crop pests* (eds van Emden HF, Harrington R), pp. 87-113. CAB International, Wallingford.

- Pfenninger M, Posada D (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution*, **56**, 1776-1788.
- Philippe RN, Bohlmann J (2007) Poplar defence against insects herbivores. *Canadian Journal of Botany*, **85**, 1111-1126.
- Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1992) The chemical ecology of aphids. *Annual Review Entomology*, **37**, 67-90.
- Pollard DC (1973) Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea): a review. *Bulletin of Entomological Research*, **62**, 631-714.
- Ponsen MB (1982) The digestive system of *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Homoptera: Aphidoidea). Mededelingen-Landbouwhogeschool Wageningen, 82-10.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.
- Powell G (1991) Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: Consequences for the transmission of two potyviruses. *Annals of Applied Biology*, **119**, 313-321.
- Powell W, Parry WH (1976) Effects of temperature on overwintering populations of the green spruce aphid *Elatobium abietinum*. *Annals of Applied Biology*, **82**, 209-219.
- Powell G, Hardie J (2000) Host-selection behaviour by genetically identical aphids with different plant preferences. *Physiological Entomology*, **25**, 54-62.
- Powell G, Hardie J, Pickett JA (1995) Response of *Myzus persicae* to the repellent polygodial in choice and no-choice video assays with young and mature leaf tissue. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **74**, 91-94
- Powell G, Maniar SP, Pickett JA, Hardie J (1999) Aphid responses to non-host epicuticular lipids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **91**, 115-123.
- Powell D, Tosh CR, Hardie J (2006) Host plant selection by aphids: Behavioral, Evolutionary and Applied perspectives. *Annual Review of Entomology*, **51**, 309-330.
- Prado E (1997) Aphid-plant interactions at phloem level, a behavioural study. PhD thesis, Landbouwniversiteit te Wageningen, Netherlands.
- Prado E, Tjallingii WF (1994) Aphid activities during sieve element punctures. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **72**, 157-165.
- Prado E, Tjallingii WF (2007) Behavioral evidence for local reduction of aphid-induced resistance. *Journal of Insect Science*, **7**, 1-8.
- Price PW (1991) The plant vigor hypothesis and herbivore attack. *Oikos*, **62**, 244-251.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Quisenberry SS, Ni X (2007) Feeding injury. In: *Aphids as crop pests* (eds van Emden HF, Harrington R), pp. 331-352. CAB International, Wallingford.
- R Development Core Team (2007) R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available from <http://www.R-project.org>.
- Radville L, Chaves A, Preisser EL (2011) Variation in Plant Defense against Invasive Herbivores: Evidence for a Hypersensitive Response in Eastern Hemlocks (*Tsuga canadensis*). *Journal of Chemical Ecology*, **37**, 592-597.
- Rajabi-Mazhar N, Moharramipour S, Sadeghi SE (2003) Antixenosis resistance to woolly aphid *Phloeomyzus passerinii* Sign. (Hom.: Aphididae) different poplar clones. *Journal of the Entomological Society of Iran*, **22**, 31-44.
- Rajabi-Mazhar N, Moharramipour S, Sadeghi SE (2008) Comparative life history of woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, on various poplar clones. *Iranian Journal Forest and Range Protection Research*, **6**, 62-73.
- Ramírez CC, Zamudio F, Verdugo JV, Nuñez ME (2004) Differential susceptibility of poplar hybrids to the aphid *Chaitophorus leucomelas* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, **97**, 1965-1971.
- Ramírez CC, Guerra FP, Zuñiga RE, Cordero C (2009) Differential expression of candidate defense genes of poplars in response to aphid feeding. *Journal of Economic Entomology*, **102**, 1070-1074.

- Raspi A (1996) *Thaumatomyia elongatula* (Becker) (Chloropidae) and *Leucopis annulipes* Zetterstedt (Chamaemyiidae): two Diptera preying on *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Homoptera: Phloeomyzidae) in Italy. In: *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **98**, 509-516.
- Rausher MD (1983) Ecology of host-selection behaviour in phytophagous insects. In: *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems* (eds Denno RF, McClure MS), pp. 223–257. Academic Press, New York.
- Ryan JD, Morgham AT, Richardson PE, Johnson RC, Mort AJ, Eikenbary RD (1990) Greenbugs and wheat: a model system for the study of phytotoxic Homoptera. In: *Aphid-Plant Genotype Interactions* (eds Campbell RK, Eikenbary RD), pp. 171-186. Elsevier, Amsterdam.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 2): population genetics software for exact tests and eucumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Remaudière G, Remaudière M (1997) Catalogue des Aphididae du Monde – Catalogue of the world's Aphididae [Homoptera, Aphidoidea]. INRA, Paris.
- Remaudière G, Stroyan HLG (1984) Un *Tamalia* nouveau de Californie (USA) et discussion sur les Tamalinae subfam. nov. (Hom. Aphididae). *Annales de la Société Entomologique de France*, **20**, 93-103.
- Remaudière G, Toros S, Ozdemir I (2006) New contribution to the aphid fauna of Turkey (Hemiptera, Aphidoidea). *Revue Française d'Entomologie*, **28**, 75-96.
- Richardson K C, Jarrett L, Finke E H (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology*, **35**, 313–323.
- Rispe C, Pierre JS, Simon JC, Gouyon PH (1998) Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**, 685-701.
- Robert Y (1987) Aphids and their environment. In: *Aphids, their Biology, Natural Enemies and Control, Vol 2A* (eds Minks AK, Harrewijn P), pp. 299-313. Elsevier, Amsterdam.
- Roberti D (1939) Contributi alla conoscenza degli afidi d'Italia. *Bolletino di Laboratorio de Zoologia Generale e Agraria Portici*, **31**, 137-157.
- Robinet C, Baier P, Pennerstorfer J, Schopf A, Roques A (2007) Modelling the effects of climate change on the potential feeding activity of *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff.) (Lep., Notodontidae) in France. *Global Ecology and Biogeography*, **16**, 460-471.
- Robinet C, Roques A (2010) Direct impacts of recent warming on insect populations. *Integrative Zoology*, **5**, 132-142.
- Robinson DJ, Raffa KF (1997) Effects of constitutive and inducible traits of hybrid poplar on forest tent caterpillar feeding and population ecology. *Forest Science*, **43**, 252-267.
- Roderick GK (1996) Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, **41**, 325-352.
- Rohfritsch O (1988) A resistance response of *Picea excelsa* to the aphid *Adelges abietis* (Homoptera: Aphidoidea) Mechanisms of woody plant defense against insects. Search for pattern. Springer,
- Rohfritsch O (1990) Aphid stylet movement and host-plant reaction in the case of Adelgidae on spruce. In: *Aphid-plant genotype interactions* (eds Campbell RK, Eikenbary RD), pp. 101-116. Elsevier, NY.
- Root RB (1973) Organisation of a plant–arthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of collards (*Brassica oleraceae*). *Ecological Monographs*, **43**, 94–125.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, **421**, 57-60.
- Rowntree JK, McVennon A, Preziosi RF (2010) Plant genotype mediates the effects of nutrients on aphids. *Oecologia*, **163**, 675-679.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2009) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496-2497.

- Russel EP (1989) Enemies hypothesis: a review of the effect of vegetational diversity on predatory insects and parasitoids. *Environmental Entomology*, **18**, 590–599.
- Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants – genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **28**, 425-449.
- Sadeghi SE, Rajabi-Mazhar NA, Moharramipour S (2007) A study on the incidence of woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Hom.: Aphididae) on poplar species and clones in Hamedan province, Iran. *Journal of the Entomological Society of Iran*, **26**, 47-59.
- Safranyik L, Wilson B (2006) *The Mountain Pine Beetle: A Synthesis of Biology, Management and Impacts in Lodgepole Pine*. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Victoria.
- Safranyik L, Carroll AL, Régnière J *et al.* (2010) Potential for range expansion of mountain pine beetle into the boreal forest of North America. *The Canadian Entomologist*, **14**, 415-442.
- Sage RB (1994) A review of the status and control strategies of known and perceived insect pests on *Salix* and *Populus* in north west Europe Energy technology Support Unit (ETSU), Harwell, UK.
- Sage RB, Tucker K (1997) Invertebrates in the canopy of willow and poplar short rotation coppices. In: *Biomass and Energy Crops Vol. 49* (ed. Bullard M.), pp.105-112, UK.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **32**, 305-332.
- Sandanayaka WRM, Hale CN (2003) Electronically monitored stylet penetration pathway of woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* (Homoptera: Aphididae) on apple (*Malus domestica*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Sciences*, **31**, 107-113.
- Sandanayaka WRM, Bus VGM, Connolly P (2005) Mechanisms of woolly aphid, [*Eriosoma lanigerum* (Hausm.)] resistance in apple. *Journal of Applied Entomology*, **129**, 534-541.
- Sauge M-H, Kervella J, Rahbé Y (1998a) Probing behaviour of the green peach aphid *Myzus persicae* on resistant *Prunus* genotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **89**, 223-232.
- Sauge M-H, Kervella J, Pascal T (1998b) Settling behaviour and reproductive potential of the green peach aphid *Myzus persicae* on peach varieties and related wild *Prunus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **89**, 233-242.
- Sauge M-H, Lacroze J-P, Poëssel J-L, Pascal T, Kervella J (2002) Induced resistance by *Myzus persicae* in the peach cultivar ‘Rubira’. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **102**, 29-37.
- Sauge M-H, Mus F, Lacroze J-P, Pascal T, Kervella, Poëssel J-L (2006) Genotypic variation in induced resistance and induced susceptibility in the peach –*Myzus persicae* aphid system. *Oikos*, **113**, 305-313.
- Sauvion N, Rahbé Y (1999) Etude du comportement alimentaire des hémiptères par la méthode EPG : revue sur le principe, la mise en œuvre et les domaines d’application. *Annales de la Société Entomologique de France*, **35**, 175-183.
- Sequeira R, Dixon AFG (1997) Population dynamics of tree-dwelling aphids: the importance of seasonality and time scale. *Ecology*, **78**, 2603-2610.
- Shannon CE, Weaver W (1949) *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL.
- Shaposhnikov GC (1987) Evolution of aphids in relation to evolution of plants. In: *Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control* (eds Minks AK, Harrewijn P), pp. 409–414. Elsevier, Amsterdam.
- Shoohoven LM, van Loon JJA, Dicke M (2005) *Insect-plant biology*. Oxford University Press, NY.
- Shorthouse JD, Rohfritsch O (1992) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, NY.
- Shufran KA, Margolies DC, Black WC (1992) Variation between biotype E clones of *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, **82**, 407–416.
- Shufran KA, Burd JD, Anstead JA, Lushai G (2000) Mitochondrial DNA sequence divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: evidence for host-adapted races. *Insect Molecular Biology*, **9**, 179–184.

- Signoret V (1875) Description d'un aphidien nouveau (*Schizoneura passerinii*). *Annales de la Société Entomologique de France*, **59**, CCII-CCIII.
- Simmons AT, McGrath D, Gurr GM (2005) Trichome characteristics of *F1 Lycopersicon esculentum* x *L. Pennellii* hybrids and effects on *Myzus persicae*. *Euphytica*, **144**, 313-320.
- Simon J-C, Blackman R, Le Gallic JF (1991) Local variability in the life cycle of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in western France. *Bulletin of Entomological Research*, **81**, 315-322.
- Simon J-C, Hebert PDN, Carillo C, De Melo R (1995) Lack of clonal variation among Canadian populations of the Corn aphid, *Rhopalosiphum maidis* Fitch (Homoptera: Aphididae). *Canadian Entomologist*, **127**, 623-629.
- Simon J-C, Baumann S, Sunnucks P, Hebert PDN, Pierre J-S, Le Gallic J-F, Dedryver C-A (1999) Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid *Sitobion avenae* studied using phenotypic and microsatellite markers.
- Simon J-C, Leterme N, Delmotte F *et al.* (2001) Isolation and characterization of microsatellite loci in the aphid species, *Rhopalosiphum padi*. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 4-5.
- Simon J-C, Rispe C, Sunnucks P (2002) Ecology and Evolution of sex in aphids. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 34-39.
- Simon J-C, Carré S, Boutin M, Prunier-Leterme N, Sabater- Muñoz B, Latorre A, Bournoville R (2003) Host-based divergence in populations of the pea aphid: insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbiont. *Proceedings of the Royal Society B*, **270**, 1703-1712.
- Simon J-C, Stoeckel S, Tagu D (2010) Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids. *Comptes Rendus Biologies*, **333**, 488-496.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**, 787-792.
- Smith CF (1974) The genus *Phloeomyzus* with the description of *P. dearborni* N. Sp. from *Populus tremuloides* Michx (Homoptera: Aphididae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **76**, 66-72.
- Smith JP, Schowalter TD (2001) Aphid-induced reduction of shoot and root growth in Douglas fir seedlings. *Ecological Entomology*, **26**, 411-416.
- Smith JS, Tedders WL (1980) Light measurements for studying sooty mold growth on simulated pecan foliage. *Transaction of the American Society of Agricultural Engineers*, **23**, 481-484.
- Speight MR (1997) Forest pests in the tropics: current status and future threats. In: *Forests and Insects* (eds Watt AD, Stork NE, Hunter MD), pp. 207-228. Cambridge University Press, Cambridge.
- Staniland LN (1924) The immunity of apple stocks from attacks of woolly aphis (*Eriosoma lanigerum* Hausmann), part 1. The relative resistance of the stocks. *Bulletin of Entomological research*, **15**, 157-170.
- Stephen FM, Salisbury VB, Oliveria FL (2003) Red oak borer, *Enaphalodes rufulus* (Coleoptera: Cerambycidae), in Ozark Mountains of Arkansas, USA: an unexpected and remarkable forest disturbance. *Integrated Pest Management Review*, **6**, 247-252.
- Stern DL (1994) A phylogenetic analysis of soldier evolution in the aphid family Hormaphididae. *Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biology Sciences*, **256**, 203-209
- Stern DL, Foster WA (1995) The evolution of soldiers in aphids. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **70**, 27-79.
- Stettler RF, Zsuffa L, Wu R (1996) The role of hybridization in the genetic manipulation of *Populus*. In: *Biology of Populus and its implications for management and conservation, Part II, Ch.19* (eds Stettler RF, Bradshaw HD Jr, Heilman PE, Hinckley TM), pp. 87-112. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa.
- Stevens MT, Lindroth RL (2005) Induced resistance in the indeterminate growth of aspen (*Populus tremuloides*). *Oecologia*, **145**, 298-306.
- Stoakley JT (1985) Outbreaks of winter moth, *Operophtera brumata* L. (Lep. Geometridae) in young plantations of Sitka spruce in Scotland. *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, **99**, 153-160.

- Stange G, Monro J, Stowe S, Osmond CB (1993) The CO<sub>2</sub> sense of the moth *Cactoblastis cactorum* and its probable role in the biological control of the CAM plant *Opuntia stricta*. *Oecologia*, **102**, 341-352.
- Strauss SY (2001) Benefits and risks of biotic exchange between *Eucalyptus* plantations and native Australian forests. *Austral Ecology*, **26**, 447-457.
- Strauss SY, Rudgers JA, Lau JA, Irwin RE (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 278-285.
- Straw NA, Fielding NJ, Green G, Coggan A (1998) The impact of green spruce aphid, *Elatobium abietinum* (Walker), on the growth of young Sitka spruce in the Hafren Forest, Wales: pattern of defoliation and effect on shoot growth. *Forest Ecology and Management*, **104**, 209-225.
- Straw NA, Fielding NJ, Green G, Price J (2000) The impact of green spruce aphid, *Elatobium abietinum* (Walker), and root aphids on the growth of young Sitka spruce in Hafren Forest, Wales: effects on height, diameter and volume. *Forest Ecology and Management*, **134**, 97-109.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *TREE*, **15**, 199-203.
- Sunnucks P, De Barro PJ, Lushai G, Maclean N, Hales DF (1997) Genetic structure of an aphid studied using microsatellite: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages, and host specialization. *Molecular Ecology*, **6**, 1059-1073.
- Tahvanainen J, Helle E, Julkunen-Tiitto R, Lavola A (1985) Phenolic compounds of willow bark as deterrents against feeding by mountain hare. *Oecologia*, **65**, 319-323.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Tatchell GM (1991) Monitoring and forecasting aphid problems. In: *Proceedings of Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules* (eds Peters DC, Webster JA, Chlouber CS), pp. 215-231. Oklahoma Agricultural Experimental Station, Stillwater.
- Tedders WL, Wood BW, Snow JW (1981) Effects of feeding by *Monelliopsis nigropunctata*, *Monellia caryella*, and *Melanocallis caryaefoliae* on growth of pecan seedlings in the greenhouse. *Journal of Economic Entomology*, **75**, 287-291.
- Tedders WL, Wood BW (1985) Estimate of the influence of feeding by *Monelliopsis pecanis* and *Monellia caryella* (Homoptera: Aphididae) on the fruit, foliage, carbohydrate reserves, and tree productivity of mature 'Stuart' pecan. *Journal of Economic Entomology*, **78**, 642-646.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing C (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**, 619-633.
- Theobald FV (1929) The plant lice or Aphididae of Great Britain 3, 268-272.
- Thivolle-Cazat A (2002) Disponibilité en bois de peuplier en France de 2002 à 2020. AFOCEL.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Tjallingii WF (1978) Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **24**, 721-730.
- Tjallingii WF (1985a) Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **38**, 177-186.
- Tjallingii WF (1985b) Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **38**, 187-193.
- Tjallingii WF (1988) Electrical recording of stylet penetration activities. In: *Aphids, their Biology, Natural Enemies and Control, Vol 2B* (eds Minks AK, Harrewijn P), pp 95-108. Elsevier, Amsterdam.

- Tjallingii WF (1994) Sieve element acceptance by aphids. *European Journal of Entomology*, **91**, 47-52.
- Tjallingii WF (1995) Aphid-plant interactions: what goes on in the depth of the tissues? In: *Proceedings of Experimental Applied Entomology*, **6**, 163-169.
- Tjallingii WF (2000) Comparison of AC and DC systems for electronic monitoring of stylet penetration activities by Homoptera. In: *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior* (eds Walker GP, Backus EA), pp. 41-65. Entomol Soc Am, Lanham.
- Tjallingii WF (2006) Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 739-745.
- Tjallingii WF, Hogen Esch TH (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, **18**, 317-328.
- Tjallingii WF, Mayoral AM (1992) Criteria for host-plant acceptance by aphids. In: *Proceedings of the 8<sup>th</sup> Symposium on Insect-Plant Relationships*, (eds menken SBJ, Visser JH, Harrewijn P), pp. 280-282. Kluwer, Dordrecht.
- Tomlin ES, Borden JH (1997) Multicomponent index for evaluating resistance by Sitka spruce to the white pine weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, **90**, 704-714.
- Tosh CR, Powell G, Holmes ND, Hardie J (2003) Reproductive response of generalist and specialist aphid morphs with the same genotype to plant secondary compounds and amino acids. *Journal of Insect Physiology*, **49**, 1173-1182.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukariotic genomes : survey and analysis. *Genome Research*, **10**, 967-981.
- Trenberth KE, Jones PD, Ambeje P *et al.* (2007) Observations: surface and atmospheric climate change. In: *Climate change 2007: the Physical Science Basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change* (eds Solomon S, Qin D, Manning M *et al.*). Cambridge University Press, Cambridge.
- Tuomi J, Fagerstrom T, Niemela P (1991) Carbon allocation, phenotypic plasticity, and induced defenses. In: *Phytochemical induction by herbivores* (eds Tallamy DW, Raupp MJ). Wiley & Sons, NY.
- Ungerer MJ, Ayres MP, Lombardero MJ (1999) Climate and the northern distribution limits of *Dendroctonus frontalis* Zimmermann (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Biogeography*, **26**, 1133-1145.
- Vala J-C, Pointeau S, Lambert M, Thiercelin J (2011) *Phloeomyzus passerinii* (Signoret, 1875) dit puceron lanigère du peuplier (Hemiptera : Sternorrhyncha). *L'entomologiste, Société Entomologique de France*, **67**, 49-55.
- van Driesche (2006) Biological pest control in mix and match forests. In: *Invasive forest insects, introduced trees, and altered ecosystems - Ecological pest management in global forests of a changing world* (ed. Paine TD), pp. 79-100. Springer, Dordrecht.
- van Emden HF (2007) Host-plant resistance. In: *Aphids as crop pests* (eds van Emden HF, Harrington R), pp. 447-462. CAB International, Wallingford.
- van Helden M, Tjallingii WF (1993) Tissue localization of lettuce resistance to the aphid *N. Ribisnigri* using electrical penetration graphs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **68**, 269-278.
- van Helden M, Tjallingii WF (2000) Experimental design and analysis in EPG experiments with emphasis on plant resistance research. In: *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior* (eds Walker GP, Backus EA), pp. 144-171. Entomol Soc Am, Lanham, MD.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Vanoverbeke J, De Meester L (1997) Among-population genetic differentiation in the cyclical parthenogen *Daphnia magna* (Crustacea, Anomopoda) and its relation to geographic distance and clonal diversity. *Hydrobiologia*, **360**, 135-142.
- Via S (1999) Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution*, **53**, 1446-1457.

- Vidotti G (1960) Osservazioni sulla etologia ed ecologia del *Phloeomyzus passerinii* Sign. Nella zona di Este (Hemiptera Aphididae Aphidinae). *Atti Istituto veneto di scienze, lettere ed arti*, **118**, 203-218.
- Villar M (1998) Caractéristiques des peupliers et de la populiculture. In: *Les insectes associés aux peupliers* (ed. Delplanque A), pp. 5-26. MEMOR, Bruxelles.
- Villar M, Lefèvre F, Augustin S *et al.* (1995) Perspectives d'amélioration génétique des peupliers en France. *Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, **81**, 137-151.
- Visser ME, Both C (2005) Shifts in phenology due to global climate change: the need for a yardstick. *Proceeding of the Royal Society B*, **272**, 2561-69.
- Volney WJA, Fleming RA (2000) Climate change and impacts of boreal forest insects. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **82**, 283-294.
- von Dohlen CD, Moran NA (2000) Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **71**, 689-717.
- von Dohlen CD, Teulon DA (2003) Phylogeny and historical biogeography of New Zealand Indigenous Aphidini Aphids (Hemiptera, Aphididae): an hypothesis. *Systematics*, **96**, 107-116.
- Wagner MR, Clancy KM, Lieutier F, Paine TD (2002) Mechanisms and deployment of resistance in trees to insects. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Wainhouse D (2005) Ecological Methods in Forest Pest Management. Oxford University Press, NY.
- Walling LL (2008) Avoiding effective defenses: Strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiology*, **146**, 859-866.
- Wallner WE (1987) Factors affecting insect population dynamics: differences between outbreak and non outbreak species. *Annual Review of Entomology*, **32**, 317-340.
- Ward SA, Leather SR, Pickup J, Harrington R (1998) Mortality during dispersal and the cost of host-specificity in parasites: how many aphids find host? *Journal of Animal Ecology*, **67**, 763-773.
- Watt AD, Leather SR (1988) The pine beauty moth in Scottish lodgepole pine plantations. In: *Dynamics of forest insect populations* (ed. Berryman AA), pp. 243-266. Plenum, NY.
- Watt AD, Stork NE, Hunter M (1997) Forests and Insects, Cambridge University Press, Cambridge.
- Wayadande AC, Nault LR (1996) Leafhoppers on leaves: an analysis of feeding behaviour using conditional probabilities. *Journal of Insect Behaviour*, **9**, 3-22.
- Weiland JE, Stanosz GR (2007) The histology of hybrid poplar clones inoculated with *Septoria musiva*. *Plant Disease*, **91**, 1524-1530.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wensler RJ, Filshie BK (1969) Gustatory sense organs in the food canal of aphids. *Journal of Morphology*, **129**, 473-492.
- Westgarth-Smith AR, Leroy SAG, Collins PEF, Harrington R (2007) Temporal variations in English populations of a forest insect pest, the green spruce aphid (*Elatobium abietinum*), associated with the North Atlantic Oscillation and global warming. *Quaternary International*, **173-174**, 153-160.
- Whitham TG, Floate KD, Martinsen GD, Driebe EM, Keim P (1996) Ecological and evolutionary implications of hybridization: *Populus*-herbivore interactions. In: *Biology of Populus: implications for management and conservation* (eds Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley TM), pp. 247-275. NRC Press, Ottawa.
- Will T, van Bel AJE (2006) Physical and chemical interactions between aphids and plants, *Journal of Experimental Botany*, **57**, 729-737.
- Williams IS, Dixon AFG (2007) Life cycles and polymorphism. In: *Aphids as crop pests* (eds van Emden HF, Harrington R), pp. 69-86. CAB International, Wallingford.
- Williams DW, Liebhold AM (2002) Climate change and the outbreak ranges of two North American bark beetles. *Agricultural & Forest Entomology*, **4**, 87-99.

- Witter JA, Waisanen LA (1978) The effect of differential fushing times among trembling aspen clones on tortricid caterpillar populations. *Environmental Entomology*, **7**, 139-143.
- Wojciechowski W (1992) Studies on the systematic system of aphids (Homoptera, Aphidinea). Uniwersytet Slaski, Katowice.
- Wool D (2004) Gallling aphids: specialization, biological complexity, and variation. *Annual Review of Entomology*, **49**, 175-192.
- Wood BW, Tedders WL (1986) Reduced net photosynthesis of leaves from mature pecan trees by three species of pecan aphid. *Journal of Entomological Society*, **21**, 355-360.
- Wood BW, Tedders WL, Dutcher JD (1987) Energy drain by three pecan aphid species (Homoptera: Aphididae) and their influence on in-shell pecan production. *Environmental Entomology*, **16**, 1045-1056.
- Wood BW, Tedders WL, Reilly CC (1988) Sooty mold fungus on pecan foliage suppresses light penetration and net photosynthesis. *HortScience*, **23**, 851-853.
- Wood BW, Tedders WL, Thompson JM (1985) Feeding influence of the three pecan aphid species on carbon exchange and phloem integrity of seedling pecan foliage. *Journal of American Horticultural Society*, **110**, 393-397.
- Wyatt IJ, White PF (1977) Simple estimation of intrinsic rate of natural increase rates for aphids and tetranychid mites. *Journal of Applied Ecology*, **14**, 757-766.
- Yiping WRLFH, Zhangyi Z (1993) Comparative studies on resistance of *Populus deltoides* Bartr.cv. 'Lux' ex.1-69/55 and *P. xdakuanensis* Hsu. to *Anoplophora glabripennis*. *Journal of Beijing Forestry University*, **1**.
- Zhang G, Zhong T (1982) New spp. of Chinese Aphidoidea. *Sinozoologia*, **2**, 19-28.
- Zsuffa L (1975) A summary review of interspecific breeding in the genus *Populus* L. In: *Proceedings of Canadian Tree Improvement Association, Fredericton, NB, 14*, pp. 107-123.
- Zsuffa L, Giordano E, Pryor LD, Stettler RF (1996) Trends in poplar culture: some global and regional perspectives. In: *Biology of Populus and its implications for management and conservation, Part II, Ch.19* (eds Stettler RF, Bradshaw HD Jr, Heilman PE, Hinckley TM) pp. 515-539. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa.



# Annexes

---



---

## ANNEXE

### Communications scientifiques

---

#### ❖ Articles dans les revues internationales

POINTEAU S, SALLÉ A, LESIEUR V, BANKHEAD-DRONNET S, BONNAFFOUX M, LIEUTIER F (2011) Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* in various experimental conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, **41**, 1233-1241.

POINTEAU S, AMELINE A, LAURANS F, RAHBÉ Y, SALLÉ A, BANKHEAD-DRONNET S, LIEUTIER F. Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid. *Soumis*.

POINTEAU S, AMELINE A, SALLÉ A, BANKHEAD-DRONNET S, LIEUTIER F. Characterization of antibiosis and antixenosis to woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* in several poplar genotypes. *Prochainement soumis pour publication*.

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET S, ROBINET C, PINEAU X, SALLÉ A, VALA J-C, LIEUTIER F. Predicting insect outbreaks in a warming world: population dynamics of an emerging pest of poplar. *Prochainement soumis pour publication*.

POINTEAU S, MARTIN C, DE FERAUDY D, LIEUTIER F, BANKHEAD-DRONNET S (2012) Characterization of twelve microsatellite loci in the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Hemiptera: Aphididae: Phloeomyzinae). Published in the Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2011 – 30 November 2011, *Molecular Ecology Resources*, **12**, 374-376.

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET S, LIEUTIER F. New insights from genetic studies in an emergent tree-dwelling aphid (Hemiptera: Aphididae). En préparation.

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET, ROUX-MORABITO G, LIEUTIER F. Population genetic structure of the Mediterranean pine engraver beetle, *Orthotomicus erosus* (Wollaston) in Morocco. En préparation.

#### ❖ Article dans les revues de vulgarisation

VALA J-C, POINTEAU S, LAMBERT M, THIERCELIN J (2011) *Phloeomyzus passerinii* (Signoret, 1875) dit puceron lanigère du peuplier (Hemiptera: Sternorrhyncha). *L'entomologiste, Société Entomologique de France*, **67**, 49-55.

## ❖ Communications internationales

### ✓ Présentations orales

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET S, ROBINET C, PINEAU X, SALLÉ A, LIEUTIER F (2010) Lab-based estimates of the population-dynamics of *Phloeomyzus passerinii* (Homoptera: Aphididae), an emerging pest in French poplar stands, and predictions at the country scale under climate warming. *IUFRO International Conference 7.03.10 "Biotic Risks and Climate Change in Forests"*, Baden-württemberg, Freiburg, Germany (20-23 octobre).

POINTEAU S, AMELINE A, SALLÉ A, LESIEUR V, BANKHEAD-DRONNET S, LIEUTIER F (2010) Feeding behaviour of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Sternorrhyncha: Aphididae), in relation to host tree resistance. *ENTO'10 – RES Annual National Science Meeting*, Swansea University, Swansea, Wales, United Kingdom (26-28 juillet).

POINTEAU S, AMELINE A, LAURANS F, RAHBE Y, BANKHEAD-DRONNET S, LIEUTIER F (2010) Caractérisation du comportement alimentaire du puceron lanigère du peuplier par la technique d'électropénétrographie. *Conférence Internationale Francophone d'Entomologie (CIFE)*, Louvain-la-Neuve, Belgique (5-10 Juillet).

SALLÉ A, LESIEUR V, POINTEAU S, BONNAFFOUX M, BANKHEAD-DRONNET S, LIEUTIER F (2009) Impact of poplar genotypic variability on the performances of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Sign. (Homoptera, Aphididae). *IUFRO International Conference 7.03.11 "Tree resistance to insects"*, Cortina d'Ampezzo, Italy (31 août -12 september).

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET S, PINEAU X, SALLÉ A, LIEUTIER F (2009) Role of temperature on the development and fecundity of the emergent species *Phloeomyzus passerinii* (Aphididae: Phloeomyzinae). *8th International Symposium on Aphids*, Catane, Sicily, Italy (8-12 Juin).

### ✓ Posters

BANKHEAD-DRONNET S, POINTEAU S, ROUX-MORABITO G, GHAILOULE D, LIEUTIER F (2007) Genetic structure of *Orthotomicus erosus* (Coleoptera: Scolytinae) in Morocco. *IUFRO Meeting*, Vienne, Austria (9-14 septembre).

## ❖ Communications nationales

### ✓ Présentations orales

DARDEAU F, DEPROST E, LAURANS F, MOREAU A, POINTEAU S, LIEUTIER F, SALLE A (2010) Caractérisation des interactions entre le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret), et les tissus de son arbre hôte. *6<sup>ème</sup> rencontre entomologique du Centre*, Blois.

POINTEAU S, AMELINE A, LAURANS F, RAHBE Y, BANKHEAD-DRONNET S, LIEUTIER F (2010) Etude du mode de nutrition du puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Aphididae : Phloeomyzinae). *Réseau Français de Biologie Adaptative des Pucerons*, Lyon.

---

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET S, PINEAU X, SALLE A, LIEUTIER F (2009) Rôle de la température sur le développement et la fécondité d'une espèce émergente *Phloeomyzus passerinii* (Aphididae : Phloeomyzinae). *Réunion du Groupe des Entomologistes Forestiers Francophones*, Semur-en-Auxois.

BANKHEAD-DRONNET S, SALLE A, POINTEAU S, VALA J-C, PINEAU X, LIEUTIER F (2008) Relations avec les arbres hôtes et modalités de dispersion du puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret, 1875) (F. Phloeomyzinae). *Réunion du Groupe des Entomologistes Forestiers Francophones*, Avignon.

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET S, SALLE A, VALA JC, MARTIN C, PINEAU X, LIEUTIER F (2008) "*Phloeomyzus passerinii* (Homoptera : Aphididae), un puceron émergent des peupleraies françaises : connaissances et travaux en cours. 5<sup>ème</sup> rencontre entomologique du Centre, Blois.

### ✓ Posters

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET S, MARTIN C, SALLE A, LIEUTIER F (2010) Approche de génétique des populations du puceron lanigère du peuplier *Phloeomyzus passerinii*, un ravageur émergent en France. 16<sup>ème</sup> Colloque de Biologie de l'Insecte, Lyon.

POINTEAU S, BANKHEAD-DRONNET S, ROBINET C, PINEAU X, SALLE A, VALA J-C, LIEUTIER F (2010) Modélisation de l'infestation des peupleraies françaises par le puceron lanigère en relation avec le climat et l'arbre hôte. ResoNat Dream, Orléans.

# Sophie POINTEAU

## INTERACTIONS PEUPLIER - PUCERON LANIGERE (*PHLOEOMYZUS PASSERINII* (SIGN.)) ET PROCESSUS A L'ORIGINE DE L'EMERGENCE ET DE L'EXPANSION DES PULLULATIONS

### RESUME

Comprendre les processus menant à l'émergence des insectes ravageurs indigènes, impliquant les interactions entre l'insecte, sa plante-hôte et son environnement, représente un enjeu scientifique majeur. Signalées depuis les années 1990 dans les peupleraies du Sud-Ouest de la France, les pullulations du puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Hemiptera : Aphididae), sont en constante expansion géographique. Nous avons adopté une approche pluridisciplinaire pour éclaircir la biologie de l'insecte et ses interactions avec l'hôte ainsi que pour déterminer si les pullulations étaient liées à des conditions environnementales favorisant des populations locales ou à l'expansion de populations méridionales. Une première approche, centrée sur les interactions peuplier-puceron a montré un comportement atypique du puceron traversant les cellules du parenchyme cortical pour atteindre son site d'alimentation localisé dans ce tissu. La résistance du peuplier affecte les performances du puceron de manière multifactorielle, mettant en évidence des propriétés antibiotique et antixénotique localisées dans le parenchyme après analyses par électropénétrographie. Une seconde approche modélisant le potentiel de croissance annuel des populations en conditions optimales a révélé que le réchauffement climatique et la composition génotypique des peupleraies auraient contribué à l'émergence des pullulations. Les risques seraient accrus dans le Nord pour un réchauffement de 1 °C. Enfin, une approche génétique retraçant l'histoire évolutive des populations du puceron a révélé une diversité génétique microsatellite assez élevée, avec 28 génotypes pour 44 individus analysés. On observe une certaine structure entre les régions populières, sans toutefois que l'on puisse négliger l'existence d'un flux génique entre les populations dû à une dispersion à longue distance. Ce travail apporte les bases de méthodes de prévision et prévention des risques.

**Mots clés :** Phloeomyzinae, électropénétrographie, comportement alimentaire, parenchyme, antibiose, antixénose, peuplier hybride, réchauffement climatique, phylogénie, haplotype mitochondrial, microsatellite

## POPLAR - WOOLLY APHID (*PHLOEOMYZUS PASSERINII* (SIGN.)) INTERACTIONS AND PROCESSES LEADING TO OUTBREAK EMERGENCE AND EXPANSION

### ABSTRACT

Understanding the processes leading to the emergence of indigenous insect pests, involving interactions between the insect, its host plant and its environment, represents a major scientific challenge. Reported since the 1990s in poplar stands of South-Western France, the outbreaks of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Hemiptera: Aphididae), have been expanding geographically. We have adopted a multidisciplinary approach to clarify the biology of the insect and its interactions with its host, and to determine whether the outbreaks were related to environmental conditions promoting local populations or expansion of southern populations. One approach, focusing on poplar-aphid interactions has shown an atypical feeding behaviour of the aphid, crossing the cortical parenchyma cells to reach its feeding site located in this tissue. Aphids' performances were affected by poplar resistance in many ways, which highlights antibiotic and antixenotic properties localized in the cortical parenchyma after electrical penetration graph analysis. In a second approach, a model simulating the annual growth potential of aphid populations in optimal conditions was developed. It has revealed that global warming and genotypic composition of poplar stands have contributed to the emergence of outbreaks. A warming of 1 °C may increase the risks in the North. Finally, a genetic approach drawing the evolutionary history of aphid populations shows a relatively high microsatellite genetic diversity, with 28 genotypes out of 44 individuals tested. There is some structure between poplar stand regions, but we can not ignore gene flow between populations due to long-distance dispersal. This work has provided the basis for forecasting methods and risk prevention.

**Keywords:** Phloeomyzinae, electrical penetration graph, feeding behaviour, parenchyma, antibiosis, antixenosis, hybrid poplar, climate warming, phylogeny, mitochondrial haplotype, microsatellite