

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

UR0633 ZOOLOGIE FORESTIÈRE – INRA CENTRE-VAL DE LOIRE

THÈSE présentée par :

Audrey BRAS

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

Discipline/ Spécialité : Biologie de l'invasion

**Identification des facteurs sous-tendant
l'invasion fulgurante d'un insecte asiatique
en Europe, la pyrale du buis :
approche génétique et biologique**

Thèse soutenue le : **10 décembre 2018**

Devant le jury composé de :

Patricia Gibert	Rapporteuse
<i>Directrice de recherche, CNRS Université Claude Bernard Lyon 1, France</i>	
Jean-Christophe Simon	Rapporteur
<i>Directeur de recherche, INRA Bretagne-Normandie, France</i>	
Laurence Després	Examinatrice
<i>Professeure, Université Grenoble Alpes, France</i>	
Alexandre Aebi	Examinateur
<i>Professeur, Université de Neuchâtel, Suisse</i>	
François Lieutier	Président du jury
<i>Professeur, Université d'Orléans, France</i>	
Marie-Anne Auger-Rozenberg	Directrice de thèse
<i>Directrice de recherche, INRA Centre-Val de Loire, France</i>	
Alain Roques	Directeur de thèse
<i>Directeur de recherche, INRA Centre-Val de Loire, France</i>	
Jérôme Rousselet	Encadrant
<i>Chargé de recherche, INRA Centre-Val de Loire, France</i>	

Remerciements

Qu'est-ce qu'une thèse sans ses remerciements ? Ce travail de thèse a bénéficié de l'aide d'un grand nombre de personnes et je vais essayer d'être la plus exhaustive possible. Je m'excuse par avance auprès des personnes que j'aurais pu oublier.

Tout d'abord, je tiens à remercier la région Centre-Val de Loire qui a financé le projet d'intérêt régional INCA dans lequel mon travail de thèse s'est inséré.

Je remercie les membres du jury qui ont bien voulu évaluer ce travail de thèse : Patricia Gibert et Jean-Christophe Simon en tant que rapporteurs, ainsi que Laurence Despres, Alexandre Aebi et François Lieutier en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse : Carole Kerdelhué, Marc Kenis, René Eschen et Jérôme Julien. Vos conseils et remarques m'ont été d'une aide précieuse et m'ont permis de (moins) me noyer dans la multitude de possibilités que m'offrait cette thèse.

Un merci, que dis-je, mille mercis avec des grands M et des grands S à Marie-Anne, Alain et Jérôme pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, de m'avoir encouragée et soutenue durant tout ce parcours pas toujours facile. Merci à Alain pour m'avoir laissé une grande liberté tout en me donnant des conseils et des directives avisés. Merci d'avoir été aussi encourageant et présent dans la dernière ligne droite et d'avoir cru en moi jusqu'au bout. Merci de m'avoir fait découvrir que la recherche n'est pas faite que de sciences et que sous les pavés, on peut apercevoir la plage... Merci à Jérôme pour avoir répondu à mes nombreuses questions et pour toutes ces discussions sur les pistes de recherches, ôh combien nombreuses, qui s'offraient à moi avec cette thèse. Je me suis cassée le nez sur le sujet en début de thèse mais finalement, j'ai survécu ! Et on finit toujours par le meilleur, un immense merci à Marie-Anne pour ta patience, ta générosité, ta gentillesse et pour avoir cru en cette petite stagiaire de L3 qui venait écraser des petits bouts d'insectes...! Sans toi, je n'aurais pas eu l'occasion de faire cette thèse, ma gratitude va bien au-delà des mots. Merci d'avoir été une DR de tous les instants et d'avoir aussi été présente malgré ta nouvelle fonction cette dernière année.

Merci de nouveau à Marc Kenis pour toutes les collectes de pyrale qui m'ont été bien utiles et tous tes conseils sur cette petite bête. Merci de m'avoir permis de participer à un Workshop en République Tchèque où j'ai découvert que les insectes peuvent aussi jouer les politiciens. Partir à la recherche de la pyrale à Prague à 9h du soir était une expérience infructueuse mais bien sympathique !

Merci à Carole Kerdelhué pour tous tes commentaires et conseils qui ont été bien au-delà du comité de thèse et qui ont levé de nombreux voiles sur l'obscurité de la génétique et notamment

des microsattellites. Merci également à Laure Sauné pour avoir répondu à toutes mes questions techniques (plus ou moins pertinentes...) sur les microsattellites. Sans vous les filles, mes marqueurs ne seraient pas aussi beaux, Merci !

Sans la curiosité de certaines personnes et la volonté de se débarrasser de la pyrale pour d'autres, mon échantillonnage ne serait que peau de chagrin. Je tiens donc à remercier toutes ces personnes qui m'ont fourni toutes ces bêtes, que ce soit les collègues européens, les collègues français ou les particuliers : Hongmei Li ; Marc Kenis ; Jurate de Prins ; Liesbet Van Remoortere ; Elina Chatzimitriou ; Anna Maria Vettraino ; Stanislav Gomboc ; Ivanka Ivanova ; Katalin Tuba ; Gabrijel Seljak ; Peter Zach ; Christian stauffer ; Jan Soors ; Milka Glavendekic ; Kahraman Ipekdal ; Valery Shchurov ; Dinka Matosevic ; Annette Herz ; Jian-ting Fan ; Shiroma Sathyapala ; Francis Rachou-Langlatte ; Marie Frayssinet ; Marlène Lefebvre ; Vanille Thibault ; Agnès Grossel ; Jean Paul Charpentier ; Thomas Hery ; Marion Javal ; Julien Haran ; Paul Boisson ; Daniel Pons ; Delphine Fallour-Rubio ; Philippe de Champsavin ; Corinne Mariez ; Vincent Lesieur ; Christian Cordier-Lallouet ; François Berlivet ; Caroline Carpentier ; Christian Burban ; Jean-Emmanuel Michault ; Anthony Droui ; Agathe Dupin. Un merci particulier à Marja Van der Straten pour m'avoir accueillie et aidée à collecter la pyrale aux Pays-Bas. Nous avons fait le plaisir de nombreuses personnes en les débarrassant de leurs chenilles. Un merci particulier également à Hongmei Li pour toutes ces collectes en Chine et pour m'avoir aidée dans mon périple chinois. La Chine a paru un peu moins impressionnante grâce à toi et j'ai pu découvrir toute la richesse culinaire de ce pays ainsi que la joie des épices (bon, avec un bol de riz à côté). Un merci particulier aussi à Dinka Matošević, Dimitrios Avtzis et Gábor Véték pour votre enthousiasme et tous les échantillons que vous m'avez fournis. Je tiens également à remercier l'ONF pour leurs collectes, la Fredon Centre-Val de Loire dont Cyril Kruczkowski ainsi que Michèle Quentin pour leur aide dans l'échantillonnage et dans la mise en place de certaines expérimentations. Je remercie aussi M. et Mme Moreaux pour nous avoir laissés à disposition leur bois comme terrain de jeu pour les expérimentations Revive. Nous n'avons pu sauver qu'une centaine de buis, mais c'est un début ! Merci également à Eric Lombaert pour m'avoir initiée aux voies obscures de l'ABC et au labo pour leur accueil durant mon séjour. Je remercie aussi mes collègues de l'UEFM pour leur aide au cours de cette thèse : Élisabeth Tabone, Estelle Morel, Maurane Buradino et Jean-Claude Martin ; ceux de Plante&Cité : Maxime Guérin et Caroline Gutleben ; et le CDHRC : Jean-Marc Delacour.

Merci à Cécile Barbaroux, Géraldine Roux et Stéphanie Bankhead pour m'avoir permis de découvrir le milieu de l'enseignement. Ça a été une expérience fort enrichissante où j'ai pu apprendre que les papillons accouchaient... Merci à Xavier Pineau et Florie Miard pour leur aide dans l'organisation des TP et TD que j'ai pu faire. Je garderai un très bon souvenir des sorties terrain que j'ai faites avec toi, Xavier.

Merci à tous mes collègues de l'URZF. Sans une grande partie d'entre eux, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. Merci donc à Carlos pour m'avoir donné des bêtes de ton jardin. Merci à Emmanuelle et Béatrice pour toutes ces plaques envoyées au séquenceur et ces commandes, parfois égarées dans le troisième monde virtuel du Gauss. Merci à Patrick et Philippe

pour leur soutien technique dans les expérimentations Revive et dans la collecte de toutes ces petites bêtes qui ne savaient pas ce qui les attendaient. Merci à Régis pour avoir répondu présent à chaque fois que mon ordi ou un logiciel faisaient des siennes. Merci à Daniel pour m'avoir initiée au manège de vol, pour toutes ces discussions sur comment faire voler ces petites bêtes et pour tes conseils. Merci à Sylvie pour tous tes encouragements et ces nombreuses discussions autour d'un café. Finalement, la pyrale n'aura pas réussi à s'attaquer à tes buis. Merci à Marie pour ton soutien et t'être occupée de tous ces OM (pas toujours simples) et autres papiers administratifs (pas toujours simples non plus), qui m'ont permis d'aller aux quatre coins du monde pour chasser la pyrale. Merci à Olivier, pour m'avoir supportée pendant 3 mois de terrain (je n'oublierai pas ma copine) et avoir répondu présent à chaque fois que j'avais une question entomo. Merci à Christelle (et Christelle S.) pour ces discussions sur la pyrale et sa biologie, et pour ton soutien. Finalement, je n'aurai pas fait de modélisation mais ce n'est que partie remise. Merci à Mathieu, même au fin fond du pôle Nord, tu as été d'une grande aide. Torturer, pardon, encadrer Laura avec toi a été une expérience très enrichissante. Merci à Natalia, qui fait presque partie du labo, pour ta gentillesse, ta générosité et tous ces bons gâteaux. Merci à Claudine pour ton aide dans la plupart de mes expérimentations. On aura finalement réussi à venir à bout de ces séquences. Merci pour toutes ces discussions plus ou moins philosophiques et ton soutien indéfectible. Merci à Alexis, ou '*super chasseur de pyrale*' devrais-je dire, pour tous ces échantillons qui ont rendu cette thèse aussi riche. Finalement on n'aura pas fait de terrain ensemble mais ce n'est que partie remise. Un terrain fromage dans le Jura est toujours envisageable, j'ai entendu dire que la pyrale y faisait des ravages... Enfin, cette thèse ne va pas sans une pensée à Franck Rogeon, parti trop tôt.

Merci à tous mes collègues de l'open space dont le passage a été plus ou moins long. Merci à Mauro pour toutes ces histoires farfelues. Je n'entendrais plus 'AIDE' de la même manière. Merci à Kristi pour toutes ces discussions sur les français et américains. J'ai enfin pu découvrir la partie américaine (merci pour ton accueil) et je le concède, vous faites de très bonnes bières. Merci à Ana dont les passages ont été courts mais très enrichissants. Merci à Antoine pour toutes les conneries que tu as pu me montrer. Merci à Laura, Xueting et Océane dont le séjour commence. Profitez les filles ! Un merci aussi pour tous ces petits stagiaires qui ont participé à mes expérimentations : Alizée Ribas, Charlotte Mathieu, Alexis Groseiller, Augustine Jaccard, Marie Le Geay et Laura Poitou. Et enfin, un merci à Etienne et Alix qui m'ont prêté main forte au cours de cette charmante expérimentation Revive.

Merci à Steve Franck de m'avoir permis de venir présenter la pyrale du buis et mes travaux aux collègues américains. J'ai enfin pu découvrir la culture américaine, les ouragans, il ne manque plus que les fêtes costumées en insectes ou pathogènes...!

Merci à mes proches pour leur soutien durant toute cette thèse. Merci à toute ma famille pour leurs encouragements. Merci à mes parents pour le catsitting, les fromages pour ma survie de thésarde en rédaction et pour avoir accepté que m'emmener dans un château impliquait de me perdre dans les buis. Merci à ma mère d'avoir accepté de venir nous voir à des heures descentes.

Merci à tous les copains pour ces moments autour d'une bière à refaire le monde. Merci à la dream team : Mau', Romain et Jo' pour tous ces moments. Merci à Chacha d'avoir été là de tout temps. Il est loin le moment où on faisait des labyrinthes en Chimie et les '*ah c'est un exemple, je note pas*'. Merci à Toinou, Charlène et Rémi pour toutes ces soirées mémorables. Merci à Claire pour ces discussions autour d'un verre à refaire le monde. Merci à Papass pour toutes ces soirées épiques à base de '*j'ai une mission pour toi*' et ce séjour à Antibes où j'ai retrouvé les intrigues dignes du château de Versailles ! Merci à Loulou, mon amie de toujours. Merci à l'équipe dégustation : Vanille, Poutou, Mercedes, Garrett et Alexis, je n'ai pas le droit à l'erreur pour le pot de thèse maintenant. Merci à Ben', mon collègue de jardin. Même si quelques plants n'ont pas résisté à ton entrain, on en a bien profité. Merci à la team GBFor pour vos petits coups de pouce et ces '*juste une bière*'. Enfin merci à mes collègues thésards Kristi, Ana, Antoine, Laura, Marlène, Thibaud et Flavien. *Keep going* les gars !

« *I am always falling in love with the saxophonist* ». Merci d'avoir été là tout au long de cette aventure et de m'avoir suivie jusqu'au fin fond de la Chine et des Pays-Bas à la recherche de la pyrale sacrée (bon, je conçois, pas toujours de ton plein gré), d'avoir supporté tous mes états qui sont passés d'une enfant de 5 ans à ermite... Merci de m'avoir aidée et supportée avec tous mes '*je comprends pas pourquoi R marche pas*', '*comment on fait ça*', '*tu peux lancer ça*' ... Mon sauveur de R ! Merci pour tout, ton soutien, ton optimisme, ta cuisine (oui, oui c'est très important !) ... J'espère que cette aventure qui se finit va nous emmener vers de nouvelles contrées !

Merci à tous ces petits animaux qui ont plus ou moins fait partie de cette thèse : Wasabi, qui a bien voulu partager sa maison pour que je puisse rédiger tranquillement (et merci à ses maîtres aussi), Chaussette qui a gentiment voulu m'offrir un mulot pour me 'détendre' pendant la rédaction, Lithium qui a supporté moult voyages quand ses maîtres étaient partis à l'autre bout du globe et qui m'a soutenue à base de *Miaou Miaou* et de *Brouw Brouw* pendant cette dernière étape de la thèse (et a même tenté d'écrire à ma place). Et enfin, merci à toutes ces petites pyrales qui ont donné leur vie pour que cette thèse existe et qui m'ont permis de faire le tour du globe. Vous avez donné votre corps à la science, j'espère que les résultats de cette thèse sont à la hauteur de votre sacrifice !

À mon oncle

Avant-Propos

Il y a soixante ans, Charles Elton publiait « *The ecology of invasions by animals and plants* », un des premiers ouvrages à aborder la notion d'invasion biologique. Depuis, le nombre d'études portant sur ce phénomène est en constante augmentation tout comme les dites invasions. Malgré un attachement profond à mieux comprendre ces phénomènes, allant de l'échelle fondamentale avec l'étude de l'évolution des espèces lorsqu'elles sont confrontées à un nouveau milieu jusqu'à une échelle plus appliquée avec la tentative de définir des moyens de lutter contre ces envahisseurs, il reste toujours des zones d'ombre au sein des différentes étapes des invasions biologiques, leurs modalités évoluant aussi vite que les technologies que nous développons.

Les dernières décennies représentent un tournant majeur dans l'introduction d'organismes en dehors de leur aire d'origine. Le taux de ces introductions d'espèces ne cesse d'augmenter. Si le commerce a favorisé depuis des siècles le mouvement d'espèces vers d'autres continents, l'augmentation considérable de la vitesse des transports observée ces dernières décennies au plan mondial, couplée à la croissance exponentielle et à la diversification des échanges commerciaux ont de toute évidence tendance à faciliter ces invasions biologiques tout en les rendant plus difficiles à prédire. Une meilleure compréhension du rôle de ces circuits commerciaux est nécessaire afin de mieux comprendre l'ampleur et les conséquences des phénomènes d'invasions observés aujourd'hui.

Sommaire

INTRODUCTION	15
Chapitre 1 - Les invasions biologiques, nos connaissances et les zones d'ombre restantes	17
1.1 Les invasions biologiques	19
1.1.1 Définitions et processus	19
1.1.2 Les échanges commerciaux et les introductions d'espèces exotiques, deux processus intimement liés	22
1.1.3 Les invasions biologiques d'insectes et leurs conséquences	23
1.1.4 Une expansion fulgurante pour une partie des insectes récemment introduits	25
1.2 Commerce d'ornement, fonctionnement et implication dans les invasions biologiques	28
1.2.1 Définition du commerce d'ornement : de la plante à la crevette	28
1.2.2 Fonctionnement du commerce de plantes ornementales à l'échelle internationale, européenne et française	28
1.2.3 A travers le commerce d'ornement de plantes, une voie d'introduction involontaire d'un grand nombre d'organismes, dont les insectes	30
1.3 Importance de connaître les routes d'invasion suivies par les insectes exotiques	31
1.3.1 Qu'est-ce qu'une route d'invasion ?	31
1.3.2 Mieux comprendre les processus fondamentaux des invasions biologiques et adapter au mieux les stratégies de prévention et de lutte	32
1.4 Zone d'origine et traits de vie des insectes exotiques parfois mal connus	33
1.4.1 Mauvaise connaissance de la zone d'origine	33
1.4.2 Parfois associée à un changement de compartiment	34
Chapitre 2 - La pyrale du buis, <i>Cydalima perspectalis</i>, un modèle d'étude pour comprendre les invasions fulgurantes	37
2.1 Caractéristiques biologiques et écologiques de la pyrale du buis	39
2.1.1 Taxonomie	39
2.1.2 Biologie et écologie de <i>C. perspectalis</i>	39
2.2 De l'Asie à la colonisation de l'ensemble de l'Europe	42
2.2.1 L'aire native asiatique	42
2.2.2 Une invasion fulgurante en Europe et en France : historique	43
2.2.3 Changement de compartiment : de la forêt à la ville et de la ville à la forêt	46
2.3 Dégâts et moyens de lutte	48
2.3.1 Une menace pour les jardins à la française et les buxiers naturels	48
2.3.2 Développement de la lutte face à un nouveau ravageur	49
2.4 Objectifs de la thèse	52

TRACAGE DES ROUTES D'INVASION DE LA PYRALE DU BUIS	55
Chapitre 3 - <i>De l'aire d'origine vers la zone d'introduction</i>	59
3.1 Décrire la diversité génétique des espèces envahissantes pour appréhender les routes d'invasion : l'approche phylogéographique	61
3.1.1 Description génétique de l'espèce dans son milieu d'origine : comprendre l'histoire évolutive	61
3.1.2 Caractériser la diversité génétique dans la zone d'introduction : un débroussaillage sur les phénomènes d'introduction et de dispersion	61
3.1.3 L'ADN mitochondrial, un marqueur universel pour caractériser la diversité génétique	62
3.2 Reconstitution de l'invasion de la pyrale du buis	63
3.3 Une première étape dans la compréhension des routes d'invasion de la pyrale du buis	93
Chapitre 4 - <i>De l'introduction à la dispersion dans la zone envahie</i>	95
4.1 Les marqueurs microsatellites et leur utilisation dans les études d'invasions biologiques	97
4.1.1 L'apport des microsatellites dans l'étude des routes d'invasion	97
4.1.2 Les différentes étapes du développement	98
4.2 Les nouvelles analyses statistiques de type ABC et ABC-RF pour définir les scénarios d'invasion et de dispersion	103
4.2.1 Principe de l'ABC	103
4.2.2 Les différentes étapes	103
4.2.3 L'ABC dans l'inférence des routes d'invasion	106
4.2.4 L'apport de l'ABC-RF dans la compréhension des routes d'invasion	106
4.3 Identification des routes d'invasion de la pyrale du buis	107
4.4 La pyrale du buis : un nouvel exemple de complexité des routes d'invasion et d'expansion liées aux activités humaines	142
TRAITS DE VIE FAVORISANT L'INVASION ET L'EXPANSION	143
Chapitre 5 - <i>Capacités naturelles de dispersion des populations envahissantes de la pyrale du buis</i>	147
5.1 Pourquoi et comment étudier les capacités de vol dans le cas des invasions biologiques	149
5.2 Les différentes méthodes pour estimer les capacités de vol	149
5.2.1 Capture-Marquage-Recapture	149
5.2.2 Les radars	150
5.2.3 Le manège de vol	150
5.3 Estimation des capacités de vol de la pyrale du buis	151
5.4 Des capacités de vol faibles comparées à la vitesse d'expansion en Europe	175

Chapitre 6 - La diapause, un trait de vie pouvant faciliter le transport et l'établissement 177

6.1 La diapause dans les invasions, un trait biologique favorisant l'introduction et l'établissement ? 179

6.2 Diapause au stade larvaire 180

6.2.1 Un trait caractéristique des Crambidae présents en Chine ? 180

6.2.2 Etat des connaissances du fonctionnement de la diapause chez la pyrale du buis 180

6.3 Facteurs impliqués dans la levée de diapause de la pyrale du buis 181

6.4 Une meilleure connaissance de ce phénomène dans le cas de la pyrale du buis 186

6.4.1 Compréhension d'un trait biologique pouvant favoriser les invasions biologiques 186

6.4.2 Des pistes pour adapter la lutte contre un ravageur vorace 187

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE 189

Chapitre 7 - Le rôle de l'Homme apparaît déterminant dans l'invasion et la propagation fulgurante de la pyrale du buis 191

7.1 Préadaptation de populations à l'invasion ? 194

7.1.1 Un effet vraisemblable du changement de compartiment dans la zone d'origine dans le succès d'invasion 194

7.1.2 *Admixture* dans certaines populations urbaines en Chine 195

7.2 Les routes d'invasion dans le cas d'invasions fulgurantes 197

7.2.1 Conjonction d'introductions multiples, de phénomène tête de pont et d'*admixture* 197

7.2.2 Quel rôle joue l'Homme dans la dispersion à courte ou moyenne distance ? 198

7.3 Des traits biologiques amenant de nouvelles questions 198

7.3.1 Une plasticité au stade larvaire et à la sortie diapause 198

7.3.2 Une différence de succès entre générations 199

Conclusion 200

Bibliographie 201

Sites internet 218

Annexe 1 219

Annexe 2 223

Annexe 3 231

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique des différentes étapes constituant une invasion, les barrières à franchir et la terminologie associée.	20
Figure 2. Evolution du nombre de publications portant sur les invasions biologiques depuis 1960 à 2017.	22
Figure 3. Evolution de la vitesse d'expansion des insectes introduits en Europe à partir de leur première observation jusqu'aux années 2000.	26
Figure 4. Schéma non exhaustif du circuit de l'importation de plantes ornementales indiquant les différents acteurs associés.	29
Figure 5. Cycle biologique de <i>C. perspectalis</i> .	40
Figure 6. Adulte de pyrale du buis <i>Cydalima perspectalis</i> .	41
Figure 7. Carte de répartition de <i>C. perspectalis</i> en Asie.	43
Figure 8. Propagation de <i>C. perspectalis</i> en Europe et à l'Asie Mineure depuis sa première observation en 2007 jusqu'à aujourd'hui.	45
Figure 9. Propagation de <i>C. perspectalis</i> en France depuis sa première observation en 2008 jusqu'à aujourd'hui.	46
Figure 10. Photos de dégâts de pyrale du buis en Région Centre-Val de Loire en a. milieu urbain et b. milieu forestier.	48
Figure 11. Les différentes étapes de l' <i>Approximate Bayesian Computation</i> (ABC) dans le cas de reconstruction des routes d'invasion.	104
Figure 12. Schéma de fonctionnement d'un manège de vol.	151
Figure 13. Schéma des protocoles expérimentaux mis en place pour estimer la distance parcourue par les adultes des 2 sexes de <i>C. perspectalis</i> .	153
Figure 14. Temps d'exposition conduisant à 50% de diapause ($T_{50\%}$) pour des chenilles de stade L4 en fonction de la température.	183
Figure 15. Temps d'exposition conduisant à 50% de diapause ($T_{50\%}$) pour des chenilles de stade L4 en fonction de la température et de la photopériode.	183
Figure 16. Évolution temporelle du taux de diapause en fonction du site et de la température moyenne journalière.	184
Figure 17. Produit Intérieur Brut (PIB) en Yuan (CNY) donné pour chaque province chinoise pour les années 1997 et 2015.	195
Figure 18. Schéma montrant les préadaptations d'une espèce dans sa zone native en fonction des activités humaines.	196

INTRODUCTION

Chapitre 1

Les invasions biologiques, nos connaissances et les zones d'ombre restantes



1.1 Les invasions biologiques

1.1.1 Définitions et processus

1.1.1.1 Qu'est-ce qu'une espèce envahissante ?

Les invasions biologiques résultent d'introductions par l'Homme, de manière volontaire ou non, d'espèces dans une zone située en dehors de leur aire de répartition naturelle ou potentielle (Kolar & Lodge 2001, Sakai et al. 2001, Hulme 2009, Wilson et al. 2009, Blackburn et al. 2011, Simberloff et al. 2013, Essl et al. 2018). Bien souvent, ces espèces ne réussissent pas à s'établir. Celles qui y parviennent sont définies comme des espèces exotiques, ou « *non-native* » ou encore « *alien* » en anglais (Kolar & Lodge 2001, Blackburn et al. 2011). Certaines d'entre elles vont étendre leur aire géographique et/ou peuvent présenter un impact négatif pour l'Homme, qu'il soit écologique, économique et/ou sanitaire (Sakai et al. 2001, Allendorf & Lundquist 2003, Vaes-Petignat & Nentwig 2014, Nentwig et al. 2017). De forts débats traversent la communauté scientifique concernant la terminologie à employer pour caractériser celles qui vont être définies comme envahissantes (« *Invasive Alien Species- IAS*»). La définition la plus couramment acceptée est celle retenue en 2000 par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) et la Convention pour la Diversité Biologique (CBD) selon laquelle il s'agit « *d'espèces allochtones dont l'introduction par l'Homme (volontaire ou fortuite), l'implantation et la propagation menacent les écosystèmes, les habitats ou les espèces indigènes avec des conséquences écologiques ou économiques ou sanitaires négatives* » (UICN 2000, McNeely et al. 2001). Dans la suite de ce manuscrit, j'ai choisi d'utiliser le terme « espèce envahissante » pour désigner les espèces exotiques envahissantes présentant un impact négatif, quel qu'il soit.

1.1.1.2 Les différentes étapes d'une invasion

Le processus d'invasion consiste en une succession d'étapes auxquelles les espèces doivent survivre avant d'être considérées comme envahissantes (Williamson & Fitter 1996b, Kolar & Lodge 2001, Blackburn et al. 2011) (Figure 1). Ces étapes correspondent au transport, à l'introduction, à l'établissement, à l'expansion et à l'impact écologique (Kolar & Lodge 2001, Sakai et al. 2001, Allendorf & Lundquist 2003, Lockwood et al. 2005, Blackburn et al. 2011, Renault et al. 2018). A chacune de ces étapes, les espèces sont confrontées à différentes barrières, pouvant être biotiques ou abiotiques, qui vont limiter leur survie (Blackburn et al. 2011, Su 2013). Seule une partie d'entre-elles passeront la barrière du transport et de l'établissement, c'est-à-dire seront capables de se reproduire et de maintenir une population viable et stable (Sakai et al. 2001, Blackburn et al. 2011). En effet, ces espèces, transportées et introduites dans un nouvel environnement, doivent faire face à de nouveaux stress et pressions de sélection qui peuvent empêcher leur survie (Sakai et al. 2001, Prentis et al. 2008). Au sein des espèces qui réussissent à s'établir, encore une fois seule une partie d'entre elles sera capable de disperser (Kolar & Lodge 2001, Allendorf & Lundquist 2003, Floerl & Inglis 2005) et de causer des dégâts (Floerl & Inglis

2005, Su 2013, Blackburn et al. 2014). La règle des ‘*tens rules*’, définie par Williamson et Fitter (1996a), suggère qu’à chaque barrière, seulement 10% des espèces pourraient survivre. Même si cette règle a été proposée pour les plantes envahissantes, les ordres de grandeur semblent réalistes pour les autres groupes. Parmi le nombre d’espèces exotiques transportées, un nombre restreint deviendrait donc au final envahissant.

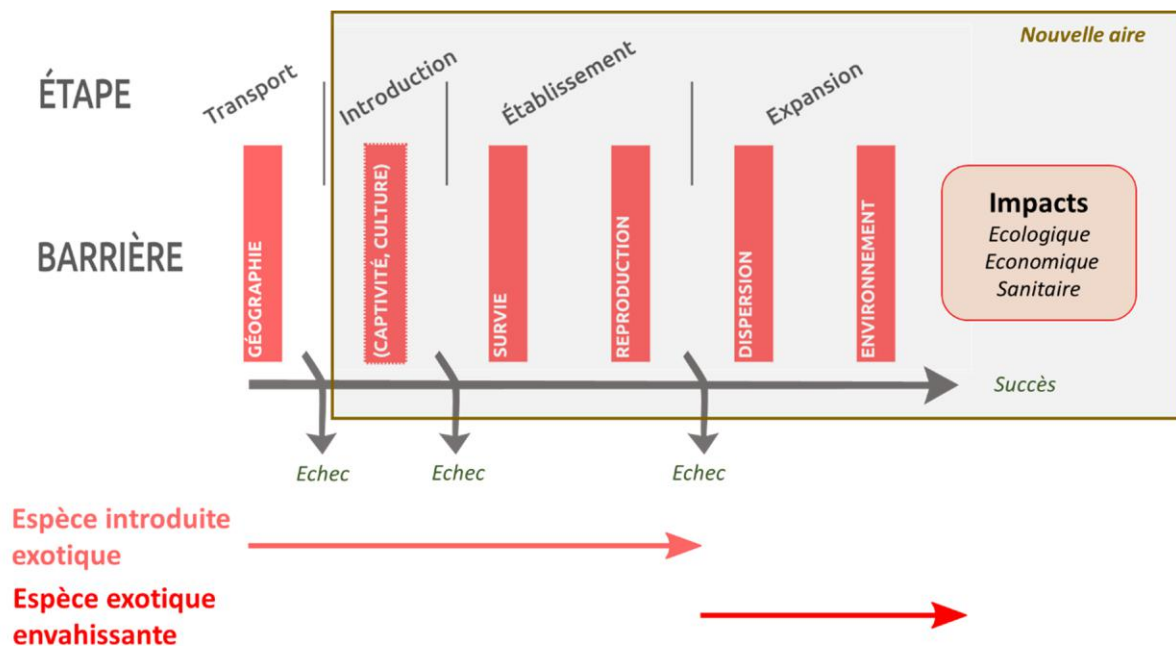


Figure 1. Représentation schématique des différentes étapes constituant une invasion, les barrières à franchir et la terminologie associée, adaptée d'après Kolar & Lodge (2001), Sakai et al. (2001), Blackburn et al. (2011) et Renault et al. (2018).

La phase de transport est généralement favorisée par les activités humaines (Sakai et al. 2001, Allendorf & Lundquist 2003). Au cours de la phase d'établissement, différents facteurs peuvent intervenir pour faciliter l'établissement d'une espèce dans la nouvelle aire comme la mondialisation et les circuits commerciaux (Floerl & Inglis 2005, Floerl et al. 2009, Bacon et al. 2014). En effet, ceux-ci permettent l'introduction de nouveaux individus, répétée dans le temps et dans l'espace, appelée pression de propagule (Lockwood et al. 2005). De même, le changement climatique et l'anthropisation peuvent modifier les conditions environnementales rencontrées par les espèces dans la nouvelle aire (e.g. températures plus chaudes en ville, habitats perturbés offrant des niches écologiques vides) et ainsi augmenter leurs chances de s'établir (Sakai et al. 2001, Hui et al. 2017). Enfin, la phase d'expansion peut (i) résulter de la dispersion de l'espèce par ses propres moyens comme c'est majoritairement le cas pour le frelon asiatique, *Vespa velutina*, (Robinet et al. 2016) mais aussi (ii) provenir du transport de l'insecte par les activités humaines (Sakai et al. 2001, Wilson et al. 2009).

1.1.1.3 Une augmentation exponentielle des introductions d'espèces exotiques

Depuis la fin du XX^e siècle, les introductions d'espèces exotiques sont en constante augmentation (Pysek et al. 2010, Roques 2010b, Roques et al. 2016, Seebens et al. 2017, 2018), une majorité d'entre elles s'effectuant désormais de manière accidentelle (Wilson et al. 2009). Cette tendance est visible au niveau de la quasi-totalité des niveaux taxonomiques sauf les mammifères et les poissons pour lesquels un léger ralentissement a été observé (Seebens et al. 2017). En parallèle, certains continents comme l'Europe ne semblent pas présenter de saturations dans leur capacité d'accueil d'espèces introduites.

L'intensification des échanges à l'échelle de la planète, la rapidité des transports, l'essor du commerce des plantes ornementales et produits agricoles, le réchauffement climatique, sont autant de facteurs contribuant à l'introduction non intentionnelle et à la survie d'organismes dans de nouvelles zones géographiques éloignées de leur région d'origine (Pysek et al. 2010, Su 2013, Bacon et al. 2014, Seebens et al. 2015, 2017). Les espèces envahissantes représentent une menace pour la biodiversité (Allendorf & Lundquist 2003, Rodriguez 2006, Facon et al. 2008) en favorisant l'homogénéisation du vivant à l'échelle du globe (Wilson et al. 2009, Pysek et al. 2010, Su 2013), et peuvent également avoir un impact sur les écosystèmes eux-mêmes en modifiant les flux d'eau ou de nutriments (Nentwig et al. 2017). Ces espèces ont aussi des conséquences négatives sur les activités humaines en entraînant des pertes financières très importantes dans de nombreux secteurs économiques comme en agriculture, en foresterie, en aquaculture ou encore en pisciculture (Nentwig et al. 2017). Elles représentent également une menace pour la santé humaine en étant parfois vecteur de maladie (Prentis et al. 2008).

Malgré une prise de conscience de l'ampleur du phénomène et une augmentation des recherches sur les invasions biologiques ces vingt dernières années (Figure 2), les invasions biologiques restent encore à l'heure actuelle un problème sociétal majeur (Hulme 2015, Seebens et al. 2017, 2018, Ricciardi et al. 2017, Dehnen-Schmutz et al. 2018).

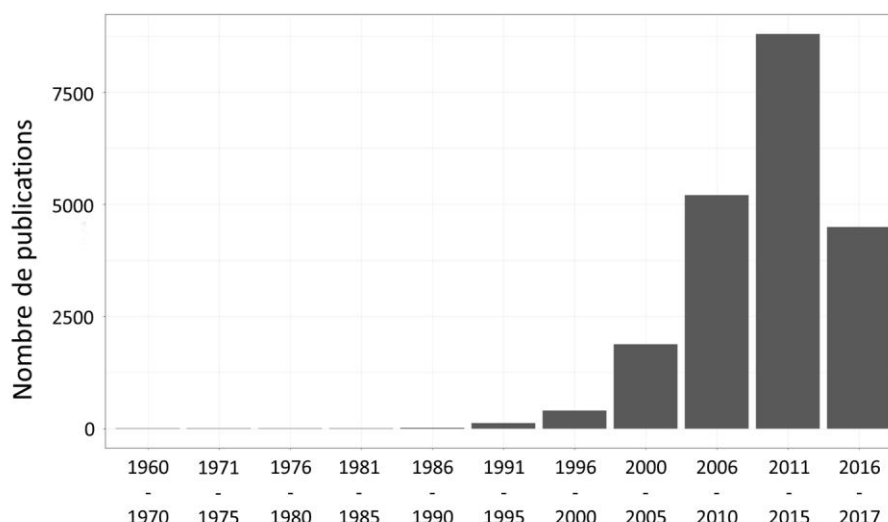


Figure 2. Evolution du nombre de publications portant sur les invasions biologiques de 1960 à 2017, estimée d'après le nombre de publications référencées dans la base de données *Web of Science* et contenant un des termes suivant « *alien species* », « *invasive species* » ou « *biological invasion* ».

1.1.2 Les échanges commerciaux et les introductions d'espèces exotiques, deux processus intimement liés

L'introduction par l'Homme d'organismes en dehors de leur aire d'origine n'est pas un phénomène récent et aurait même commencé dans les temps préhistoriques (Hulme 2009, Roques 2010b, Santini et al. 2018). Ainsi, depuis plusieurs millénaires, des espèces ont été introduites de manière volontaire en raison de leur intérêt économique mais d'autres ont été introduites accidentellement par les activités humaines, comme ce fut par exemple le cas de la souris grise, *Mus musculus domesticus* (Lippens et al. 2017). Cependant, on considère que les introductions se sont significativement accélérées au cours du XV^e siècle avec le début des colonies européennes dans les Amériques et le transport associé d'animaux et de plantes (Roques et al. 2009, Hulme 2009, Drew et al. 2010, Guillemaud et al. 2011, Su 2013, Santini et al. 2018). Au milieu du XX^e siècle, le phénomène a pris notablement plus d'ampleur en parallèle du développement de nouveaux systèmes de transports plus rapides (maritimes et aériens), qui augmentaient les chances de survie des espèces, et l'ouverture de nouvelles voies commerciales (Floerl et al. 2009, Hulme 2009, Roques 2010a, Santini et al. 2018). Cette mondialisation des échanges a été caractérisée par l'évolution des moyens de transport qui a permis l'augmentation du volume de biens et de personnes transité à l'échelle du globe. Ainsi, 7,4 milliards de tonnes de marchandises ont été acheminées uniquement par la mer en 2007 (Kaluza et al. 2010). Cela s'est aussi traduit par l'émergence de nouveaux pays dans le commerce international comme la Chine ou l'Argentine (Seebens et al. 2018). Depuis une vingtaine d'années, l'Asie est devenue un point central dans le mouvement des containers avec l'ouverture de nouveaux marchés, passant devant les Etats-Unis et l'Europe (Roques 2010a). Actuellement, on observe une augmentation exponentielle du volume

de marchandises transportées à travers le monde (Floerl & Inglis 2005, Floerl et al. 2009, Hulme 2009, Santini et al. 2018) et en parallèle, une augmentation similaire du nombre d'espèces introduites (Perrings et al. 2005, Hulme 2009, 2015, Roques 2010b, Seebens et al. 2017, 2018).

Les circuits commerciaux deviennent de plus en plus complexes, impliquant des secteurs variés, de nouveaux sites d'exportations et d'importations, des volumes de marchandises toujours plus élevés et une diversification des plateformes de transports (Perrings et al. 2005, Floerl et al. 2009, Hulme 2009, Roques 2010a, Kaluza et al. 2010, Eschen et al. 2015a, Meurisse et al. 2018). L'évolution rapide des marchés commerciaux, en plus des transports, rend plus difficile l'adaptation de mesures de traçabilité et de contrôle efficaces (Smith et al. 2007, Hulme 2009, Roques 2010a, Eschen et al. 2017). Wilson et al. (2009) ont étudié l'évolution de différentes voies commerciales par lesquelles des plantes, des mammifères, des espèces marines et des reptiles ont été introduits en Afrique du Sud entre 1700 et 2000. Ils ont montré que les conséquences de ces voies commerciales variaient en fonction des organismes considérés mais que pour la moitié d'entre elles, l'introduction d'espèces avait augmenté. Ainsi, de nombreux circuits peuvent favoriser l'introduction d'espèces à la fois de manière intentionnelle et non intentionnelle (Perrings et al. 2005). Les plus importants sont actuellement le commerce de plantes ornementales (Perrings et al. 2005, Eschen et al. 2017), le commerce d'animaux de compagnie mais aussi le transport de marchandises ou de passagers (Hulme 2009, 2015, Colunga-Garcia et al. 2010). De plus, l'apparition d'internet et de la vente par correspondance a également joué un rôle dans le changement des flux commerciaux et ouvert de nouvelles voies d'invasion pour les espèces (Lenda et al. 2014, Humair et al. 2015). L'augmentation attendue du commerce à l'échelle internationale dans les prochaines années, avec l'apparition de nouvelles routes (*e.g.* ouverture de l'Océan Arctique), suggère que l'introduction d'espèces risque de continuer à augmenter (Seebens et al. 2017).

1.1.3 Les invasions biologiques d'insectes et leurs conséquences

Le nombre d'arthropodes terrestres, dont les insectes, introduits par an en Europe reste en constante augmentation avec globalement un taux d'arrivée multiplié par deux au cours des trente dernières années (Roques 2010b, Seebens et al. 2017). L'arrivée de ces arthropodes exotiques se traduit par des pertes économiques de milliards de dollars rien qu'en Europe (Pimentel et al. 2001, Bacon et al. 2014). D'après la base de données DAISIE (Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe¹), répertoriant les espèces considérées comme exotique, les insectes correspondraient à 90% des arthropodes terrestres introduits (Roques et al. 2009). La pression de propagule (Lockwood et al. 2005), la présence d'hôtes et de climats propices dans le milieu receveur sont autant de facteurs qui favorisent leur établissement (Bacon et al. 2014). En Europe, le nombre d'insectes introduits dans un pays serait corrélé au volume de marchandises

¹ Les adresses des sites internet sont référencées à la fin de ce manuscrit.

importées, à la densité du réseau routier et à la densité de population (Roques 2010b). De plus, un tiers de ceux introduits ces dernières décennies proviennent d'Asie (Roques 2010a). A l'heure actuelle, les insectes sont majoritairement introduits à travers le commerce de plantes d'ornement et les matériaux d'emballage en bois (Kenis et al. 2007, Roques 2010a, Liebhold et al. 2012, Meurisse et al. 2018). Parallèlement, l'introduction de phytophages depuis le début du siècle a augmenté par rapport aux détritivores, parasitoïdes et prédateurs (Roques 2010b).

Les insectes présentent des impacts économiques importants car ils sont souvent associés à différents secteurs de l'économie comme l'agriculture (Guillemaud et al. 2011), la foresterie ou l'horticulture (Liebhold et al. 2018), et dans la majorité des cas, ils sont transportés accidentellement (Roques et al. 2016, Meurisse et al. 2018). Le coût des invasions est estimé aujourd'hui à 70 milliards de dollars par an à l'échelle du globe (Bradshaw et al. 2016). En agriculture, on estime à 33 milliards de dollars par an les pertes dues aux insectes et à 15,9 milliards de dollars par an les dégâts causés par les insectes envahissants uniquement pour les Etats-Unis (Pimentel et al. 2001). Par exemple, la mouche des fruits, *Drosophila suzukii*, introduite aux Etats-Unis dans les années 2000, s'attaque à de nombreux fruits (Plantamp 2016, Fraimout et al. 2017). Les dégâts peuvent atteindre 100% des récoltes et la perte économique annuelle a été estimée à 511 millions de dollars (Walsh et al. 2011). Une autre espèce s'attaquant aux fruits, la punaise diabolique, *Halyomorpha halys*, introduite à la fin des années 1990, a généré des pertes économiques estimées à 37 millions de dollars en 2010 uniquement pour la production de pomme dans les états de New York, du New Jersey et de Pennsylvanie (Garipey et al. 2014, 2015). Au sein du secteur forestier, les dégâts causés à la fois par les insectes et les pathogènes envahissants se chiffrent en milliards de dollars par an aux Etats-Unis (Pimentel et al. 2001, Liebhold et al. 2012). Ainsi, le programme d'éradication du capricorne asiatique des agrumes, *Anoplophora chinensis*, introduit au début des années 2000, coûterait 2,2 millions de dollars par an (Liebhold et al. 2012) tandis que celui concernant l'espèce proche *A. glabripennis*, introduite au début des années 1990 aurait coûté de l'ordre de 373 millions de dollars entre 1997 et 2006 (Haack et al. 2010). Ces insectes exotiques introduits induisent aussi des problèmes de santé humaine car ils peuvent être vecteurs de nombreuses maladies. A l'heure actuelle, on estime qu'environ 45% de la population européenne est exposée aux risques de maladies transportées par les moustiques (*e.g.* malaria, chikungunya, zika) (Petrić et al. 2014). On estime le coût annuel des impacts sur la santé, tout insecte envahissant confondu, à 6,9 milliards de dollars à l'échelle du globe (Bradshaw et al. 2016). Enfin, les insectes envahissants ont également des incidences sur les écosystèmes, en particulier sur les écosystèmes forestiers (Kenis et al. 2009, Roques 2010b), mais elles sont souvent difficilement quantifiables (Simberloff et al. 2013, Mitchell et al. 2018).

1.1.4 Une expansion fulgurante pour une partie des insectes récemment introduits

Depuis une vingtaine d'années, on observe en Europe une augmentation à la fois de la vitesse d'établissement (Seebens et al. 2018) mais aussi de l'expansion chez les insectes accidentellement introduits durant cette période (Roques et al. 2016). Ce phénomène n'avait encore jamais été observé auparavant. La chute du mur de Berlin, l'élargissement de l'Union Européenne et la libéralisation du commerce entre les pays membres a favorisé les échanges de biens et de personnes en réduisant les barrières administratives (Eschen et al. 2017). Ces changements structurels politico-économiques ont également pu favoriser le transport d'espèces envahissantes et leur dispersion rapide au sein de l'Europe (Roques et al. 2016, Santini et al. 2018). Parmi les insectes exotiques introduits après 1990 en Europe, Roques et al. (2016) ont identifié une quinzaine d'espèces présentant une invasion dite « fulgurante » (Figure 3). Ces espèces ont colonisé un grand nombre de pays voire la totalité de l'Europe en moins de 10 ans et sont parfois observées comme envahissantes sur d'autres continents. C'est notamment le cas pour deux espèces originaires d'Asie : la mouche des fruits, *Drosophila suzukii*, qui est aujourd'hui présente aussi à Hawaï, aux Etats-Unis, au Brésil et à la Réunion (Framout et al. 2017), et le cynips du châtaignier, *Dryocosmus kuriphilus*, qui a également colonisé l'Amérique du Nord (Martinez-Sañudo et al. 2018) (Table 1). Cette espèce aurait été introduite à partir du commerce d'ornement (Avtzis & Matosevic 2013) comme la moitié des espèces mises en avant par Roques et al. (2016) (EPPO Global database).

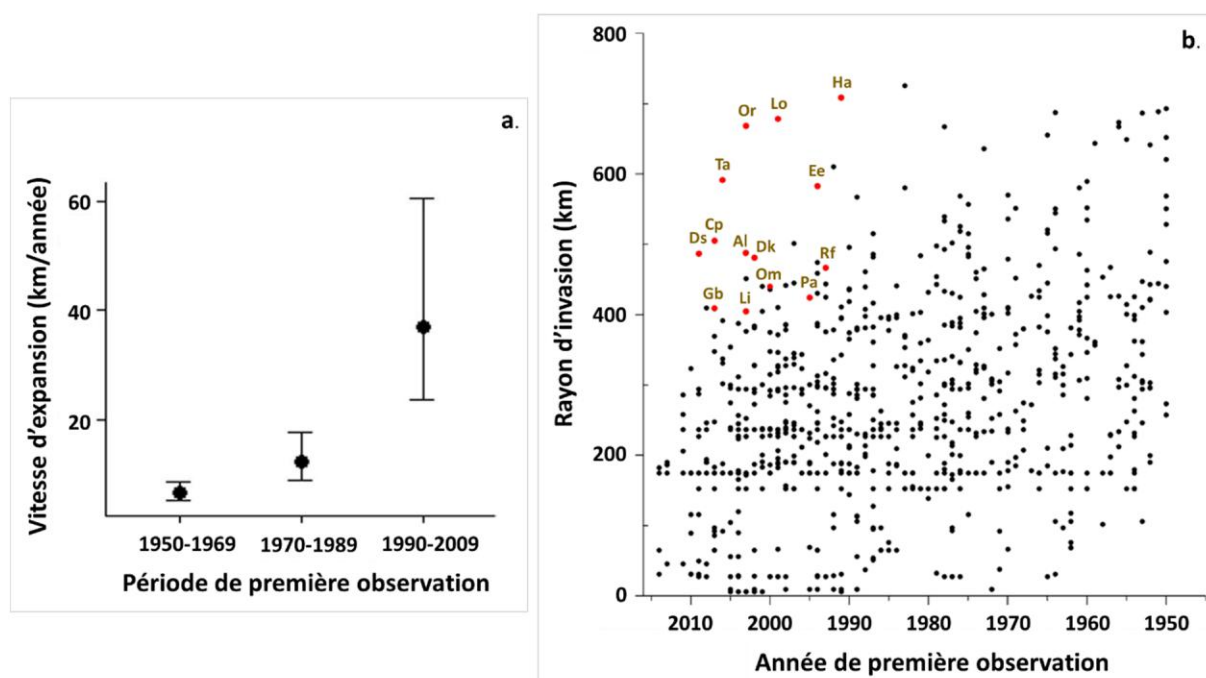


Figure 3. Evolution de la vitesse d'expansion des insectes introduits en Europe à partir de leur première observation jusqu'aux années 2000, adapté d'après Roques et al. (2016).

a. Estimation de la vitesse d'expansion d'insectes exotiques selon leur période d'arrivée entre 1950 et 2009.

b. Patrons d'invasion d'insectes exotiques dont le premier signalement en Europe se situe entre 1950 et 2014. Certaines espèces présentant une invasion fulgurante sont représentées en rouge et par leur nom abrégé : Aj : *Acizzia jamatonica* ; Al : *Aproceros leucopoda* ; Cp : *Cydalima perspectalis* ; Ds : *Drosophila suzukii* ; Dk : *Dryocosmus kuriphilus* ; Ee : *Eretmocerus eremicus* ; Gb : *Glycaspis brimblecombei* ; Ha : *Harmonia axyridis* ; Li : *Leptocybe invasa* ; Lo : *Leptoglossus occidentalis* ; Or : *Obolodiplosis robiniae* ; Om : *Ophelimus maskelli* ; Pa : *Paysandisia archon* ; Rf : *Rhynchophorus ferrugineus* et Ta : *Tuta absoluta*.

Tableau 1. Description des espèces d'insectes identifiées par Roques et al. (2016) comme présentant une invasion fulgurante en Europe. Les années de première observation sont indiquées uniquement pour les espèces introduites accidentellement en Europe.

Nom d'espèce	Famille	Aire native	Aire envahie	Espèces végétales ou animales attaquées	Voies d'introduction supposées	Année 1 ^e obs.
<i>Acizzia jamatonica</i>	Hymenoptera	Asie	Europe	<i>Albizzia</i> spp	Commerce de plantes d'ornement	2002
<i>Aproceros leucopoda</i>	Hymenoptera	Asie	Europe	<i>Ulmus</i> spp	Commerce de plantes	2003
<i>Cydalima perspectalis</i>	Lepidoptera	Asie	Europe	<i>Buxus</i> spp	Commerce de plantes d'ornement	2007
<i>Drosopila suzukii</i>	Diptera	Asie	Europe, Amérique du Nord et du Sud,	Fruits rouges, pêche, raisin, ...	Importation de fruits	2008
<i>Dryocosmus kuriphilus</i>	Hymenoptera	Asie	Europe, Etats-Unis	<i>Castanea</i> spp	Commerce de plantes d'ornement	2002
<i>Eretmocerus eremicus</i>	Hymenoptera	Afrique	Europe	Aleurodes	Introduit délibérément pour la lutte biologique	-
<i>Harmonia axyridis</i>	Coleoptera	Asie	Europe, Amérique du Nord et du Sud, Afrique du Sud	Pucerons	Introduit délibérément pour la lutte biologique	-
<i>Leptocybe invasa</i>	Hymenoptera	Australie	Afrique, Brésil, Etats-Unis, Europe, Asie	<i>Eucalyptus</i> spp	Commerce de plantes d'ornement	2003
<i>Leptoglossus occidentalis</i>	Hemiptera	Etats-Unis	Europe, Asie, Afrique du Nord	<i>Abies</i> spp, <i>Pinus</i> spp, <i>Pseudotsuga</i> spp, <i>Larix</i> spp, <i>Picea</i> spp, ...	Contaminant	1999
<i>Obolodiplosis robiniae</i>	Diptera	Amérique du Nord	Asie, Europe	<i>Robinia pseudoacacia</i>	-	2003
<i>Ophelimus maskelli</i>	Hymenoptera	Océanie	Europe	<i>Eucalyptus</i> spp	-	2004
<i>Paysandisia archon</i>	Lepidoptera	Amérique du Sud	Europe	Palmiers (<i>Brahea</i> spp, <i>Chamaerops</i> spp, ...)	Commerce de plantes d'ornement	2001
<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	Coleoptera	Asie	Europe, Amérique du Nord, Afrique du Nord, Océanie	Palmiers (<i>Areca</i> spp, <i>Borassus</i> spp, ...)	Commerce de plantes d'ornement	1999
<i>Tuta absoluta</i>	Lepidoptera	Amérique du Sud	Europe, Afrique, Asie	Solanacées, Amaranthacées ...	Commerce de fruits et légumes, commerce de plantes d'ornement	2006

1.2 Commerce d'ornement, fonctionnement et implication dans les invasions biologiques

1.2.1 Définition du commerce d'ornement : de la plante à la crevette

Le commerce d'ornement inclut différents secteurs dont le commerce de plantes ornementales et l'aquariophilie. Ces deux secteurs se sont beaucoup développés ces dernières années (Drew et al. 2010, Strecker et al. 2011, Eschen et al. 2014, Mendoza et al. 2015, Watson et al. 2018). Ils sont considérés aujourd'hui comme des voies d'introduction (volontaire et involontaire) d'un certain nombre d'espèces devenues envahissantes (Strecker et al. 2011, Patoka et al. 2016, Eschen et al. 2017, Watson et al. 2018). L'aquariophilie permet le transport et la vente de différents organismes comme les poissons, les algues ou encore des invertébrés. Au Mexique, 43 millions de poissons sont commercialisés par an (Mendoza et al. 2015), et au moins 10 millions d'invertébrés sont collectés dans le monde pour être revendus par la suite (Watson et al. 2018). Le commerce de plantes d'ornement permet quant à lui le transport et la vente d'un grand nombre de végétaux sous différentes formes : plantes en pots, fleurs coupées, graines, bulbes, plantes déracinées, greffons (Eschen et al. 2017). Il reste le secteur ayant à la fois le volume de marchandises le plus élevé mais aussi le plus diversifié (Drew et al. 2010, Pautasso & Jeger 2014). Les ventes annuelles de plantes d'ornement représentent 4,3 milliards de dollars aux USA et 1 milliard de dollars rien que pour l'Angleterre (Hulme et al. 2017).

1.2.2 Fonctionnement du commerce de plantes ornementales à l'échelle internationale, européenne et française

Le transport et la culture de plantes dans un but d'ornement est un phénomène ancien. Pendant la période de la Rome antique, les Romains ont transporté des graines et différentes plantes méditerranéennes à travers l'Europe (Van Kleunen et al. 2018, Santini et al. 2018). Le buis a, en particulier, fait partie de ces plantes (Di Domenico et al. 2012). Au cours des différentes périodes de l'Histoire, le transport de plantes a continué mais c'est à partir du XVIII^e et du XIX^e siècle que le commerce de plantes d'ornement a réellement émergé à l'échelle internationale, à la suite des différentes expéditions menées depuis les pays Européens vers l'Amérique, l'Asie ou l'Afrique. Les principaux acteurs de ce commerce étaient alors les chasseurs de plantes, ou « *plant hunters* », qui s'occupaient de collecter les parties végétatives de la plante pour les cultiver et les vendre par la suite (Drew et al. 2010). Le secteur a continué à se développer et s'est récemment complexifié, que ce soit au niveau des entreprises impliquées ou des circuits de distribution (Drew et al. 2010, Hulme et al. 2017). Par exemple, des plantes peuvent être importées depuis plusieurs pays durant une même période (Eschen et al. 2017). Son fonctionnement a également évolué en parallèle du développement de nouvelles technologies (*e.g.* cultures hors sol, multiplication végétative *in vitro*), des modes de consommation, de l'attrait des consommateurs et de la

demande du marché (Drew et al. 2010, van Valkenburg et al. 2014). Aujourd’hui, le commerce de plantes ornementales implique un grand nombre d’acteurs allant de la production à la distribution (Cadic & Widehem 2006, Drew et al. 2010, Hulme et al. 2017) (Figure 4). De plus, ce secteur est en constant changement aussi bien au niveau des zones d’origines des plantes que pour les genres de plantes importés (Pautasso & Jeger 2014, van Valkenburg et al. 2014, Eschen et al. 2017, Santini et al. 2018, Meurisse et al. 2018). La valeur monétaire du commerce de plantes d’ornement est également en augmentation, aussi bien en Europe que dans d’autres régions du monde (Drew et al. 2010, Liebholt et al. 2012, Eschen et al. 2017, Van Kleunen et al. 2018).

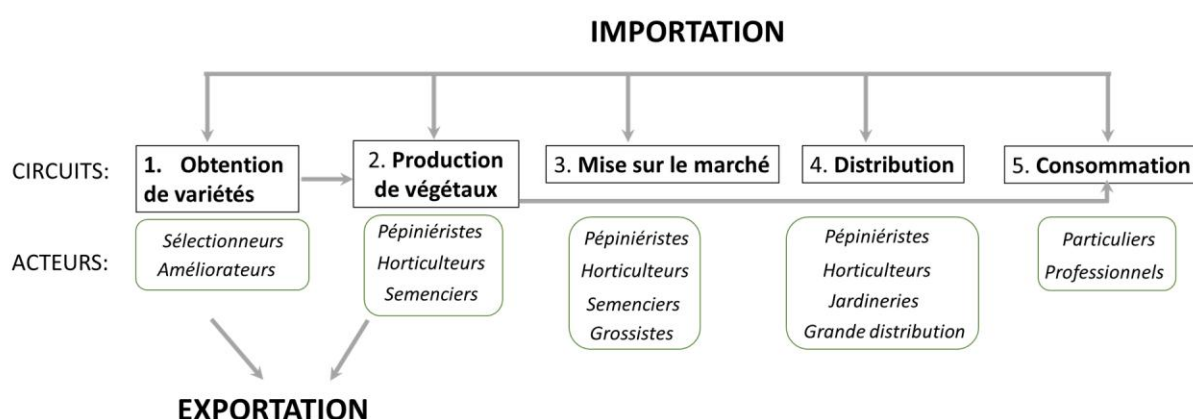


Figure 4. Schéma non exhaustif du circuit de l'importation de plantes ornementales indiquant les différents acteurs associés, adapté d'après Cadic & Widehem (2006) et Drew et al. (2010).

A l'échelle européenne, le volume importé atteint plus de 3 milliards de plants en moins de dix ans (Eschen et al. 2017). Ces plantes proviennent de diverses régions du monde (Santini et al. 2018) mais la majorité est importée depuis la Chine (van Valkenburg et al. 2014, Eschen et al. 2017). Leur diversité est importante avec 1 200 genres de plantes importés uniquement en 2010. Les volumes varient en fonction des pays. Les pays de l'Europe de l'Ouest sont les plus gros importateurs et producteurs (van Valkenburg et al. 2014). En effet, les Pays-Bas arrivent en premier avec 3 milliards de plants importés en 2009, suivis successivement par l'Allemagne (668 millions de plants), l'Italie (94 millions) et la France (84 millions) (Eschen et al. 2017). Les Pays-Bas apparaissent comme le leader du commerce de plantes d'ornement à l'échelle de l'Europe, aussi bien pour le nombre de plantes importées (diversité des espèces et de leur origine) (Eschen et al. 2017) que pour le volume exporté (Cadic & Widehem 2006).

A l'échelle française, le nombre de plantes importées est 5 fois plus important que la production interne. Ces importations proviennent en premier lieu des Pays-Bas puis de la

Belgique, de l'Italie et de l'Espagne. Mais la France est également un pays producteur de plantes d'ornement, qui exporte principalement vers les Pays-Bas, l'Italie, l'Espagne, l'Allemagne et la Suisse (Cadic & Widehem 2006). Au sein de l'Hexagone, les principaux vendeurs de plantes d'ornement sont la grande distribution, regroupant les grandes surfaces alimentaires et les jardinerie d'hypermarchés, puis les jardinerie spécialisées. Ainsi, 50% de la quantité de plantes d'extérieur ont été achetées chez ces vendeurs entre 2012 et 2014 (FranceAgriMer, Données et Bilan, 2015, BIL).

1.2.3 A travers le commerce d'ornement de plantes, une voie d'introduction involontaire d'un grand nombre d'organismes, dont les insectes

Le commerce de plantes d'ornement a été identifié comme voie majeure d'introduction (volontaire et involontaire) d'un grand nombre d'organismes, des plantes elles-mêmes aux insectes, en Europe et aux Etats-Unis mais également en Amérique du Sud (Drew et al. 2010, Eschen et al. 2014, Van Kleunen et al. 2018). La variation à la fois de la demande et des espèces de plantes introduites rend difficile l'anticipation des espèces présentant un risque d'être introduites accidentellement et/ou de devenir envahissantes (Eschen et al. 2014, 2017, Pautasso & Jeger 2014). A l'heure actuelle, les inspections de marchandises ciblent les ravageurs présents sur les listes de quarantaine (Eschen et al. 2014, Hulme et al. 2017) alors que la grande majorité des plantes introduites ces dix dernières années en Europe changent annuellement (Eschen et al. 2017). Cela rend difficile l'actualisation des espèces à risques devant figurer sur les listes de quarantaine, augmentant donc le risque d'introduction d'organismes absents de ces listes. De plus, le développement et l'accroissement du commerce en ligne favorise le transport sur des distances plus ou moins grandes d'un nombre élevé de plantes, dont certaines sont déjà envahissantes (Lenda et al. 2014).

Le commerce d'ornement s'est traduit par l'introduction délibérée d'un grand nombre de plantes, dont certaines sont aujourd'hui considérées comme envahissantes (e.g. le Robinier faux-acacia, *Robinia pseudoacacia* ou l'érable negundo, *Acer negundo* ; Marozas et al. 2015) mais il a aussi permis l'introduction accidentelle d'un grand nombre d'insectes et de pathogènes exotiques (Kenis et al. 2007, Roques 2010a, Liebhold et al. 2012, Pergl et al. 2017, Vettraino et al. 2017, Santini et al. 2018). Eschen et al. (2017) ont ainsi identifié plus de 300 genres de plantes pouvant permettre l'introduction d'organismes nuisibles. A l'échelle de l'Europe, le commerce de plantes d'ornement aurait permis l'introduction involontaire de 38% d'espèces d'insectes exotiques identifiées à ce jour (Roques et al. 2009). Aux Etats-Unis, Liebhold et al. (2012) ont estimé à 70% la part des dégâts causés en milieu forestier par les insectes et pathogènes introduits *via* ce circuit. En France, près de 70% des introductions d'insectes d'importance agronomique au cours de la dernière décennie sont imputables à ce secteur, en particulier au commerce de plantes ligneuses (arbres ou arbustes) (Martinez et al. 2014). Les plantes sont transportées rapidement ce qui

augmente les chances de survie des insectes (Roques 2010a). Comme les insectes exotiques sont souvent introduits avec leur plante hôte destinée à être plantée en Europe, cela peut faciliter leur établissement (Eschen et al. 2014). Par ailleurs, ces plantes hôtes ont tendance à être plantées à l'extérieur, ce qui peut aussi augmenter les chances de s'établir pour les insectes (Meurisse et al. 2018). La majorité des insectes introduits par ce secteur ornemental viennent actuellement d'Asie, que ce soit aux Etats-Unis ou en Europe (Kenis et al. 2007, 2018, Roques 2010b, Liebhold et al. 2018). Les exemples les plus emblématiques sont le capricorne asiatique des agrumes, *Anoplophora chinensis*, la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Kenis et al. 2018) ou encore le cynips du châtaignier *Dryocosmus kuriphilus* (Avtzis & Matosevic 2013). Parmi les pathogènes, la cylindrocladiose du buis, *Calonectria pseudonaviculata*, ou la chalarose du frêne, *Hymenoscyphus fraxineus*, présentent des dégâts économiques importants à l'heure actuelle en Europe (Kenis et al. 2018).

1.3 Importance de connaître les routes d'invasion suivies par les insectes exotiques

1.3.1 Qu'est-ce qu'une route d'invasion ?

On définit les routes d'invasion, ou « *pathways* », comme les voies géographiques empruntées par des individus entre une population dite source et une population envahissante apparue à partir de ces individus (Estoup & Guillemaud 2010). Cela inclue l'introduction depuis la zone d'origine vers la nouvelle aire, l'expansion de populations envahissantes mais aussi les processus démographiques et génétiques associés (Estoup & Guillemaud 2010, Guillemaud et al. 2011). Il a été défini trois grands types de mécanismes permettant l'introduction d'espèces depuis un point *a* vers un point *b* : (i) importation de marchandises, (ii) arrivée par le transport d'un vecteur ou (iii) par dispersion naturelle depuis une zone déjà envahie. A partir de ces trois mécanismes d'introduction, six types de voie d'invasion ont été définis pour faciliter la compréhension des routes d'invasion. L'espèce peut être relâchée, s'échapper de captivité, contaminer des marchandises, être transportée par un vecteur, introduite à l'aide d'infrastructures mises en places par les activités humaines (*e.g.* routes, canal) formant un corridor entre deux régions inaccessibles auparavant, ou elles peuvent se déplacer à partir d'une région déjà envahie (Hulme et al. 2008, Hulme 2009, 2015, Pergl et al. 2017). En fonction du type de voie empruntée par l'espèce, les conséquences peuvent être différentes, en favorisant par exemple l'introduction d'une forte diversité d'espèces, d'organismes nuisibles comme les pathogènes ou d'un groupe (Pergl et al. 2017). Par exemple, les insectes sont majoritairement introduits involontairement en tant que contaminants de marchandises tandis que les plantes sont plus souvent introduites volontairement et s'échappent par la suite. De plus, lors du processus d'invasion, les espèces peuvent emprunter plusieurs voies, complexifiant la compréhension de

leurs routes d'invasion. A l'heure actuelle, quand les routes d'invasion sont connues ou supposées, elles sont référencées dans des bases de données (*e.g.* DAISIE, EPPO, IUCN ISSG Global Invasive Species Database). Dans le cas des introductions accidentelles, elles ne sont souvent pas connues.

1.3.2 Mieux comprendre les processus fondamentaux des invasions biologiques et adapter au mieux les stratégies de prévention et de lutte

L'étude des routes d'invasion vise à appréhender les raisons du succès d'une invasion ; c'est-à-dire comprendre pourquoi une espèce aurait mieux réussi par rapport à une autre qui aurait échoué (Guillemaud et al. 2011). On tente ainsi de préciser la ou les zones depuis laquelle (lesquelles) une espèce a été introduite, la pression de propagule, le nombre de populations envahissantes intermédiaires ou ayant servi de sources pour d'autres populations envahissantes (phénomène appelé « tête de pont » ou « *bridgehead* »). L'existence de phénomènes de mélange génétique résultant de la mise en contact d'individus appartenant à deux populations génétiquement différenciées (envahissantes ou natives) et appelés « *admixture*² » en anglais, peut aussi être définie. Tous ces éléments aident ainsi à la compréhension de l'historique de l'invasion et des processus de dynamique des populations impliqués (Guillemaud et al. 2011). Cela permet d'étudier l'impact de l'environnement sur les espèces et les forces évolutives associées qui ont pu favoriser ou non le succès d'une invasion (Guillemaud et al. 2010). Les routes d'invasion sont très souvent spécifiques d'une espèce mais des généralités peuvent en être tirées (*e.g.* traits biologiques favorisant l'invasion, zones sources identiques). Ces généralités peuvent être utilisées par la suite pour adapter les stratégies de gestion (Essl et al. 2015), et prévenir l'introduction de nouvelles espèces (Guillemaud et al. 2011). Mais cela peut aussi faciliter le contrôle d'une espèce en allant, par exemple, chercher des parasitoïdes dans la zone d'origine (Gwiazdowski et al. 2006) ou en adaptant les stratégies d'éradication (Blackburn et al. 2011). Cependant, l'éradication d'une espèce, une fois qu'elle est établie peut être très difficile (Simberloff et al. 2013), surtout dans le cas des insectes (Corin et al. 2007). Par conséquent, la gestion des routes d'introduction et des vecteurs associés pour prévenir l'introduction de nouvelles espèces, ou de nouvelles populations d'espèces déjà introduites, semble la stratégie la plus appropriée pour réduire l'impact négatif des invasions biologiques (Hulme 2009, 2015, Simberloff et al. 2013, Bacon et al. 2014, Essl et al. 2015, Pergl et al. 2017). Néanmoins, les espèces sont souvent introduites accidentellement, et les informations concernant leurs voies d'introduction et leur origine sont donc supposées voire inconnues, complexifiant l'identification des routes à risques (Pergl et al. 2017). C'est en particulier le cas des insectes, qui sont souvent transportés involontairement en raison de leur petite taille et qui ne sont généralement détectés qu'une fois établis et provoquant des dégâts (Roques 2010b). De plus, ils peuvent être amenés depuis de nombreux circuits et/ou certains ordres

² Le terme *admixture* définissant en anglais le mélange génétique entre 2 populations génétiquement différenciées décrit de manière plus succincte et claire ce phénomène. Par conséquent, j'ai choisi d'utiliser ce terme dans le reste de ce manuscrit.

peuvent être préférentiellement introduits par une ou plusieurs voies (Meurisse et al. 2018). Par exemple, les Coléoptères ont été fortement interceptés dans des produits transformés en bois (matériaux de bois, bûches, bois transformé) ou dans des containers alors que les Thysanoptères ont été interceptés majoritairement sur des plantes d'ornement. Néanmoins, les interceptions sont souvent non représentatives des espèces introduites car certains organismes ne figurant pas sur les listes de quarantaine ne sont pas recherchés (Roques 2010b, Eschen et al. 2014, Eschen et al. 2015a). Par exemple, la majorité des insectes et des pathogènes transportés à partir du commerce d'ornement ne sont pas détectés comme ravageurs avant d'être observés dans la zone envahie (Kenis et al. 2018).

Pour pallier le manque d'informations sur les routes d'introduction, différents outils peuvent être utilisés pour mieux comprendre le processus d'invasion. Parmi eux, la collecte de données de la littérature (*e.g* années de premières observations, biologie de l'espèce, occurrence) et l'utilisation de la génétique sont fréquemment employés. Les données acquises permettent de comprendre les différents événements pouvant avoir eu lieu et les acteurs impliqués durant l'invasion (zones sources, vecteurs, nombre d'introductions ou chemins de dispersion secondaire). Toutes ces données peuvent être utilisées par la suite par les gestionnaires ou les décisionnaires (Estoup & Guillemaud 2010, Cristescu 2015).

1.4 Zone d'origine et traits de vie des insectes exotiques parfois mal connus

1.4.1 Mauvaise connaissance de la zone d'origine

A l'échelle du globe, la diversité du vivant n'est connue que très partiellement (Mora et al. 2011, Seebens et al. 2018). On estime à 86% le pourcentage d'espèces encore à décrire en milieu terrestre (Mora et al. 2011), et au sein des insectes, entre 1,8 et 2,6 millions d'espèces encore non décrites (Hodkinson & Casson 1991). Une forte proportion des espèces d'insectes nouvellement introduites sur d'autres continents depuis le début des années 2000, sont considérées comme « émergentes » car n'ayant jamais été précédemment détectées ailleurs que dans leur région d'origine (Seebens et al. 2018). La mise en place d'un dispositif d'arbres sentinelles sur deux sites en Chine a mis en évidence que l'association plante-insecte pour la majorité des espèces ayant colonisé ces plantations et présentant un caractère envahissant (80%), n'avait encore pas été décrite dans la littérature jusque-là (Kenis et al. 2018). De plus, parmi les insectes ayant été introduits en Europe, certains n'avaient encore jamais été détectés (14% d'insectes en 2008) (Roques 2010b). C'est notamment le cas de la mineuse du marronnier, *Cameraria orchidella*, observée pour la première fois en 1984 en Macédoine, puis en Autriche en 1989 et qui s'est ensuite propagée en Europe (Gilbert et al. 2005, Valade et al. 2009). Lors de ses premières observations, son origine était alors inconnue (Gilbert et al. 2005) et ce n'est qu'en 2009 que le

Sud des Balkans a été avancé comme zone d'origine probable au regard de la forte diversité génétique observée (Valade et al. 2009). La zone d'origine pour d'autres espèces de mineuses devenues envahissantes est encore mal, voire non, connue. Avant 2016, l'aire native connue de la mineuse *Phyllonorycter issikii* incluait le Japon, la Corée du Sud et l'Extrême Orient Russe. La récente étude phylogéographique de Kirichenko et al. (2017) a mis en évidence que cette espèce était aussi naturellement présente en Chine. Concernant la mineuse de la vigne *Antispila oinophylla*, l'espèce n'était pas connue de la science avant sa première observation en Italie (Kirichenko et al. 2018). Des comparaisons morphologiques et génétiques avec d'autres espèces de mineuses des vignes d'Europe et d'Amérique du Nord ont été nécessaires pour définir sa zone d'origine, les Etats-Unis (van Nieukerken et al. 2012).

Par ailleurs, le plus souvent, les espèces exotiques ne sont pas considérées comme des ravageurs dans leur zone d'origine, car elles sont régulées par des ennemis naturels ou ont co-évolué avec leurs hôtes. En conséquence, les données sur l'occurrence, la biologie ou autres caractéristiques peuvent être rares (Orlova-Bienkowskaja & Volkovitsh 2018, Sauvard et al. 2018). En fonction de la zone d'origine, ces données peuvent aussi être difficilement accessibles, notamment pour les espèces présentes en Asie car les informations peuvent être publiées dans différentes langues comme le Chinois, le Japonais ou le Russe (Kenis et al. 2018). Dans certains cas, l'espèce peut aussi avoir plusieurs synonymes complexifiant la collecte de données comme c'est le cas de l'agrile du frêne, *Agrilus planipennis*, ayant envahi les Etats Unis et pouvant être trouvé sous trois synonymes en Asie, sa zone d'origine (Orlova-Bienkowskaja & Volkovitsh 2018). L'espèce peut aussi être mal identifiée, comme ce fut le cas de la mineuse des vignes *Antispila oinophylla*. L'espèce était confondue avec la mineuse *Antispila ampelopsifoliella* avant sa détection comme espèce envahissante (Kirichenko et al. 2018).

1.4.2 Parfois associée à un changement de compartiment

Dans le cas des insectes forestiers, on observe parfois un changement de compartiment avec un passage du milieu forestier à urbain dans la zone d'origine. L'utilisation d'arbres forestiers en tant que plantes d'ornement dans les zones urbaines et péri-urbaines peut faciliter ce changement de compartiment en créant une continuité écologique avec le milieu forestier (Rossi & Rousselet 2016). Ce phénomène a notamment été observé chez la processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa*, en Europe et cela aurait facilité son expansion vers le Nord de la France (Robinet et al. 2012, Rossi et al. 2015). Ce type de changement a été observé aussi chez certaines espèces devenues envahissantes à l'heure actuelle. Chez la mineuse du marronnier, *Cameraria orchidella*, la plantation de marronniers à proximité des forêts des Balkans où elle est naturellement présente, aurait permis son passage en milieu urbain et ensuite sa dispersion dans le reste de l'Europe (Valade et al. 2009). Ce changement de compartiment a aussi été observé chez plusieurs espèces asiatiques comme l'agrile du frêne, *Agrilus planipennis*, qui est passé des forêts de frênes asiatiques aux frênes ornementaux américains plantés dans les villes (Orlova-

Bienkowskaja & Volkovitsh 2018) mais aussi chez le capricorne asiatique, *Anoplophora glabripennis* (Carter et al. 2009, 2010, Javal et al. 2017a), ou la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Nacambo et al. 2014, Wan et al. 2014). Ces changements de compartiment peuvent complexifier l'estimation de leur distribution naturelle dans leur zone d'origine car les données sont plus fournies dans le milieu urbain que dans le milieu forestier, l'insecte ne faisant pas de dégâts majeurs dans ce dernier. De plus, les perturbations anthropiques comme l'urbanisation sont connues pour favoriser l'invasion (Alberti et al. 2017), en augmentant par exemple les chances d'être transporté (Hufbauer et al. 2012) ou celles de s'établir (Alberti et al. 2017).

Chapitre 2

La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis*, un modèle d'étude pour comprendre les invasions fulgurantes



2.1 Caractéristiques biologiques et écologiques de la pyrale du buis

2.1.1 Taxonomie

La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) est un Lépidoptère appartenant à la super-famille des Pyraloidea qui comprend un grand nombre de familles et plus de 15 000 espèces décrites à ce jour (Regier et al. 2012), dont 30 espèces considérées comme exotiques introduites en Europe (Lopez-Vaamonde et al. 2010). La famille des Crambidae inclut notamment la sous-famille des Spilomelinae qui comprend 317 genres et un peu plus de 3 000 espèces décrites à ce jour dont certains ravageurs comme *Maruca vitrata*, des espèces du genre *Diaphania* ou encore la pyrale du buis. Depuis sa description en 1859, cette dernière a été placée dans différents genres de Spilomelinae : *Palpita* Hübner 1808, *Diaphania* Hübner 1818, *Glyphodes* Guenée 1854 et plus récemment *Neoglyphodes* Streltsov 2008 pour être finalement transférée dans le genre *Cydalima* à la suite d'études morphologiques réalisées par Mally & Nuss (2010) après son introduction en Europe. Depuis, le nom scientifique de la pyrale du buis est *Cydalima perspectalis*, mais elle est encore souvent mentionnée dans la littérature asiatique sous le nom de *Diaphania perspectalis* ou *Glyphodes perspectalis*. Le genre *Cydalima* regroupe aujourd'hui 9 espèces présentes en Asie et en Australie (Nuss 2018). Cependant, on ne trouve des données biologiques dans la littérature que pour *C. perspectalis* (Maruyama & Shinkaji 1987, Peng et al. 1994, Wan et al. 2014) et *C. laticostalis* (Ghorpade & Patil 1989).

2.1.2 Biologie et écologie de *C. perspectalis*

Ce Lépidoptère défoliateur s'attaque aux espèces du genre *Buxus* (Angiospermes, famille Buxaceae). Trois autres espèces de ligneux sempervirents ont été signalées comme hôtes potentiels : *Ilex purpurea* (Angiospermes, famille Aquifoliaceae), *Euonymus japonicus* et *E. alatus* (Angiosperme, famille Celastraceae) en Asie (Maruyama 1993, Casteels et al. 2011, Wan et al. 2014). Cependant, les signalements d'attaques sur ces trois espèces sont anecdotiques et nécessiteraient d'être confirmés. En Europe, l'insecte s'attaque uniquement aux plantes du genre *Buxus* (Leuthardt & Baur 2013, Brua 2014, Göttig 2017, Matošević et al. 2017) dont le buis commun endémique, *B. sempervirens*, et le buis du Caucase, *B. colchica* (Kenis et al. 2013, Gninenko et al. 2014, Mitchell et al. 2018). Il semble aussi capable de s'alimenter sur le buis des Baléares, *B. balearica* (Brua 2014), mais il existe peu de données sur cet arbre dont l'aire de répartition en Europe est très réduite (Di Domenico et al. 2012) et qui présente une composition en alcaloïdes plus élevée que le buis commun et le buis du Caucase (Vachnadze et al. 2009).

Dans sa zone d'origine, la pyrale du buis est un insecte multivoltin, présentant de 2 à 5 générations par an. En Corée, la première génération d'adultes émerge au mois de juin et la deuxième génération du mois d'août jusqu'à début septembre (Park 2008). Au Japon, 3 générations sont observées (Maruyama & Shinkaji 1987) et en Chine, 3 à 5 générations ont été

dénombrées en fonction de la latitude (Peng et al. 1994, Chen et al. 2005, Zhou et al. 2005, Wang 2008, Wan et al. 2014).

Dans la zone d'introduction, on observe de 2 à 4 générations également en fonction de la latitude. Dans les zones plus froides du Nord comme la Suisse ou certaines régions d'Allemagne, on observe 2 générations seulement (Nacambo et al. 2014, Göttig & Herz 2017) et plutôt 3 générations dans des zones plus chaudes d'Europe (Figure 5) comme la Croatie (Matošević et al. 2017) ou l'Italie (Santi et al. 2015). Les périodes de vol ont généralement lieu en juin pour la première génération, courant août pour la deuxième et peuvent se poursuivre jusqu'en octobre en fonction du climat. Dans certaines zones, la troisième génération est observée au mois de septembre-octobre, ce qui peut permettre une certaine superposition entre les individus de la deuxième et la troisième génération (Nacambo et al. 2014). En Russie et plus globalement en Asie Mineure, il y aurait jusqu'à 4 générations par an (Gninenko et al. 2014).

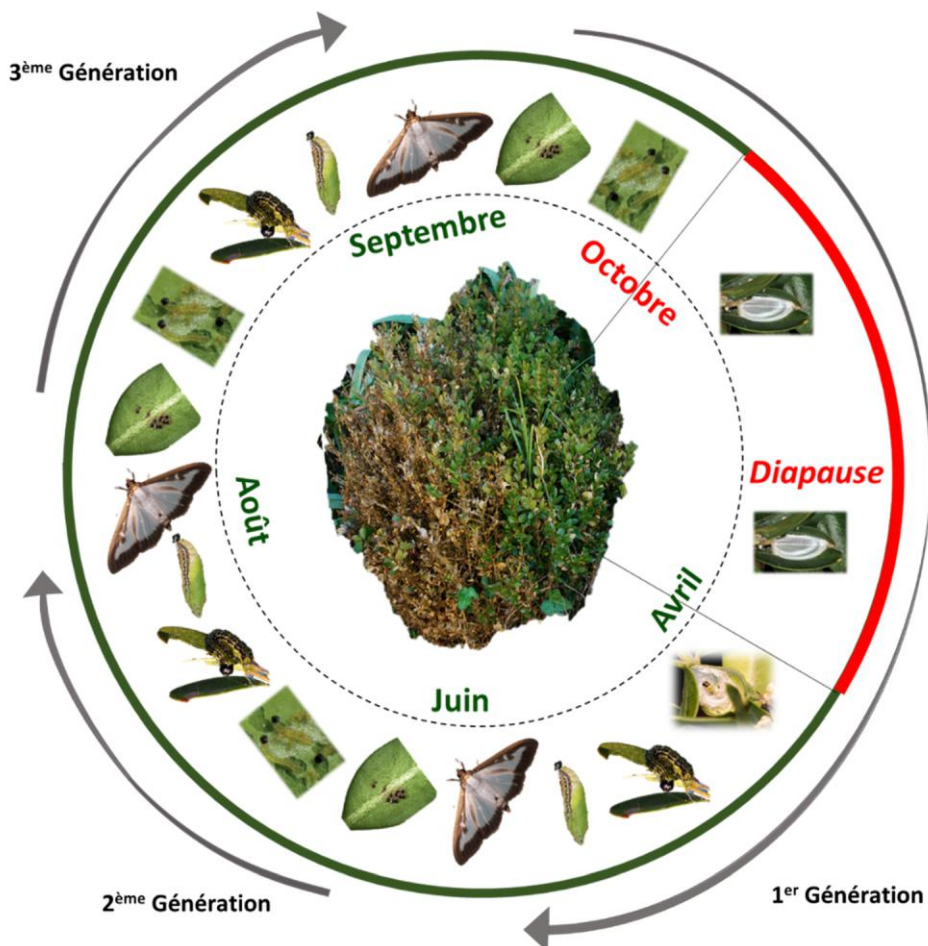


Figure 5. Cycle biologique de *C. perspectalis*. Le nombre de générations représenté correspond au cycle biologique de l'insecte observable en Région Centre-Val de Loire. La première génération est définie dans cette thèse comme étant celle qui passe l'hiver en diapause.

Le cycle biologique de *C. perspectalis* est rapide, sensible à la chaleur, et l'insecte passe du stade œuf à papillon en une quarantaine de jours à 25°C (Maruyama & Shinkaji 1987, 1991, Park 2008, Wan et al. 2014). L'adulte est un papillon nocturne et la femelle peut pondre jusqu'à 600 œufs en une semaine dans la zone d'origine et 800 œufs dans la zone d'introduction (Tabone et al. 2015). Les pontes sont généralement déposées en plaques d'une vingtaine d'œufs sur la surface des feuilles de buis, mais on peut en dénombrer jusqu'à 80 (A. Bras, pers. obs.). Le temps de développement des œufs est d'environ 4 jours. Le développement larvaire se compose de 5 à 7 stades (Maruyama & Shinkaji 1991, Park 2008, Nacambo et al. 2014, Wan et al. 2014, Göttig 2017) qui durent environ 3 jours chacun sauf le dernier stade larvaire qui dure une dizaine de jours, comme c'est le cas pour le stade nymphal (Kawazu et al. 2010a). Les adultes atteignent leur maturité sexuelle quelques jours après leur émergence et vivent une quinzaine de jours. Ils s'accouplent une fois au cours de leur vie durant les premières heures de la nuit (Kawazu et al. 2010b). Leur dispersion naturelle a été estimée à une dizaine de kilomètres en Europe (Van der Straten & Muus 2010).

Il existe un dimorphisme de couleur au stade adulte : une forme de couleur blanche et une forme de couleur brune (Figure 6). Ce dimorphisme n'est pas sexuel (Chen et al. 2005, Göttig & Herz 2017) mais son déterminisme n'a pas encore été appréhendé à ce jour. Les deux formes du papillon sont retrouvées en Chine comme dans la zone d'introduction. Dans la zone envahie, les deux morphes de couleurs sont présentes avec un ratio d'environ 20% d'insectes de couleur brune en Allemagne (Göttig 2017) comme en France (J.-C. Martin comm. pers.), la proportion relative des deux morphes n'est pas connue dans la zone d'origine asiatique.

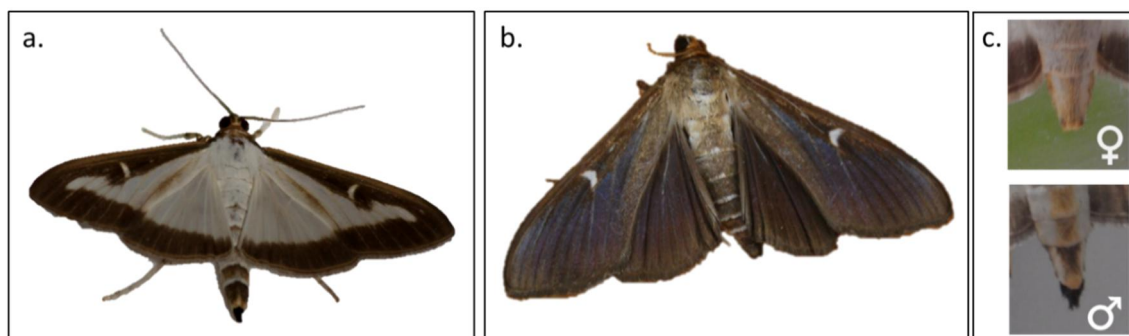


Figure 6. Adulte de pyrale du buis *Cydalis perspectalis*. a. Morphe de couleur blanche ; b. Morphe de couleur brune ; c. Dimorphisme sexuel, extrémité ventrale de l'abdomen.

La première génération de *C. perspectalis* est caractérisée par un arrêt de développement durant l'hiver (Figure 5) au cours duquel les insectes forment un cocon entre les feuilles de buis. Les larves réalisent une diapause hivernale induite par une diminution de la photopériode au début de l'automne en zone native (Maruyama & Shinkaji 1993, Xiao et al. 2011) comme en zone

envahie (Nacambo et al. 2014). Cependant, le seuil critique de la photopériode et les stades larvaires diapausants varient géographiquement en Asie : Au Nord de la Chine, la diapause se fait aux 2^e et 3^e stades larvaires alors qu’au Sud, cela peut aller jusqu’au dernier stade larvaire (She & Feng 2006, Xiao et al. 2011, Wan et al. 2014). Au Japon, la photopériode critique en-dessous de laquelle l’insecte entre en diapause est de 14h20 de jour au Nord du pays, et de 13h40 au Sud du pays pour une même température (Maruyama 1993). Dans la zone d’introduction, le fonctionnement de la diapause est moins connu. Quelques observations suggèrent que ce soit les jeunes stades larvaires de 2^e et 3^e stades (L2 et L3) qui entrent en diapause entre septembre et octobre (Gninenko et al. 2014, Nacambo et al. 2014). Après le passage de l’hiver dans leur cocon, les chenilles recommencent à s’alimenter entre les mois de mars et avril en fonction de la remontée des températures (Nacambo et al. 2014). Des expériences laissent supposer que les chenilles ont besoin d’être exposées un mois et demi à des températures hivernales pour pouvoir finir leur cycle au printemps et reprendre leur activité dès la fin mars (Nacambo et al. 2014). Cependant, on connaît encore mal les stades larvaires sensibles à la photopériode pour l’induction de la diapause ou les facteurs impliqués dans la levée de diapause en Europe. Il semble en revanche que la diapause puisse avoir un effet positif sur la fécondité et l’activité larvaire. En effet, les femelles de la génération diapausante seraient plus fécondes que celles des autres générations dans la zone d’origine (Wan et al. 2014), et des études sur le développement larvaire montrent que les larves diapausantes auraient un taux de croissance plus élevé que celles des autres générations (Leuthardt & Baur 2013).

2.2 De l’Asie à la colonisation de l’ensemble de l’Europe

2.2.1 L’aire native asiatique

La pyrale du buis est une espèce asiatique qui est présente naturellement en Chine, en Corée du Nord et du Sud, et au Japon (Maruyama & Shinkaji 1987, Park 2008, Xiao et al. 2011, Nacambo et al. 2014). Elle serait aussi naturellement présente en Russie dans la province de Primorié (aussi appelée kraï du Primor’ye), située juste à la frontière avec la Chine et la Corée du Nord (Proklov & Karayeva 2013) (Figure 7). Une quinzaine d’espèces de buis ont été répertoriées dans les forêts chinoises (Fang et al. 2011) et pourraient être attaquées par *C. perspectalis*. Bien qu’il existe de nombreuses données sur la répartition des hôtes potentiels de l’insecte (Kohler & Brückner 1989, Fang et al. 2011), la distribution de ce ravageur en Asie, notamment en milieu naturel, est peu, voire quasiment pas connue, et quelques données seulement sont disponibles sur ses prédateurs et parasitoïdes (Chen et al. 2005, Wan et al. 2014).

Deux espèces de buis, *B. sinica* très présent en Chine, et *B. microphylla* plus souvent retrouvé en Corée et au Japon, sont utilisées comme plantes ornementales dans les parcs et les jardins en Asie (She & Feng 2006, Kawazu et al. 2007, Kim & Park 2013). L’utilisation de ces deux

espèces en tant que plantes d'ornement a donné lieu à différentes études qui ont permis de montrer l'importance des ravages occasionnés par *C. perspectalis*. De ce fait, les données d'observations de la pyrale du buis concernent uniquement les milieux urbains où l'insecte a été détecté par les dégâts causés sur ces deux espèces (Maruyama & Shinkaji 1987, Peng et al. 1994, Kawazu et al. 2007, Chu 2012, Wan et al. 2014).

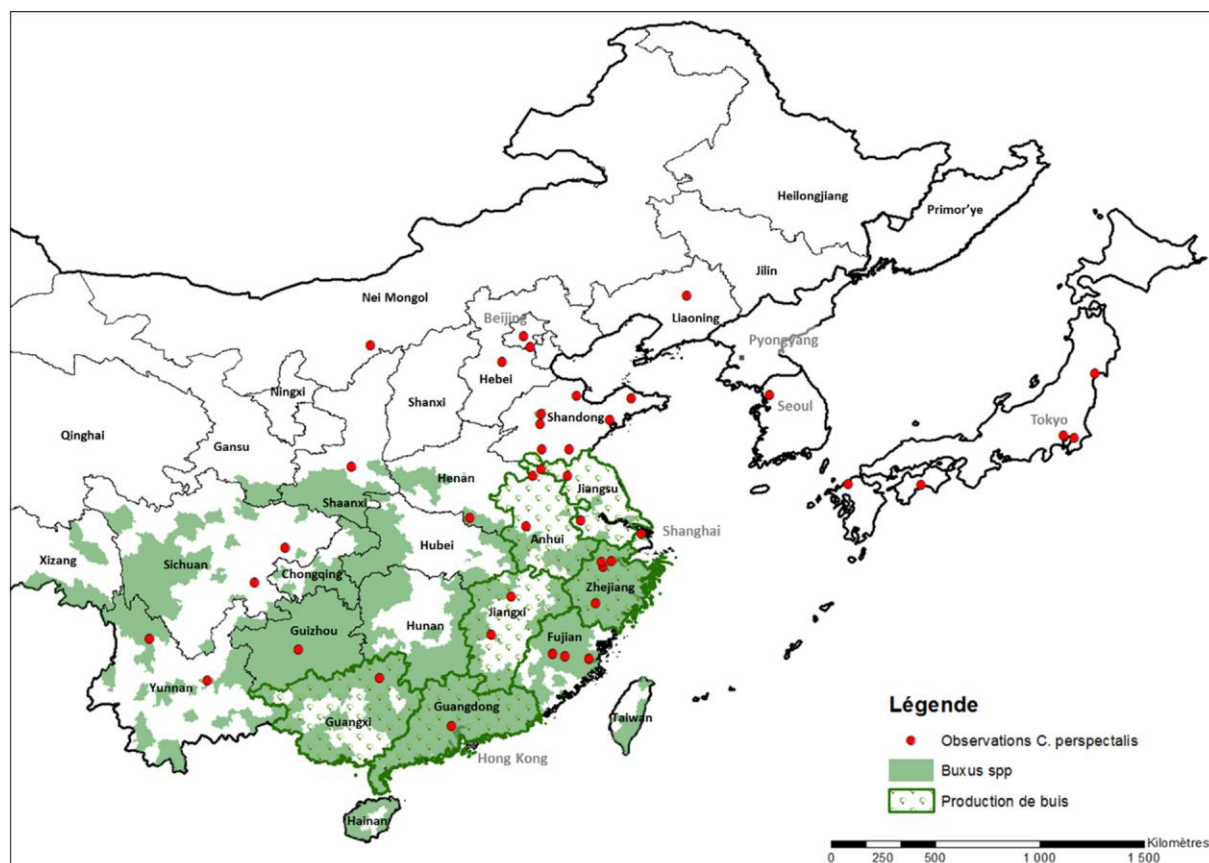


Figure 7. Carte de répartition de *C. perspectalis* en Asie. La distribution des buis en Chine a été obtenue à partir des données de Fang et al. (2011). Les provinces de production de buis en Chine ont été obtenues à partir de données non publiées fournies par R. Eschen. Les cercles représentent les données d'observations de *C. perspectalis* en Asie obtenues à partir des données de la littérature et de données d'observations non publiées par H. Li, M. Kenis, A. Roques et A. Bras.

2.2.2 Une invasion fulgurante en Europe et en France : historique

La pyrale du buis a été signalée pour la première fois en Allemagne en avril 2007 dans l'agglomération de Weil am Rhein, se situant à la frontière entre la Suisse et la France (Krüger 2008), puis elle a été observée à environ 120 km au Nord dans la ville allemande de Kehl. Toutefois, quelques pépiniéristes de la région ont rapporté avoir eu des problèmes avec des chenilles sur des buis dès 2006 (Van der Straten & Muus 2010, Brua 2014). La même année, l'insecte a été observé en Suisse dans la région de Bâle durant l'été (Leuthardt et al. 2010) et aux Pays-Bas dans les régions

de Giessen et Boskoop, zones importantes de pépinières (Van der Straten & Muus 2010). L'importation de buis infestés depuis l'Asie, et plus précisément de la Chine, est l'hypothèse majeure de l'introduction de la pyrale du buis en Europe (Leuthardt et al. 2010, Casteels et al. 2011, Kenis et al. 2013, Nacambo et al. 2014).

Dès les premières observations en 2007, l'insecte a été inscrit sur les listes d'alertes de l'EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) mais en 2011, il en a été retiré car il était déjà présent dans 14 pays européens. Sa propagation rapide a continué en Europe et son aire d'invasion s'étend aujourd'hui de l'Europe à l'Asie Mineure (Figure 8). On recense à l'heure actuelle 31 pays où l'insecte est établi, avec dans l'ordre de première observation : (2007) Allemagne, Pays-Bas, Suisse, (2008) France (Feldtrauer et al. 2009), Royaume Uni (Salisbury et al. 2012), (2009) Autriche, (2010) Liechtenstein, Italie (Bella 2013), Belgique (Casteels et al. 2011), (2011) Roumanie (Székely et al. 2011), Turquie (Hizal et al. 2012), Hongrie (Sáfián & Horváth 2011), République Tchèque (Bella 2013), Slovénie (Seljak 2012), (2012) Croatie (Koren & Crne 2012), Pologne (Blaike et al. 2016), Slovaquie (EPPO, 2015), Russie (Gninenko et al. 2014), (2013) Grèce (Strachinis et al. 2015), (2014) Espagne (Pérez-Otero et al. 2015), Bulgarie (Beshkov et al. 2015), Serbie (Vajgand 2016), Monténégro (Hrnčić et al. 2017), Bosnie-Herzégovine (Ostojić et al. 2015), Macédoine (I. Papazova-Anakieva comm. pers.), (2015) Luxembourg (Hellers & Christian 2016), Géorgie (Matsiakh et al. 2018), Ukraine (Nagy et al. 2017), (2016) Portugal (M. C. de Lemos Viana Boavida comm. pers.), Arménie, Iran (S. Sathyapala comm. pers.), et deux pays où il a été observé mais n'a pas réussi à s'établir, sûrement en raison des conditions climatiques trop froides : le Danemark (2010 ; O. Karsholt comm. pers.), et la Suède (2016 ; Å. Lindelöw comm. pers.).

Au sein même de l'Europe, il existe d'importants échanges commerciaux de plantes d'ornement impliquant en particulier le buis, *Buxus sempervirens*, espèce très prisée des jardiniers professionnels et amateurs (Brua 2014, Jones 2014), ce qui pourrait expliquer en partie l'expansion rapide de l'insecte sur le continent (Van der Straten and Muus 2010, Kenis et al. 2013, Matošević 2013). De plus, les premières observations de *C. perspectalis* au début de son invasion ont souvent eu lieu dans des pépinières ou dans des régions riches en pépinières, que ce soit aux Pays-Bas, en Belgique ou en Angleterre (Van der Straten & Muus 2010, Casteels et al. 2011, Salisbury et al. 2012). Ce fut également le cas en Russie où l'insecte a été observé pour la première fois dans une pépinière dans la région de Sotchi. Les buis infestés auraient été importés depuis les pays européens lors de la mise en place du complexe olympique pour les jeux d'hiver de Sotchi de 2014 (Gninenko et al. 2014), comme ce fut aussi le cas du charançon rouge du palmier *Rhynchophorus ferrugineus* en Grèce suite à la plantation de palmiers infestés pour les jeux olympiques d'Athènes en 2004 (Roques 2010a).

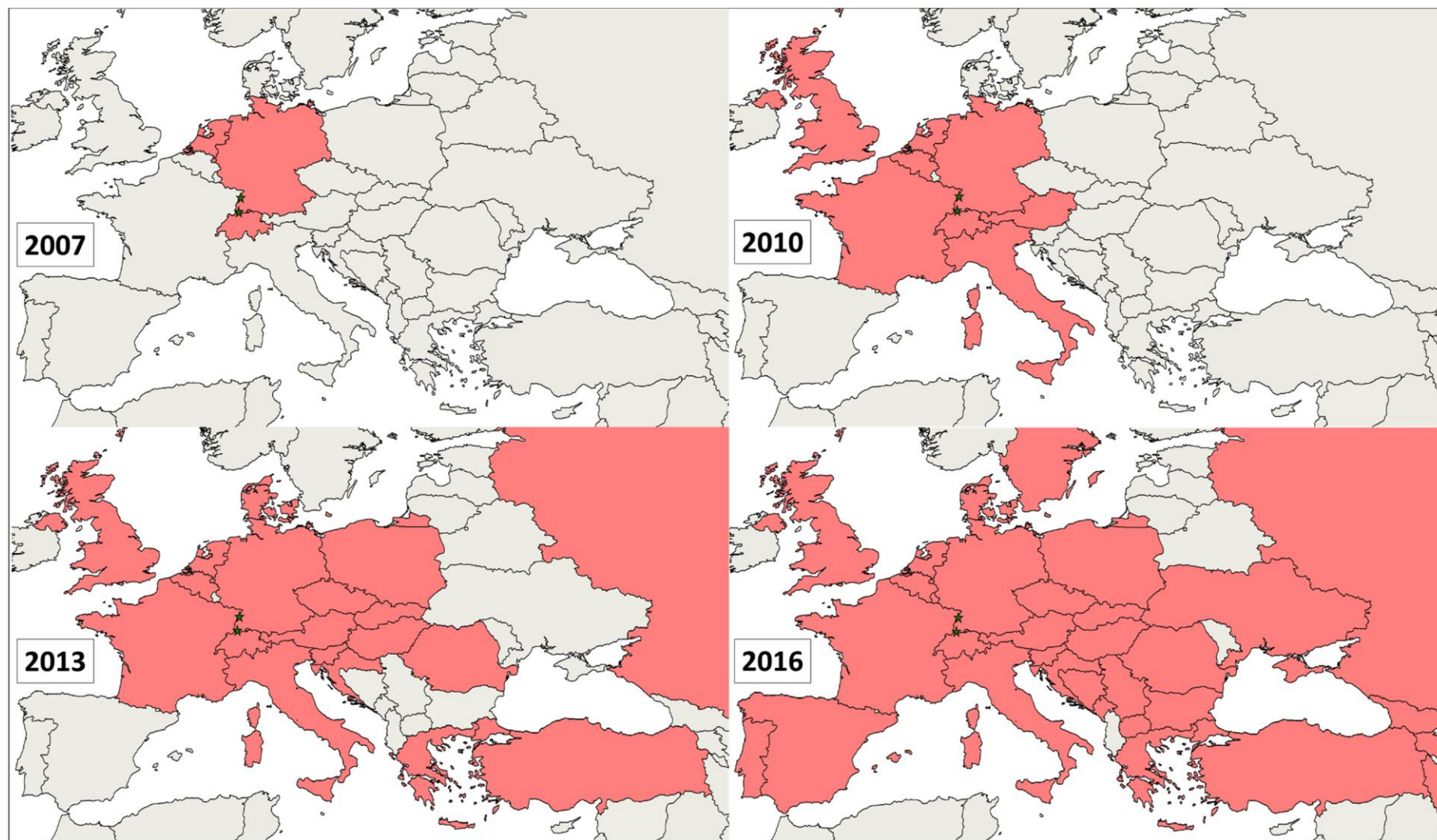


Figure 8. Propagation de *C. perspectalis* en Europe et en Asie Mineure depuis sa première observation en 2007 jusqu'à aujourd'hui. Les deux étoiles vertes représentent les sites de premières observations de la pyrale du buis en Europe. Données compilées de la littérature.

A l'échelle de la France, ce phénomène d'invasion fulgurante a aussi été observé. Les premiers foyers français datent de 2008 et se situaient au niveau des villes frontalières des premiers foyers allemands (Feldtrauer et al. 2009). En 2009, un nouveau foyer a été observé en région parisienne et deux ans après, *C. perspectalis* était trouvé dans trois nouveaux départements géographiquement très distants : la Charente-Maritime, l'Allier et les Alpes Maritimes (Brua 2014) (Figure 9). La propagation de la pyrale du buis en France a ensuite été rapide puisque dix ans après sa première observation, on compte plus de 80 départements français ayant eu des attaques de pyrale du buis (Brua 2014, Données SaveBuxus³).

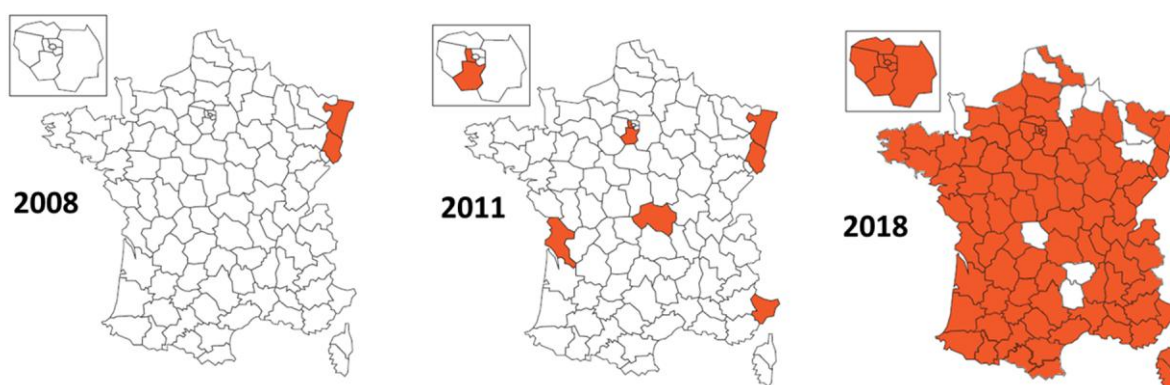


Figure 9. Propagation de *C. perspectalis* en France depuis sa première observation en 2008 jusqu'à aujourd'hui, adapté d'après Brua (2014) et les données SaveBuxus.

2.2.3 Changement de compartiment : de la forêt à la ville et de la ville à la forêt

Dans la zone native : de la forêt à la ville

Les espèces chinoises de buis, dont *B. sinica*, sont des arbustes présents naturellement sous les climats subtropicaux et dans les régions montagneuses de Chine (Huang et al. 2008, Fang et al. 2011). Néanmoins, en Asie et notamment en Chine, le buis est depuis longtemps cultivé comme bonsaï (Huang et al. 2008) et planté dans les vieux jardins. Depuis quelques années, cet arbuste, principalement l'espèce *B. sinica*, a commencé à être aussi utilisé comme plante ornementale dans les villes chinoises (Nacambo et al. 2014). Cependant, l'attrait du buis en tant que plante d'ornement semble assez dépendant du climat. Dans le Sud de la Chine où le climat est subtropical, le buis est présent dans les grands jardins botaniques comme celui de Guangzhou (province du Guangdong, Figure 7), dans les églises catholiques, ou encore dans les territoires ayant été occupés par les européens comme ce fut le cas de Hong Kong, mais peu de spécimens sont retrouvés dans les parcs et les jardins publics. A l'inverse, dans les villes du Nord de la Chine

³ SaveBuxus : Projet National visant à mettre au point et évaluer des solutions de biocontrôle contre la pyrale du buis et les maladies du dépérissement du buis.

et dans les zones montagneuses, le buis est plus facilement planté comme ornement car son feuillage sempervirent lui confère un attrait dans les climats plus tempérés du Nord (Niinemets & Peñuelas 2008). On le retrouve ainsi comme plante d'ornement de Beijing (A. Bras, pers. obs.), au Zhejiang (Wang 2008). Il est vraisemblable que des sujets de *B. sinica* pris en milieu forestier aient été à l'origine des introductions et plantations en ville (Huang et al. 2008). Il est ainsi possible que la pyrale du buis ait par la même occasion été emmenée avec sa plante hôte ou que l'insecte se soit dispersé depuis le milieu forestier vers des milieux urbains proches comme cela a pu être observé pour la processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa*, en Europe, dont une de ses plantes hôtes est largement plantée comme arbre d'ornement dans les villes (Robinet et al. 2012, Rossi et al. 2015).

À l'heure actuelle, la quasi-totalité des observations de *C. perspectalis* obtenues dans la littérature asiatique concerne le milieu urbain (Figure 7) (Maruyama & Shinkaji 1993, Li 1994, Zhou et al. 2005, Kawazu et al. 2007, Wang 2008, Kim & Park 2013). Par ailleurs, l'attrait du buis comme plante d'ornement au niveau mondial se traduit par de nombreux échanges à l'échelle internationale et nécessite de pouvoir subvenir à la demande. Dans ce contexte, un certain nombre de buis (espèces non connues, R. Eschen comm. pers.) sont produits dans 6 régions chinoises : le Guangxi, le Guangdong, le Jiangxi, le Zhejiang, l'Anhui et le Jiangsu. Par conséquent, cela a également pu faciliter le changement de compartiment de la pyrale du buis et son introduction en Europe. Dans le cadre d'un projet de plantation d'arbres sentinelles en Chine (Kenis et al. 2018), il a pu être ainsi montré que les plants de *B. microphylla* utilisés ont été quasi-immédiatement attaqués par *C. perspectalis*, et en large partie détruits, aussi bien dans une zone de pépinières de la région de Beijing que dans une zone semi-forestière près de Fuyang (Zhejiang), soulignant le caractère envahissant de l'espèce.

En Chine, il est à noter que les autorités traitent régulièrement les végétaux présents en ville pour limiter les dégâts de ravageurs (Zhou et al. 2005, She & Feng 2006, Shi & Hu 2007, Wang 2008) ce qui peut influencer les populations présentes dans ces milieux en sélectionnant des individus résistant aux herbicides mais aussi en rendant l'espèce plus résiliente.

Dans la zone d'introduction : de la ville à la forêt

Dans son aire d'introduction, la pyrale du buis a été observée en premier lieu en milieu urbain sur des buis ornementaux (Krüger 2008). L'attrait du buis comme plante d'ornement en Europe se traduit par une présence accrue de cet arbuste dans les villes, au sein des parcs et des jardins publics et privés, des cimetières ou encore des jardins historiques. Depuis sa première observation en Europe, *C. perspectalis* a fait d'importants dégâts en milieu urbain provoquant la mort de nombreux buis (Figure 10) (Van der Straten & Muus 2010, Leuthardt & Baur 2013, Brua 2014, Martin et al. 2015, Guérin et al. 2016), mais a par la suite colonisé le milieu forestier de manière sporadique. Il a été observé en sous-bois pour la première fois dans la région du Jura Suisse entre 2009 et 2010, peu de temps après son introduction (Kenis et al. 2013). Dans la même

période, de fortes attaques ont été notées à la fois dans la réserve naturelle allemande de Grenzach-Whylen (Länder du Bade-Wurtemberg) menant à une mortalité des buis défoliés de l'ordre de 90% et dans la forêt de Buxberg en France, située près du foyer de Saint Louis en Alsace (Feldtrauer et al. 2009, Brua 2014, Tabone et al. 2015). Au cours de son invasion fulgurante en Europe et en Asie Mineure, la pyrale du buis a de nouveau été observée à plusieurs reprises dans les forêts naturelles de buis (Figure 10). Dans la région du Caucase en particulier, les forêts de buis endémiques de *B. colchica* ont subi de fortes défoliations à partir de 2015 (Gninenko et al. 2014), inquiétant les autorités locales quant à la survie de leur patrimoine culturel (Mitchell et al. 2018). Dans le Sud de la France, *C. perspectalis* a aussi commencé à coloniser le milieu forestier à partir de 2016, causant de fortes défoliations dans la vallée de la Drôme, sur le Larzac, en Ardèche et dans certaines buxaies des Pyrénées (comm. ONF).



Figure 10. Photos de dégâts de pyrale du buis en Région Centre-Val de Loire en a. milieu urbain et b. milieu forestier.

2.3 Dégâts et moyens de lutte

2.3.1 Une menace pour les jardins à la française et les buxaies naturelles

Le buis, et notamment le buis commun *B. sempervirens*, représente un symbole patrimonial des jardins historiques en Europe, traversant les grandes époques de l'Histoire, de l'Antiquité à la Renaissance en passant par le Moyen-Âge. Son utilisation commence à l'Antiquité avec les Romains (Salvesen et al. 2009), par la suite il devient un symbole de la religion catholique. C'est au cours de la Renaissance, notamment avec le jardinier Le Nôtre, que le buis devient un emblème des jardins à la française grâce à son feuillage sempervirent qui se taille facilement (Jones 2014). Cet arbuste fait aujourd'hui partie intégrante de l'art des jardins et du patrimoine culturel associé en France et en Europe. Cependant, depuis une vingtaine d'années, les jardiniers doivent faire face à plusieurs ravageurs émergents du buis : les champignons responsables de la

cylindrocladiose *Calonectria pseudonaviculata* et *C. henricotiae* (syn. *Cylindrocladium buxicola*, *C. pseudonaviculatum*) et la pyrale du buis.

La cylindrocladiose a été découverte dans les années 1990 en Europe. Les deux champignons de la cylindrocladiose provoquent un dépérissement chez des buis sains (LeBlanc et al. 2018). Les premiers symptômes sont des nécroses noires bordées de rouge visibles sur les feuilles. La feuille peut ensuite devenir totalement marron et lorsque le buis est totalement atteint, son feuillage finit par tomber.

La pyrale du buis étant un défoliateur, les symptômes se différencient du champignon par des traces de morsures sur les feuilles pour les premiers stades larvaires jusqu'à la défoliation totale de l'arbre ainsi que par la présence de crottes au pied de l'arbre. L'insecte peut s'attaquer au feuillage et à l'écorce (Kenis et al. 2013, Brua 2014), ce qui peut mener à la mort de l'arbre. Depuis son introduction en Europe, comme mentionné précédemment, *C. perspectalis* fait d'importants dégâts dans les parcs, les jardins publics et privés, les jardins à la française des châteaux, dans les cimetières et dans les pépinières mais aussi en milieu naturel (Kenis et al. 2013, Brua 2014, Göttig 2017, Mitchell et al. 2018). Compte tenu de la vitesse à laquelle la pyrale du buis est capable de réaliser son cycle biologique, la rapidité de sa propagation et sa forte fécondité, ce ravageur représente une vraie menace pour les buis ornementaux et pour le patrimoine culturel associé (Figure 10a) (Van der Straten & Muus 2010, Kenis et al. 2013, Matošević 2013, Brua 2014, Martin et al. 2015, Guérin et al. 2016). L'arrivée de *C. perspectalis* dans les milieux forestiers pose également un problème d'ordre écologique (Figure 10b) (Mitchell et al. 2018). En effet, la destruction des forêts et des sous-bois de buis en l'espace de quelques années, représente une perte écologique importante avec un changement possible du milieu pouvant se traduire par des glissements de terrain, une perte d'humidité du couvert végétal ou encore un risque accru de départs de feu, dû notamment aux résidus de feuilles sèches restées sur les arbres (Comm. ONF et comm. DSF). De plus, la perte des espèces de buis européennes pourrait entraîner la disparition d'espèces présentes uniquement sur les buis. En effet, les alcaloïdes présents dans les buis étant des molécules très souvent toxiques, les espèces d'invertébrés inféodées au buis (18 espèces en Europe ; Mitchell et al. 2018) ont développé des stratégies d'évitement ou de séquestration qui ne leur permettront probablement pas de changer d'hôte en cas de disparition de celui-ci.

2.3.2 Développement de la lutte face à un nouveau ravageur

Dans la zone d'origine, la lutte contre la pyrale du buis en milieu urbain se fait principalement à l'aide de produits chimiques comme les pyréthroïdes (Zhou et al. 2005, Kawazu et al. 2007, Wang 2008, Wan et al. 2014). En Europe, et notamment en France, la législation en vigueur ne permet pas l'utilisation de ce type de produit chimique pour lutter contre ce ravageur (Plan Ecophyto I et II). Néanmoins, au vu de la rapidité de son invasion et des importants dégâts causés par *C. perspectalis* sur les buis ornementaux et naturels, de nombreuses recherches se mettent en place pour trouver des solutions rapides et durables contre ce ravageur.

La lutte d'aujourd'hui

Les fortes défoliations causées par la pyrale du buis en Europe peu de temps après ses premières observations ont nécessité d'agir et de fournir rapidement des moyens de contrôle efficaces. Dans ce contexte, des méthodes ayant déjà montré leur efficacité contre d'autres espèces de Lépidoptères ont été adaptées pour essayer de lutter contre ce nouveau ravageur. Ces méthodes sont néanmoins peu spécifiques, touchent un grand nombre d'espèces, et visent surtout à limiter les dégâts en attendant que de nouvelles méthodes de lutte plus durables soient développées.

A l'heure actuelle, on recense des études sur l'utilisation d'agents entomopathogènes contre la pyrale du buis (Cartier & Cornillon 2016, Guérin et al. 2016, Göttig & Herz 2018). Certains produits commercialisés contenant des Nématodes semblent efficaces mais à des degrés variables et pour des stades larvaires ciblés (Göttig & Herz 2018). Les expérimentations réalisées avec la bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ont montré de bons résultats et ce produit est aujourd'hui le moyen de lutte le plus utilisé (Cartier & Cornillon 2016, Guérin et al. 2016). La phéromone de *C. perspectalis* ayant été isolée en Asie (Kawazu et al. 2007, Kim & Park 2013) et ayant montrée son efficacité pour attirer les papillons mâles en Europe (Martin et al. 2015, Santi et al. 2015, Göttig & Herz 2017, Nagy et al. 2017), des expérimentations de confusion sexuelle ont été testées (J.-C. Martin comm. pers.). Cependant, le taux de population de l'insecte étant trop important, la technique s'est révélée infructueuse. Ces différentes méthodes nécessitent en amont un suivi régulier des populations via le piégeage phéromonal pour prévenir l'apparition de dégâts (Martin et al. 2015). De plus, le cycle biologique de la pyrale du buis implique des traitements réguliers à chaque génération. A la fin de l'été, lorsque les conditions climatiques ont été favorables, la longévité des adultes entraîne un risque de juxtaposition de la présence de chenilles des générations 2 et 3. Cela implique de traiter plus régulièrement aux mois d'août et septembre pour essayer de limiter les dégâts. Dans ce contexte, un moyen de lutte alternatif qui consiste à injecter un insecticide dans le tronc de l'arbre a été expérimenté dans le cadre du projet d'intérêt régional INCA, et en parallèle de cette thèse (**Annexe 3**), pour protéger certains buis patrimoniaux pendant 2 à 3 ans. L'efficacité du produit nommé Revive, contenant de l'emamectine benzoate et commercialisé par l'entreprise Syngenta®, a été testée sur trois années et s'est montrée concluante contre ce ravageur durant la période de suivi (Bras et al. 2017).

Néanmoins, l'ensemble de ces méthodes reste assez peu spécifique contre cette espèce, leur application doit être généralement répétée dans le temps et dans l'espace et est limitée au milieu urbain. De plus, l'utilisation de toutes ces techniques en milieu naturel pourrait poser un certain nombre de problèmes écologiques, notamment sur la faune.

La lutte de demain

Compte tenu des dégâts importants causés par la pyrale du buis sur les buis ornementaux et les buxaias naturelles (Kenis et al. 2013, Mitchell et al. 2018), des recherches se mettent en place pour trouver des solutions durables et pouvant être utilisées en milieu naturel (SaveBuxus,

BioPyr⁴, Leuthardt 2013, Göttig 2017). Certains ennemis naturels de la pyrale du buis ont été identifiés en Asie (Chen et al. 2005, Wan et al. 2014) mais la relation avec leur hôte est encore mal connue. De plus, la ou les population(s) ayant servi de source pour les populations européennes n'a (ont) pas encore été précisément identifiée(s), ce qui limite le recours à l'identification et l'introduction vers l'Europe d'ennemis naturels natifs de ces zones-sources asiatiques.

Dans ce contexte, des expérimentations en laboratoire ont été réalisées pour tester la capacité à parasiter *C. perspectalis*, de certains parasitoïdes présents dans la zone envahie. Les parasitoïdes ciblés sont des Trichogrammes, chalcidiens des œufs communément utilisés en agriculture biologique (Göttig & Herz 2016, Wu et al. 2018). A l'heure actuelle, une seule souche de l'espèce *Trichogramma dendrolimi* a montré une efficacité avérée d'environ 40% de parasitisme en laboratoire (Göttig et al, 2016). Cependant, des expérimentations complémentaires en mésocosme puis en milieu naturel seront nécessaires avant de pouvoir envisager une lutte biologique efficace. De plus, d'autres études sur l'utilisation de souches de trichogrammes laissent penser que les taux de parasitisme pourraient être négativement affectés à cause de la présence d'alcaloïdes dans les œufs de pyrale du buis (É. Tabone comm. pers.). En effet, il a été montré que les chenilles de *C. perspectalis* étaient capables de séquestrer les alcaloïdes présents dans le feuillage du buis (Leuthardt et al. 2013). Cependant, aucune information n'est connue concernant les stades œufs et adultes. C'est pourquoi, les études s'orientent actuellement vers la recherche de prédateurs autochtones et de parasitoïdes européens non spécialistes qui auraient déjà naturellement commencé à s'adapter à la pyrale du buis (BioPyr). A l'heure actuelle, les prédateurs observés sur *C. perspectalis* en Europe sont une mouche Tachinidae, *Pseudoperichaeta nigrolineata* (Nacambo 2012), des araignées, la guêpe européenne (A. Bras, pers. obs.), le frelon asiatique et les oiseaux (Leuthardt et al. 2013, Brua 2014), mais les taux de parasitisme ou de prédation sont peu élevés. De plus, les effets sur ces prédateurs des alcaloïdes séquestrés par la pyrale du buis ne sont pas connus. En laboratoire, des tests ont été réalisés avec deux insectes prédateurs des œufs, la chrysope verte *Chrysoperla carnea* et la punaise prédatrice *Orius majusculus*. Les résultats ont montré que *C. carnea* avait le meilleur taux de prédation avec plus de 80% des œufs de *C. perspectalis* attaqués alors que pour *O. majusculus*, le taux de prédation n'était que de 40% (Göttig 2017).

⁴ BioPyr : Projet de suivi des populations de pyrale du buis en région Auvergne Rhône-Alpes ainsi que de recherche et d'inventaire d'agents potentiels de régulation biologique de ce ravageur en milieu naturel.

2.4 Objectifs de la thèse

Depuis une vingtaine d'années, un certain nombre d'insectes introduits se propagent beaucoup plus vite que précédemment en Europe (Roques et al. 2016). Ce phénomène est encore mal connu, ce qui rend ce type d'invasion difficile à prédire (Seebens et al. 2018). Ces insectes 'super-colonisateurs' causent des pertes économiques voire écologiques importantes et rendent la lutte encore plus difficile à mettre en place. La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis*, fait partie de ces nouveaux insectes envahissants (Roques et al. 2016). En l'espace de dix ans, l'insecte a colonisé la quasi-totalité de l'Europe et continue de se propager en Asie Mineure, en menaçant à la fois les buis ornementaux et le patrimoine culturel associé, et les buxaias naturelles et leur écosystème (Kenis et al. 2013, Brua 2014, Mitchell et al. 2018). Les dégâts causés par cette espèce se sont traduits par plusieurs travaux sur les moyens de lutte utilisables (cf 2.3.2). Cependant, les facteurs impliqués dans le succès et la fulgurance de son invasion ont encore été peu étudiés. L'objectif général de cette thèse était d'étudier et comprendre le succès de l'invasion de cet insecte ainsi que les facteurs qui ont pu favoriser son invasion fulgurante, notamment le rôle de l'Homme à travers le commerce d'ornement.

En Europe, l'importation de plantes d'ornement comme le buis a augmenté ces dernières années entre la Chine et certains pays comme les Pays-Bas ou l'Italie (van Valkenburg et al. 2014). Etant donné l'aire de répartition de la pyrale du buis et les circuits commerciaux connus (EPPO 2012), **j'ai donc fait l'hypothèse que *C. perspectalis* a été introduit en Europe via des plants infestés de buis importés depuis la Chine.** De plus, au regard des importations de buis entre 2005 et 2010 entre la Chine et différents pays européens, des premières observations disjointes de l'insecte en 2007 et les années suivantes, et de l'existence d'un important commerce à l'échelle européenne, **j'ai aussi fait l'hypothèse que les introductions depuis la Chine vers l'Europe ont eu lieu à plusieurs reprises, mais qu'elles se sont également produites entre pays européens.** Si le commerce d'ornement a pu faciliter la dispersion et le succès de l'invasion de *C. perspectalis* en Europe, **j'ai également supposé que certains traits biologiques avaient également pu jouer un rôle déterminant dans son expansion,** notamment le passage de l'hiver et la recherche de nouveaux habitats grâce à une dispersion active des adultes.

Pour tester ces hypothèses et essayer de distinguer le rôle de l'Homme et celui de l'insecte dans le succès et la fulgurance de l'invasion, deux approches ont été utilisées :

- Dans un premier temps, j'ai essayé de comprendre les routes d'invasion empruntées par la pyrale du buis selon une approche génétique à l'aide de deux marqueurs complémentaires. Cette approche a été utilisée pour cibler (i) la ou les zones sources, estimer (ii) les routes d'introduction et (iii) les routes de dispersion de *C. perspectalis* en Europe en essayant de les mettre en relation avec les données du commerce d'ornement connues à l'échelle de l'Europe.

- Dans un second temps, j'ai essayé de comprendre le rôle de deux traits biologiques ayant pu faciliter l'établissement et la dispersion de l'insecte dans la zone envahie : le vol et la diapause hivernale réalisée par la première génération (Figure 5). Pour cela, j'ai utilisé une approche écologique pour (i) estimer les capacités de vol et mieux comprendre leur impact dans la dispersion de l'insecte et (ii) comprendre les facteurs encore mal connus permettant la sortie de diapause.

Ce manuscrit s'articule ainsi en trois grandes sections :

Une première section détaille l'approche génétique utilisée et ses résultats pour comprendre les routes d'invasion. Cette section est divisée en deux chapitres. Un premier chapitre (**Chapitre 3**) est centré sur la détection des zones sources des populations envahissantes et sur la description de la diversité génétique des populations natives et envahissantes à l'aide d'une approche phylogéographique sur la base de séquences d'ADN. Le chapitre suivant (**Chapitre 4**) porte sur la compréhension des routes d'invasion et de dispersion à l'aide des résultats du **Chapitre 3**, de marqueurs microsatellites et de l'outil ABC (*Approximate Bayesian Computation*).

Une deuxième section regroupe les études sur des traits biologiques mal connus et ayant pu favoriser l'invasion fulgurante de la pyrale du buis. Cette section est aussi divisée en deux chapitres. Le premier (**Chapitre 5**) est consacré aux capacités de vol de *C. perspectalis* et leur rôle possible dans sa propagation fulgurante. Le deuxième (**Chapitre 6**) porte sur les facteurs pouvant être impliqués dans la levée du processus de diapause et les conséquences pour le succès de l'invasion. Cette dernière partie ayant fait l'objet d'un stage de master 2 que j'ai co-encadré dans le cadre de cette thèse, les résultats généraux de ce stage sont présentés sous forme d'une synthèse bibliographique.

Enfin, le **Chapitre 7** présente une discussion générale et les perspectives associées à mon travail de thèse.

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse ont été menés au sein de l'Unité de Recherche de Zoologie Forestière (URZF) à l'INRA d'Orléans dans le cadre du projet d'intérêt régional INCA (INvasion fulgurante de la Pyrale du buis *Cydalis perspectalis* en Région Centre-Val de Loire), APR IR financé par la région Centre-Val de Loire.

TRAÇAGE DES ROUTES
D'INVASION DE
LA PYRALE DU BUIS

Le transport et l'introduction d'une espèce par le biais des activités humaines est un phénomène récurrent (Sakai et al. 2001, Hulme 2009, Blackburn et al. 2011, Essl et al. 2018). Comprendre comment ces espèces sont arrivées et d'où elles viennent permet ainsi de pouvoir comparer et appréhender à une échelle de temps actuelle l'évolution de différents traits biologiques, du génome et de leur plasticité. Cependant, ces espèces posent bien souvent des problèmes d'ordres économiques, écologiques ou sanitaire (Allendorf & Lundquist 2003, Vaes-Petignat & Nentwig 2014, Nentwig et al. 2017). Pour adapter au mieux les stratégies de contrôle, il est donc nécessaire de déterminer leur(s) source(s) et par quel(s) biais elles ont été transportées et introduites afin de prévenir l'introduction de nouveaux individus ou d'espèces empruntant des circuits identiques (Smith et al. 2007, Essl et al. 2015, Pergl et al. 2017).

Les données historiques, comme les dates de première observation, la distribution ou encore les interceptions d'un insecte sont des éléments utiles pour comprendre ces routes d'invasion (Estoup & Guillemaud 2010, Essl et al. 2015). Néanmoins, ces données sont souvent incomplètes, manquantes voire erronées, en particulier quand les organismes ont été introduits de manière non intentionnelle (Estoup & Guillemaud 2010). Dans ce contexte, cibler la ou les zones qui ont pu servir de source(s) aux populations envahissantes est souvent complexe. L'utilisation de l'outil génétique permet de pallier à ce manque d'informations (Estoup & Guillemaud 2010, Cristescu 2015) voire à les vérifier (Auger-Rozenberg et al. 2012). L'évolution rapide des nouvelles technologies a permis d'avoir de nombreux marqueurs à disposition (Putman & Carbone 2014) et de diminuer les coûts de séquençage et de génotypage permettant une utilisation démocratisée de ce type de méthode dans le traçage des routes d'invasion. De l'ADN mitochondrial aux SNP et RADseq, le choix des marqueurs à utiliser est large et permet d'opter pour ceux qui sont les plus adaptés au modèle biologique et à la question scientifique posée (Roderick 1996, Zhang & Hewitt 2003, Putman & Carbone 2014). De plus, les logiciels d'analyses de plus en plus puissants permettent d'utiliser de grands jeux de données pour répondre à des hypothèses complexes (Excoffier & Heckel 2006, Beaumont 2010, Estoup et al. 2012).

Les phénomènes d'invasion fulgurante, comme dans le cas de *C. perspectalis*, sont récents (Roques et al. 2016) et par conséquent, les processus d'invasion impliqués sont encore mal connus. A l'heure actuelle, les études des routes d'invasion pour quelques insectes présentant une vitesse d'expansion semblable ont dévoilé des histoires complexes mêlant introductions multiples depuis la zone d'origine, phénomènes tête de pont et présence d'*admixture* parmi les populations envahissantes (Lombaert et al. 2014, Fraimout et al. 2017, Lesieur et al. 2018). La relation entre *C. perspectalis* et les activités humaines suggère que l'Homme a joué un rôle important dans son introduction en Europe mais aussi dans sa dispersion. En effet, comme présenté dans les objectifs de la thèse, l'intérêt du buis en tant que plante ornementale se traduit par d'importants échanges commerciaux (Kenis et al. 2018). L'introduction de la pyrale du buis est supposée due à l'importation de buis infestés depuis la Chine vers l'Europe (Kenis et al. 2013, Nacambo et al. 2014) tandis que les importants échanges commerciaux de buis d'ornement entre régions et pays européens pourraient expliquer en partie l'expansion rapide de l'espèce sur le continent (Van der

Straten & Muus 2010, Kenis et al. 2013, Matošević 2013). De plus, l'observation de plusieurs populations envahissantes au cours d'une même année dans des pays géographiquement éloignés, ainsi que la vitesse de colonisation de *C. perspectalis*, suggèrent que des pieds de buis infestés ont été introduits simultanément et dans différents endroits à de multiples reprises.

Pour tester les hypothèses présentées dans le **Chapitre 2**, j'ai utilisé une approche génétique à l'aide de deux marqueurs complémentaires : l'ADN mitochondrial et les microsatellites. L'ADN mitochondrial est couramment utilisé pour étudier les événements anciens ayant influencé la structure des populations (Avice et al. 1987, Avice 2009). Dans le cas des invasions biologiques, cela permet de cibler les zones sources et le nombre d'évènements d'introduction (Cheng et al. 2016). A l'inverse, les marqueurs nucléaires de type microsatellites permettent de s'intéresser aux événements démographiques récents et de comprendre la dynamique d'invasion (Cheng et al. 2016). Ces deux marqueurs ont été largement utilisés pour retracer les routes d'invasion d'insectes, ensemble (Auger-Rozenberg et al. 2012, Arca et al. 2015, Wang et al. 2015) ou séparément (Ciosi et al. 2008, Lombaert et al. 2010, Gariépy et al. 2014, Javal et al. 2017a).

Au regard de la rapidité de l'invasion de la pyrale du buis, du rôle supposé important de l'Homme dans sa dispersion et de l'absence de données génétiques sur cette espèce, j'ai choisi d'utiliser ces marqueurs de manière séquentielle :

- Dans un premier temps, j'ai donc cherché à confirmer ou infirmer l'origine chinoise des populations envahissantes de *C. perspectalis* et à estimer si l'insecte avait effectivement été introduit à de multiples reprises en Europe. Pour cela, j'ai utilisé une approche phylogéographique à l'aide de l'ADN mitochondrial. Cette étude est présentée dans le **Chapitre 3** et a fait l'objet d'un article scientifique (*Article I*).

- Dans un deuxième temps, je me suis focalisée sur la propagation fulgurante de l'insecte, notamment en Europe et en Asie Mineure. Pour cela, j'ai utilisé une approche de génétique des populations à l'aide de marqueurs microsatellites, qui est présentée dans le **Chapitre 4**. En l'absence de marqueurs microsatellites déjà disponibles pour cette espèce, il a fallu les développer, ce qui a fait l'objet d'une Primer Note (*Article II*). Ils ont ensuite été utilisés dans l'approche populationnelle pour définir les scénarios d'invasion et appréhender les processus de dispersion au sein de l'aire envahie. Cette étude fait également l'objet d'un article scientifique en cours de soumission (*Article III*).

Les articles scientifiques étant écrits en anglais et inclus dans ces chapitres, j'ai choisi de résumer en français le contexte de l'étude, l'échantillonnage réalisé et les résultats majeurs obtenus avant chaque article.

Chapitre 3

De l'aire d'origine vers la zone d'introduction



3.1 Décrire la diversité génétique des espèces envahissantes pour appréhender les routes d'invasion : l'approche phylogéographique

3.1.1 Description génétique de l'espèce dans son milieu d'origine : comprendre l'histoire évolutive

L'approche phylogéographique est communément utilisée pour comprendre les processus évolutifs subis par les espèces dans leur milieu naturel (Avisé et al. 1987, Roderick 1996, Brower & DeSalle 1998). On cherche ainsi à comprendre quel(s) phénomène(s) ancien(s) explique(nt) la répartition génétique observée à l'heure actuelle chez une espèce ou un groupe d'espèces. Cela permet de mieux comprendre leur écologie, leur relation avec le milieu et leur répartition actuelle (Roderick 1996, Avisé 2009, Knowles 2009). Connaître ces éléments est essentiel dans le cas d'espèces natives, mais l'est aussi dans les cas des espèces envahissantes pour tenter de déterminer les raisons pour lesquelles elles sont devenues envahissantes. L'approche phylogéographique permet alors de caractériser la diversité génétique des populations natives et leur structuration génétique dans la zone d'origine, pour les comparer à celles des zones envahies, dans la perspective de cibler les zones pouvant être les sources des populations envahissantes (Sakai et al. 2001, Estoup & Guillemaud 2010, Bock et al. 2015). Si cette approche permet de reconstituer les grandes lignes d'une invasion, elle nécessite néanmoins une bonne caractérisation de la zone d'origine (Estoup & Guillemaud 2010, Kolbe et al. 2013). C'est une étape qui peut s'avérer compliquée quand la répartition de l'espèce dans sa zone native est mal connue, comme pour l'agrite du frêne *Agrilus planipennis* (Orlova-Bienkowskaja & Volkovitsh 2018) ou la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* (Orlova-Bienkowskaja et al. 2015). L'aire d'origine peut aussi être trop étendue pour être décrite exhaustivement (Estoup & Guillemaud 2010), voire même être inconnue comme ce fut le cas pour la mineuse du marronnier *Cameraria ohridella* (Valade et al. 2009). Les données phylogéographiques d'une espèce envahissante dans son aire d'origine peuvent également révéler l'existence d'espèces cryptiques dont seules certaines sont envahissantes (Kirichenko et al. 2017) ou dont certaines peuvent servir de vecteur pour une autre espèce envahissante (Haran 2015).

3.1.2 Caractériser la diversité génétique dans la zone d'introduction : un débroussaillage sur les phénomènes d'introduction et de dispersion

Au sein de l'aire envahie, la description de la génétique des populations introduites permet de les comparer avec celles de la zone d'origine pour définir la ou les zones sources, et mettre en évidence le nombre d'évènements d'introduction ayant eu lieu (Dlugosch & Parker 2008). Les zones sources peuvent être définies de manière plus ou moins précises en fonction de la structuration génétique mise en évidence dans la zone native, ainsi que de l'effort et de la couverture de l'échantillonnage (Estoup & Guillemaud 2010). Estimer le nombre d'évènements

d'introduction permet également de mettre en évidence un goulot d'étranglement potentiel au sein des populations et d'en estimer son intensité (Zayed et al. 2007, Auger-Rozenberg et al. 2012, Arca et al. 2015) ou à l'inverse, d'observer la présence d'une forte diversité génétique due à des introductions multiples (Chapple et al. 2013, Kolbe et al. 2013, Gariépy et al. 2015) et/ou à l'introduction d'un grand nombre d'individus.

Les phénomènes génétiques impliqués dans les invasions biologiques sont souvent complexes (Garnas et al. 2016). Les invasions réussies de certaines espèces en dépit d'un fort goulot d'étranglement présentent un paradoxe important (Allendorf & Lundquist 2003, Estoup et al. 2016). La réduction de la diversité génétique est supposée favoriser la probabilité d'introduire des génotypes non adaptés ou d'allèles délétères (Bock et al. 2015) mais certaines espèces semblent au contraire bénéficier de cette réduction pour purger les allèles défavorables présents dans les populations introduites (Garnas et al. 2016, Estoup et al. 2016). L'introduction d'une forte diversité génétique pourrait, quant à elle, faciliter l'établissement d'une espèce en augmentant la probabilité d'introduire des génotypes plus favorables à l'établissement et à l'expansion (Dlugosch & Parker 2008, Cristescu 2015, Garnas et al. 2016). Dans une grande majorité de cas, les phénomènes d'invasion résultent de différents processus impliquant des introductions multiples (Ciosi et al. 2008, Estoup & Guillemaud 2010, Gariépy et al. 2015, Javal et al. 2017a) mais aussi des phénomènes tête de pont et des événements d'*admixture* (Lombaert et al. 2014, Fraimout et al. 2017, Lesieur et al. 2018, Correa et al. 2018).

3.1.3 L'ADN mitochondrial, un marqueur universel pour caractériser la diversité génétique

L'ADN mitochondrial est le marqueur le plus communément utilisé dans les phylogéographies animales (Avisé 2009). Il contient de nombreux gènes dont ceux codant pour la cytochrome oxydase I et II qui sont très utilisés en phylogéographie chez les insectes (Roderick 1996, Solorzano et al. 2009, Aoki et al. 2010, Korkmaz et al. 2014), et en particulier chez les Lépidoptères (Assefa et al. 2006, Simonato et al. 2007, Hundsdoerfer et al. 2011). C'est un marqueur neutre, non recombinant, ayant un taux de mutation élevé et qui présente un certain polymorphisme à l'échelle intraspécifique permettant d'étudier des phénomènes démographiques anciens (Avisé et al. 1987, Roderick 1996). Son taux de mutation est estimé entre 1,5% et 2,5% million d'années pour les insectes (Borer et al. 2010) et environ 2,3% pour les Lépidoptères (Brower 1994). Ce marqueur présente aussi des limites et des inconvénients. Il est de descendance maternelle et peut parfois présenter de l'hétéroplasmie, c'est-à-dire, deux molécules d'ADN mitochondrial différentes présentes chez un même individu (Avisé et al. 1987, Avisé 2009). De plus, une portion d'un gène mitochondrial peut avoir été incorporée dans l'ADN nucléaire et être séquencée par erreur. On appelle ces copies insérées dans l'ADN nucléaire des pseudogènes. L'ADN nucléaire n'évoluant pas à la même vitesse que l'ADN mitochondrial, les séquences peuvent présenter des mutations différentes brouillant le message évolutif (Zhang &

Hewitt 2003, Haran et al. 2015). La présence de pseudogènes est dépendante des espèces et peut être minimisée en utilisant de grands fragments (Roe & Sperling 2007).

3.2 Reconstitution de l'invasion de la pyrale du buis

Contexte de l'étude

Comme avancé dans le **Chapitre 2** et en introduction de cette section, nous avons cherché à confirmer ou réfuter l'hypothèse selon laquelle l'importation de buis infestés depuis la Chine à de multiples occasions est responsable de l'introduction de *C. perspectalis* en Europe (Leuthardt et al. 2010, Casteels et al. 2011, Kenis et al. 2013, Nacambo et al. 2014) en caractérisant sa diversité génétique dans sa zone d'origine et dans sa zone d'introduction. Cette étude correspond à l'Article I présenté à la suite de ce résumé en français.

Echantillonnage et séquençage

En Asie, l'échantillonnage a été réalisé en partenariat avec des chercheurs du CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International). Les prospections ont eu lieu en Chine, en Corée du Sud et au Japon (Figure 7 - **Chapitre 2**). Malgré plusieurs tentatives et la présence avérée de l'insecte au Japon (Maruyama & Shinkaji 1993, Kawazu et al. 2007), aucun individu de *C. perspectalis* n'a pu être collecté dans ce pays. En Chine, les provinces couvertes par les collègues du CABI allaient du Nord au Sud avec un effort fait dans les forêts naturelles de buis (province du Guizhou et Guangxi). En complément de leurs prospections, une campagne de collecte a été réalisée dans le cadre de cette thèse en mai 2017 en ciblant quatre provinces du Sud de la Chine (Guizhou, Fujian, Guangdong et Hong Kong) compte-tenu à la fois de l'occurrence naturelle du buis (Fang et al. 2011), de leur activité économique et de leur position géographique. Les provinces du Fujian et du Guangdong ainsi que Hong Kong, sont situées sur la côte du Sud-Est de la Chine et développent une forte activité économique, notamment portuaire. Le Guangdong est également une province de production de buis à destination ornementale. La province du Guizhou a aussi été prospectée car elle est située au Sud-Ouest de la Chine, où nous avons encore peu d'échantillons et où les buis sont naturellement présents dans l'ensemble de la province. Pour essayer de couvrir un peu plus le Sud-Ouest et les provinces de production de buis, la province du Guangxi a également été prospectée par les collègues du CABI. Au final, nous avons pu obtenir des échantillons dans 12 provinces chinoises, dont trois productrices de buis, et dans une province de Corée du Sud. Les collectes dans le Guangxi, le Guangdong et à Hong Kong ont été infructueuses malgré des observations de l'insecte dans ces provinces référencées dans la littérature (Wan et al. 2014). De plus, les forêts naturelles de buis du Sud de la Chine n'ont pu être échantillonnées malgré plusieurs tentatives. L'ensemble des échantillons proviennent de milieux urbains à l'exception de la plantation sentinelle de Fuyang, située en milieu semi-naturel (cf 2.2.3).

Dans la zone d'introduction, des collègues de l'URZF et moi-même avons activement collecté en France et dans les zones de primo foyers de 2007 : l'Allemagne et les Pays Bas. De plus, l'effort d'échantillonnage a été plus conséquent dans les pays leaders du commerce ornemental à l'échelle internationale et/ou européenne (Pays-Bas, Allemagne, Italie, France, Belgique). La collecte d'échantillons dans les autres pays européens a été réalisée par le biais du réseau européen de collaborations de l'URZF. Au final, j'ai pu obtenir des échantillons de 23 pays parmi les 31 où la pyrale du buis est présente actuellement, en couvrant l'aire envahie. Que ce soit dans la zone native ou la zone envahie, les larves ont été collectées dans la mesure du possible sur plusieurs pieds de buis afin de minimiser la consanguinité.

Aucune étude génétique n'avait encore été réalisée que ce soit dans la zone d'origine ou dans la zone d'introduction à part une étude préliminaire conduite dans le cadre de mon master 2, qui avait permis de tester la pertinence et la variabilité des portions de l'ADN mitochondrial de la cytochrome oxydase I et II pour étudier la distribution spatiale des variations génétiques intraspécifiques de *C. perspectalis* (Bras 2015). Les amorces ont été choisies sur une espèce proche, la pyrale du mûrier *Diaphania pyloalis*, appartenant à la même famille que la pyrale du buis et dont le mitogénome avait été décrit. L'amplification du fragment choisi fait 1495 pb et présente de la variabilité. De plus, l'utilisation d'un long fragment nous permet d'éviter la présence de pseudogènes dans notre jeu de données.

Résultats majeurs

Au sein de l'aire native, nous avons pu observer 12 haplotypes répartis dans 3 haplogroupes. Les résultats ont permis de révéler l'existence d'une faible structuration génétique de ces populations. La répartition de la diversité génétique et l'existence d'une faible (mais présente) structuration génétique, nous a permis de proposer le regroupement des populations en trois régions géographiques différentes : la Corée du Sud, la Chine de l'Est et la Chine du Sud-Ouest. De plus, l'observation de trois haplogroupes génétiquement éloignés les uns des autres suggère une histoire évolutive complexe de l'insecte avec probablement un isolement ancien ayant eu lieu entre plusieurs zones géographiques. Cependant, on retrouve les haplogroupes en co-occurrence dans les populations de l'Est de la Chine, ce qui montre que des populations génétiquement éloignées sont géographiquement proches. On peut trouver plusieurs explications à cette situation : (i) cela pourrait être dû à un redéploiement post-glaciaire de populations à partir de refuges isolés, aboutissant à une remise en contact récente de manière naturelle de populations génétiquement différentes. Cependant, les échantillons que nous avons collectés proviennent de zones urbaines et correspondent donc à des populations déjà vraisemblablement introduites, ne représentant pas forcément l'histoire évolutive réelle de l'insecte. De plus, les zones de la Chine du Sud-Est et du Centre n'ont pu être échantillonnées et font défaut pour bien reconstruire l'histoire évolutive de l'insecte. (ii) Les populations ont pu être déplacées et remises en contact par le biais des activités humaines au cours du temps, permettant ainsi à des

haplotypes très différents de se retrouver dans des mêmes localités. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que le buis, en particulier l'espèce *B. sinica*, a été introduit comme ornement dans les villes de l'Est (A. Bras, pers. obs.) et du Nord de la Chine (Nacambo et al. 2014). Au Nord du pays, aucune espèce de buis n'est présente naturellement (Fang et al. 2011) et le caractère natif de *C. perspectalis* dans cette région de la Chine pose question.

Dans la zone d'introduction, 5 haplotypes ont été observés au total. La comparaison de ces haplotypes avec les 12 observés en Asie confirme l'hypothèse d'une origine chinoise des populations envahissantes (absence d'haplotype privé coréen). De plus, la structuration observée en Asie a permis de cibler la partie Est de la Chine comme source probable des populations envahissantes. Au sein de la zone d'introduction, les résultats ont mis en évidence une faible réduction de la diversité génétique avec la présence d'un peu moins de la moitié des haplotypes observés en Asie. L'existence d'une forte diversité génétique en Europe, notamment en France, ainsi que la structuration des populations envahissantes, étayent l'hypothèse d'introductions multiples (depuis la Chine et/ou intra-européennes) comme supposée par l'analyse des données historiques. Par ailleurs, la diversité génétique observée entre les premiers foyers de 2007 suggère que l'insecte a pu être introduit à plusieurs reprises depuis la Chine. La répartition de la variabilité génétique à l'échelle de l'Europe et de l'Asie Mineure et la présence de 3 grands groupes génétiquement différenciés (Europe de l'Ouest, Europe Centrale et Asie Mineure) suggèrent que l'insecte a pu également être introduit à de multiples reprises, depuis et entre des pays européens comme cela a été avancé dans la littérature (Kenis et al. 2013, Gninenko et al. 2014).

Article I

A complex invasion story underlies the fast spread of the invasive box tree moth (Cydalima perspectalis) across Europe.

Bras A., Avtzis D. N., Kenis M., Li H., Véték G., Bernard A., Courtin C., Rousselet J., Roques A., Auger-Rozenberg M-A.

Journal of Pest Science (soumis)

A complex invasion story underlies the fast spread of the invasive box tree moth (*Cydalima perspectalis*) across Europe

¹Audrey Bras, ²Dimitrios N. Avtzis, ³Marc Kenis, ⁴Hongmei Li, ⁵Gábor Vétek, ¹Alexis Bernard, ¹Claudine Courtin, ¹Jérôme Rousselet, ¹Alain Roques, ¹Marie-Anne Auger-Rozenberg

¹INRA, UR633 Unité de Recherche de Zoologie Forestière, 2163 Avenue de la Pomme de Pin, CS 40001 ARDON 45075 ORLEANS Cedex 2, France

²Forest Research Institute, Hellenic Agricultural Organization Demeter, Vassilika, Thessaloniki, Greece

³CABI, Delémont, Switzerland

⁴MoA-CABI Joint Laboratory for Biosafety, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing, China

⁵Department of Entomology, Faculty of Horticultural Science, Szent István University, Villányi út 29–43, H-1118 Budapest, Hungary

Corresponding author: Audrey Bras, tel: +33 2 38 41 80 21, audreyb061992@gmail.com

Abstract

Many recently established non-native insect species appear to be spreading across Europe significantly faster than before. The box tree moth (*Cydalima perspectalis*), native to Asia, provides an example of this trend. First recorded in 2007 in Germany, the moth has been found in more than 30 countries in Europe and Asia Minor, where it has caused significant damage to wild and ornamental *Buxus* trees. It has been hypothesized that the trade of ornamental box trees between China and Europe introduced the moth, while plant trade among European countries caused its rapid spread. To clarify the invasion history of this pest, we analyzed the genetic diversity and structure of *C. perspectalis* populations in the species' native and invasive ranges. More specifically, we employed a 1495-bp fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. Comparison of the moths' genetic diversity in Asia versus in Europe and Asia Minor suggests that the main invasive populations of *C. perspectalis* came from eastern China. Furthermore, the moth's invasion history and high genetic diversity, coupled with the spatial genetic structure in the moth's invasive range, indicates that China was likely the source of several other introduction events.

Keywords: *Cydalima perspectalis*, *Buxus*, invasion, insect, ornamental plant trade, multiple introductions

Key Message:

The invasive moth, *Cydalima perspectalis*, has spread rapidly across Europe and Asia Minor, causing significant damage to both wild and ornamental *Buxus* trees.

Analysis of genetic markers suggests that the source of invasive populations in Europe is China, mainly eastern China, and that multiple introduction events likely occurred.

The moth's fast spread across Europe was probably the result of these multiple introductions and human-mediated long-distance commercial transport of ornamental *Buxus* trees among European countries.

Author Contribution Statement

ABr, JR, AR, MAAR conceived the research. ABr, DA, MK, HM, GV, ABe, AR performed sampling. ABr, DA, CC performed experiments. ABr, DA analyzed data. ABr, DA, GV, JR, AR, MAAR wrote the paper. All authors approved the paper.

Acknowledgments

Many collaborators helped with the sampling, greatly improving this research. We would like to acknowledge Agathe Dupin, Annette Herz, Anna Maria Vettraino, Attila Haltrich, Bogdan Groza, Christian Burban, Caroline Gutleben, Cyril Kruczkowski, Christian Stauffer, Carlos Lopez Vaamonde, Delphine Fallour-Rubio, Dinka Matošević, Evangelina Chatzidimitriou, Estelle Morel, Gabrijel Seljak, Géraldine Roux, Gergely Bán, Ivanka Ivanova, Jan Soors, Jean-Claude Martin, Jean-Emmanuel Michaut, Jurate de Prins, Kahraman Ipekdağ, Katalin Tuba, Liesbet Van Remoortere, Maria da Conceição de Lemos Viana Boavida, Marja Van der Straten, Milka Glavendekić, Philippe de Champsavin, Patrick Pineau, Peter Zach, Richárd Oláh, Stanislav Gomboc, Shiroma Sathyapala, and Valery Shurov for their aid in this task. We also wish to thank Zhiheng Wang and his colleagues for letting us use their data on *Buxus* species distribution in China. We are grateful to Augustine Jacquard, Alizée Ribas, and Charlotte Mathieu for carrying out the DNA extraction and sequencing. This research was funded by the INCA project (*INvasion fulgurante de la Pyrale du buis Cydalima perspectalis en Région Centre Val de Loire*), which was financed by the Centre-Val de Loire regional government in France (project INCA APR IR 2015 – 0009 673).

Introduction

Biological invasions are continuing to occur worldwide despite an increasing awareness of how globalization causes human-mediated species introductions with major ecological, economic, and sociological effects (Roques 2010a; Simberloff et al. 2013; Meurisse et al. 2018). Moreover, the number of non-native species shows no signs of plateauing (Seebens et al. 2017). In Europe, many species that have arrived during recent decades are first-time invaders (i.e., they have never been categorized as invasive elsewhere) (Seebens et al. 2018); this is especially true for insects. Since the 1990s, Asia has been the main source of non-native insect populations in Europe (Roques 2010a), and phytophagous species account for an ever-increasing number of the arrivals (Roques et al. 2016). The ornamental plant trade is a major pathway by which phytophagous insects have been accidentally introduced into Europe (Kenis et al. 2007; Roques 2010a; Eschen et al. 2017); furthermore, it may also facilitate establishment as insects are often introduced alongside their hosts (Eschen et al. 2015b). Europe's importation of live plants began increasing in 1995 (Van Kleunen et al. 2018). Around that same period, many of the non-native insects introduced into Europe displayed faster rates of spread post establishment (Roques et al. 2016). During the 1990s, trade and travel were becoming liberalized in Europe (e.g., customs borders were eliminated within the EU), which probably facilitated trade; however, unregulated trade, especially of ornamental plants, may have also facilitated the dispersal of non-native species across Europe (Roques et al. 2016).

The box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae), native to Asia, is an example of a non-native species that spread rapidly across Europe. The insect was probably accidentally introduced via commercial ornamental plants from Asia (Kenis et al. 2013). The moth's native range includes China, Korea, and Japan (Maruyama and Shinkaji 1987; Xiao et al. 2011; Kim and Park 2013), where the insect can develop on several *Buxus* species (Buxaceae) (Wan et al. 2014); presence on other hosts is incidental. In Europe, the moth larvae feed only on the leaves and shoots of *Buxus* species (Leuthardt and Baur 2013; Matošević et al. 2017), which eventually kills the plants (Kenis et al. 2013; Wan et al. 2014). While *C. perspectalis* was first observed on ornamental box trees in urban areas, it has now spread to natural forests in some countries, causing severe defoliation in native box trees, such as *B. sempervirens* and *B. colchica* (Kenis et al. 2013; John and Schumacher 2013; Gninenko et al. 2014; Mitchell et al. 2018). Nentwig et al. (2017) has classified *Cydalima perspectalis* as one of the 100 worst non-native species in Europe.

Cydalima perspectalis was first recorded in Europe in early 2007, at two different sites in Germany (Krüger 2008). Later that same year, it was also observed in Switzerland and the Netherlands (Leuthardt et al. 2010; Van der Straten and Muus 2010) (Figure 1). Then, over a period of less than 10 years, the insect spread across the whole of Europe and into Asia Minor, causing significant damage to wild and ornamental *Buxus* trees along the way (Kenis et al. 2013; Leuthardt and Baur 2013). It is now in more than 30 countries, ranging from the United Kingdom (Salisbury et al. 2012) to Iran (Mitchell et al. 2018).

It has been hypothesized that the moth was primarily introduced via the trade of ornamental box trees between China and Europe (Leuthardt et al. 2010; Casteels et al. 2011; Nacambo et al. 2014), and that subsequent trade among European countries led to its fast spread (EPPO 2012; Kenis et al. 2013; Matošević 2013). Indeed, China shipped large quantities of *Buxus* trees to several European countries between 2006 and 2010 (EPPO 2012). As a result, the moth could have been introduced several times in different countries after its initial appearance in 2007 in Germany. However, little is known about the moth's interception by European plant health and quarantine services (EPPO 2012) because it was not placed on EPPO's alert list until 2007 and was then removed in 2011 because no particular action had been requested by EPPO member countries (Strachinis et al. 2015). That said, it is known that *C. perspectalis* was intercepted once in 2008 in the Netherlands (EPPO 2012), which has been Europe's greatest importer of ornamental plants over recent years (Eschen et al. 2017). In the Netherlands, Belgium, and England, the moth was first observed in nurseries (Van der Straten and Muus 2010; Casteels et al. 2011; Salisbury et al. 2012). In Russia, it was initially seen on box trees imported for the Winter Olympics in Sochi (Gninenko et al. 2014). Box trees (e.g., *Buxus sempervirens* L.) are very popular ornamental plants (Matošević 2013; Mitchell et al. 2018) and drive significant commercial trade within Europe (EPPO 2012; Dehnen-Schmutz et al. 2010). Consequently, the moth's rapid spread across Europe and Asia Minor may have resulted from the ornamental plant trade (Kenis et al. 2013).

Human-mediated introductions often involve complex invasion pathways (Garnas et al. 2016; Meurisse et al. 2018), for which historical information may be missing and/or misleading. Hence, frequently, molecular data can supplement what is known about a species' invasion history, helping to clarify invasive pathways (Estoup and Guillemaud 2010; Lawson et al. 2011). Because genetic markers can reveal the presence of genetic bottlenecks, multiple introduction events, and admixture, they can clarify the likely introduction pathways of non-native species (Lawson et al. 2011; Estoup et al. 2016; Fraimout et al. 2017). The sequencing of mitochondrial DNA (mtDNA) is an efficient first step for disentangling the pathways taken by invasive species. It can be used to identify source populations, founding events, and the occurrence of multiple introductions (Muirhead et al. 2008; Estoup and Guillemaud 2010; Cristescu 2015). Hence, this approach has been employed for multiple species (e.g., Auger-Rozenberg et al. 2012; Garipey et al. 2014; Javal et al. 2017; Lesieur et al. 2018). Identifying source populations and clarifying invasive pathways helps inform management strategies and increases our understanding of how non-native species spread (Muirhead et al. 2008; Lawson et al. 2011).

In this study, we investigated the genetic diversity and structure of native and invasive populations of the box tree moth. Our objectives were to clarify the geographical origin(s) and colonization history of invasive populations in Europe. To this end, moths were sampled in the species' native range in Asia and its invasive range in Europe and Asia Minor. We then analyzed a sequence of the moth's mtDNA that includes part of the cytochrome oxidase I and II (COI - COII) genes. The results helped identify the origin of invasive *C. perspectalis* populations in Europe and strongly suggested that multiple introductions had occurred.

Materials and methods

Sampling

C. perspectalis populations were sampled in the species' native and invasive ranges (Table 1; Supplementary Material Figures S1 and S2).

In the species' native range, the goal was to collect moths from 2012 to 2017 in both natural stands and ornamental plantations of *Buxus* trees, using pheromone traps for the adults and hand sampling for the larvae and pupae (Table 1). However, surveys and trapping were unsuccessful in Japan even though *C. perspectalis* does occur there (Maruyama and Shinkaji 1987; Kawazu et al. 2007). They were also unsuccessful in the Chinese provinces of Guangdong and Guangxi as well as in natural *Buxus* stands at all but one site in China (see below); apparently, moth density is very low in the wild. In South Korea, we sampled one population from an urban area in Seoul (Table 1; N20). In China, 19 populations were sampled. All were in urban areas except for one in Fuyang, in the Zhejiang province (Table 1; N17)—larvae were collected in a sentinel plant nursery established at the boundary between natural forest and agricultural land (Kenis et al. 2018). Collection efforts covered most of the species' putative distribution range (Figure 2a): samples were obtained from northeastern China (Liaoning province), northern China (Nei Mongol and Beijing provinces), eastern China (Shandong, Anhui, Jiangsu, Shanghai, Zhejiang, and Fujian provinces), southwestern China (Yunnan and Guizhou provinces), and south-central China (Henan province).

In the species' invasive range, samples were collected in 23 different countries (Table 1) from regions that were colonized by the moth between 2007 and 2016 (Figures 1 and S2). Ideally, we sought to collect larvae via hand sampling; when that was not possible, adults were captured using pheromone traps. Moths were collected in urban areas except in the following places: Bzyb Valley (Table 1; I27) and Mtirala Park in Georgia (Table 1; I28); all sites in Russia (Table 1; I58-I60); Si Sangan National Park in Iran (Table 1; I41); and Roquefort-sur-Garonne (Table 1; I24) and Marcillac-Vallon in France (Table 1; I23).

Upon collection, all specimens were placed in 96% alcohol and stored at -21°C to preserve their DNA until the analyses could take place.

DNA extraction, amplification, and sequencing

The larvae and adults were dissected. DNA was extracted from the thoracic muscles of the larvae or the legs of the adults using the DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). We amplified a section of the mitochondrial genome that included part of the COI-COII genes. We employed a pair of primers developed by Zhu et al. (2013) for a related species, *Diaphania pyralis*; the primers were renamed LeCyd-F2 (5' TGGAGCAGGAACAGGATGAAC 3') and Cynna-R2 (5' GAGACCANTACTTGCTTTTCAG 3'). Amplification was carried out in a total PCR volume of 25 µL, which contained 1 µL of DNA, 15.8 µL of ultrapure water, 2.5 µL of 10X DreamTaq Green Buffer, 2.5 µL of dNTP (10mM), 0.5 µL of MgCl₂ (2.5mM), 1 µL of each primer (10µM), 0.5 µL of betaine solution (5 M), and 0.2 µL of DreamTaq DNA polymerase (5 units/µL). Thermocycling was

performed using a Veriti® 96-well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the following procedure: an initial 5-min denaturation step took place at 95°C and was followed by 25 amplification cycles (94°C for 35 s, 60°C for 45 s, and 72°C for 3 min). PCR products of approximately 2000 bp in length were purified using the NucleoFast® 96 PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). A fragment of around 1500 bp that included COI, ARNt L2, and COII was sequenced using Cynna-R2 and the internal primer Jerry-F 5' CAACATTATTTTGATTTTGG 3' because the PCR products were too long to be sequenced directly. Sequencing was carried out using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (v. 3.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI Prism 3500 Genetic Analyzer. The two sequenced strands were then aligned and manually verified using CodonCode Aligner v. 3.7.1 (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA).

Genetic Analysis

We successfully sequenced mtDNA from 132 and 305 individuals from species' native and invasive ranges, respectively. Sequence data from Matošević et al. (2017) were also included in the dataset for the invasive range. Sequences were aligned using Clustal W (Thompson et al. 1994), which was implemented in BioEdit v. 7.1. The final alignment of the 1495-bp fragment was obtained without any insertions or deletions. Stop codons were checked using MEGA v. 6 (Kumar et al. 2008). We compared our sequences with sequences in GenBank and BOLD using BLAST to confirm that individuals had been properly identified as *C. perspectalis* and to check for possible contamination.

A statistical parsimony network with a 95% confidence level was constructed using TCS v. 1.21 (Clement et al. 2000). We determined haplotype number (H), haplotype diversity (h), the average number of nucleotide differences (k), and nucleotide diversity (n) using DNAsp v. 5 (Librado and Rozas 2009). Haplotype distribution and frequency were projected onto maps of Asia, Europe, and Asia Minor using ArcGis v. 10.6 (ESRI, Redlands, CA, USA). To characterize the moth's native range, spatial genetic structure was first assessed by testing if G_{ST} (the coefficient of genetic variation over all the populations) was significantly smaller than N_{ST} (the coefficient taking into account similarities among haplotypes)—10,000 permutations were implemented in Permut (Pons and Petit 1996).

Analysis of molecular variance (AMOVA) was performed to look for evidence of genetic structure in the moth's native and invasive ranges; Arlequin v. 3.5 (Excoffier and Lischer 2010) was employed. To carry out the analysis, we grouped the populations according to different criteria. First, we took into account the populations' geographical locations. Second, we took into account information related to the ornamental plant trade, such as production areas and volume of imported and/or exported plants; the objective was to estimate the impacts on genetic structure in both the native and invasive ranges simultaneously. In the native range, sequences were grouped into five clusters based on population geographical location and known *Buxus* production

in Chinese provinces (René Eschen pers. comm.) (Figures 2a and S1): (1) N8, N20; (2) N2, N9; (3) N3, N4, N6, N10, N11, N12, N13, N14; (4) N1, N7, N17, N18, N19; and (5) N5, N15, N16. In the invasive range, information on ornamentals was country specific (Dehnen-Schmutz et al. 2010; EPPO, 2012; Eschen et al. 2017), and therefore sequence data were first grouped per country. Then, countries were grouped into four clusters based on geographical location and the commercial value of ornamental plant imports/exports (Dehnen-Schmutz et al. 2010; Eschen et al. 2017). The groups were as follows: (1) Germany, Netherlands, France, Italy, Belgium; (2) Switzerland, Spain, Portugal, Luxembourg; (3) Austria, Hungary, Czech Republic, Slovenia, Slovakia, Croatia, Greece, Serbia; and (4) Romania, Turkey, Russia, Bulgaria, Georgia, Iran.

Results

Twelve haplotypes were identified based on the sequences of the 437 specimens collected across the species' native and invasive ranges (HTA1-HTC1, Table 1; GenBank accession numbers: XXX-XXX). These haplotypes comprised 21 single nucleotide polymorphisms. There was no evidence of contamination nor of nuclear copies of mitochondrial DNA (numts). The BLAST search confirmed specimen identification, based on the few samples of *C. perspectalis* present in GenBank and BOLD.

The haplotypes formed three haplogroups (A, B, and C), which were separated by at least seven mutation steps (Figure 2b). The sixteen intermediate haplotypes were not present in our sample pool. Two haplotypes, HTA1 and HTB1, were prevalent—they were displayed by approximately 36% of the individuals sequenced. Two other haplotypes, HTA2 and HTB2, had prevalences of 13.5% and 8.9%, respectively. These four haplotypes were found in both the native and invasive range. Overall, haplotype diversity (h) was 0.709 (± 0.012), the average number of nucleotide differences (k) was 4.10, and nucleotide diversity (n) was 0.00274 (± 0.0000).

Genetic diversity and structure in the native range

Twelve haplotypes were observed among the sequences of the 132 specimens collected in China (19 sampling locations) and South Korea (1 sampling location) (Table 1, Figures 2a and 2b); the three haplogroups were represented. Haplogroups A and B were observed across the range of Chinese populations, but haplogroup C was only found in the Fuyang population (N17, Zhejiang province). Haplogroups A and B comprised 5 and 6 haplotypes, respectively, while haplogroup C was made up of only one. In most populations (65%), haplotypes belonging to haplogroups A and B co-occurred (e.g., Beijing, N2; Ordos, N9; Tai'an, N11). The values of the diversity indices are provided in Table 1.

Only haplotype HTB1 was common to both South Korea and China (Figure 2a), where it was shared by 32.6% of the individuals sequenced (i.e., 5.3% in South Korea and 27.3% in China). HTB3 was only observed in South Korea (N20: 46%). HTA1 and HTB2 were prevalent across China (30.3% and 22.0%, respectively). HTA1, HTB1, and HTB2 occurred in 14 populations. With the exception

of HTA2 and HTA4, which were each found in two populations in different provinces (HTA2: N9, Nei Mongol province, and N11, Shandong province; HTA4: N12, Shandong province, and N14, Shanghai province), all the other haplotypes were observed at single locations in China. Nine populations contained three haplotypes, whereas three populations contained a single haplotype. Among these three populations, only in the Wendeng population (N13, Shandong province) was more than one individual sampled. In native populations, haplotype number (H) ranged from 1 to 4, haplotype diversity (h) ranged from 0 to 1, the average number of nucleotide differences (k) ranged from 0.40 to 5.98, and nucleotide diversity (n) ranged from 0 to 0.004.

Pronounced genetic structure was observed: N_{ST} (0.277) was significantly higher than G_{ST} (0.181; p value < 0.01). The AMOVA results also supported the existence of genetic structure as all the fixation indices were significant (p value < 0.05), including F_{CT} (Table 2). Genetic differences among groups and among populations within groups nevertheless accounted for a small percentage of the genetic variance (8.4% and 9.4% respectively). The largest amount of genetic differentiation (82.2%) was found within populations (highly significant fixation index; p value < 0.001).

Genetic diversity and structure in the invasive range

Only five haplotypes (HTA1, HTB1, HTA2, HTA4, HTB2) emerged from the sequences of the 305 specimens collected in Europe and Asia Minor (72 sampling locations); these five haplotypes were also present in China (Table 1). The values of the diversity indices in invasive range were lower than those in the native range ($h = 0.668$, $k = 3.79$, and $n = 0.0027$).

HTA1 and HTB1 were observed across the invasive populations (Figure 3). HTA1 was found in 47 populations and 39.3% of the individuals sequenced, while HTB1 was found in 45 populations and 38.0% of the individuals sequenced. HTA2 was seen in 29 populations. HTA4 and HTB2 had restricted distributions—they occurred in populations associated with the first records of *C. perspectalis* in Europe. HTA4 was only found in the Weil-am-Rhein population (I34) in Germany and in the Saint Louis population (I18) in France, which is located near to the border with Germany. HTB2 was found mostly in populations in Kehl (I33) and Strasbourg (I19), two nearby locations. Twenty-eight populations contained just one haplotype, whereas 34 populations contained two haplotypes, and 9 populations contained 3 haplotypes. In invasive populations, haplotype number (H) ranged from 1 to 4, haplotype diversity (h) ranged from 0 to 1, the average number of nucleotide differences (k) ranged from 0.4 to 8, and nucleotide diversity (n) ranged from 0 to 0.00535. We did not observe any genetic diversity in Switzerland, Austria, and Greece. Germany and France had the highest genetic diversity: four and five haplotypes, respectively.

The AMOVA results revealed the presence of genetic structure within the invasive populations (Table 2). The values of all the fixation indices were highly significant (p value < 0.01). The largest amount of genetic differentiation (76.09%) was found within populations; genetic differences among populations within groups and among groups accounted for a smaller percentage of genetic variation (12.30% and 11.61%, respectively).

Discussion

Our study has three key findings, which are based on mtDNA sequence diversity. First, the box tree moth, *C. perspectalis*, displays complex genetic structure in its native range, likely as a result of anthropogenic activity. Second, the genetic diversity patterns observed in Asia versus in Europe and Asia Minor indicate that the source of European populations is likely eastern China. Finally, coupled with historical records, the significant genetic diversity and structure observed in the invasive range suggests that there were multiple introduction events.

Likely influence of human activities on the moth's genetic structure in its native range in China

Cydalima perspectalis displayed weak but significant spatial genetic structure across its native range. Our analyses suggest that three main distribution regions exist, based on the following results: (1) the occurrence of a single haplotype (HTB3) in South Korea (i.e., haplogroup A is absent); (2) the co-occurrence of haplogroups A and B in northern and eastern China; and (3) the high prevalence of haplogroup B in southern China. A similar genetic pattern was observed for another invasive moth of Asian origin, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Meng et al. 2008). The mtDNA diversity of *C. perspectalis* populations in Asia is organized into three distinct haplogroups, two of which are widely distributed. The spatial co-occurrence of divergent haplogroups suggests that this moth has a complex history. Indeed, the existence of divergent haplogroups may reflect ancient phylogenetic differentiation, whereas their co-occurrence may have resulted from secondary contact, produced by moth movement and/or the human-mediated dispersal of infested plants. A similar genetic pattern has been observed for the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis*, in China; it is thought that the beetle was transported to northern and eastern China in plants used for reforestation (Carter et al. 2009; Javal et al. 2017).

In our study, specimens came from urban areas found from southern to northern China because we were unable to obtain samples from natural stands of *Buxus* despite our best efforts. Indeed, the moth's putative distribution in Asia is based solely on records from urban areas (Kawazu et al. 2007; Kim and Park 2013; Nacambo et al. 2014), which makes it difficult to guess at its natural distribution. Natural forests of *Buxus* species are found in southwestern, south-central, and southeastern China (Figure 2) (Fang et al. 2011). Although sampling took place in towns in several southern provinces, the proximity of forests may explain the significant genetic diversity that we observed. Similarly, the proximity of the sentinel plant nursery in Fuyang (southeastern China) to natural stands may also account for the unique occurrence of haplogroup C at that site. In recent years, *Buxus* trees have increasingly been planted as ornamentals in China, especially in the northern part of the country; we can assume that *C. perspectalis* was introduced into northern Chinese cities (e.g., Beijing) as a result of commercial plantations (Nacambo et al. 2014). Because we carried out sampling in urban areas, the genetic structure we observed could represent both the moth's phylogeographic history in China and its human-mediated dispersal as a result of the

ornamental plant trade. As a result, we cannot interpret the precise evolutionary history of *C. perspectalis* and the role of human-mediated dispersal in its current distribution.

However, our results indicate that a number of intermediate haplotypes exist that were not found via our sampling efforts. Furthermore, we had access to two more sequences (which were not included in our dataset because their precise sampling locations were unknown) that were characteristic of an additional haplotype. In combination with our results, these two findings suggest that the genetic diversity present in Asia is greater than that reported here. Thus, samples from other provinces in south-central China, from Japan, and from natural forest stands would allow us to better describe the spatial genetic structure of *C. perspectalis* and the species' evolutionary history in Asia.

A Chinese origin for the invasive populations of Europe and Asia Minor

We observed five haplotypes in the moth's invasive range. Although genetic diversity was still significant, it was much smaller than that observed in Asia. This pattern is commonly seen in biological invasions (Dlugosch and Parker 2008; Estoup and Guillemaud 2010; Lawson Handley et al. 2011; Cristescu 2015). For example, it has been observed for the Asian long-horned beetle, *A. glabripennis* (Javal et al. 2017), and the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Garipey et al. 2014, 2015), two recent invaders that came to Europe from Asia.

For *C. perspectalis*, the South Korean haplotype was not represented in the invasive populations, but all the haplotypes found in the invasive range were also observed in China, including two of the three common haplotypes. This finding strongly suggests that European populations have a Chinese origin. This interpretation is supported by information on *Buxus* imports (EPPO 2012), which also points to China as the most probable source for invasive populations, as previously hypothesized (Leuthardt et al. 2010; Casteels et al. 2011; Nacambo et al. 2014). Indeed, over recent decades, China has emerged as a key exporter of ornamental plants (Dehnen-Schmutz et al. 2010; Kenis et al. 2018). For example, between 2005 and 2010, the Netherlands obtained more than 80% of its imported ornamental plants (i.e., import volume) from eastern Asia, and especially China (van Valkenburg et al., 2014). Moreover, China was the greatest supplier of *Buxus* trees to other European countries during that the same period (EPPO 2012; Kenis et al. 2018).

More specifically, the moth's spatial genetic structure within China, the distribution of the country's ornamental *Buxus* production areas, and the economic development of coastal Chinese provinces (Roques 2010b) suggest that the source is eastern China. Indeed, all the haplotypes observed in Europe were also found in the Shandong province, and four were observed around Shanghai. In addition, the coastal provinces in eastern China are more economically developed than are other Chinese provinces, and Shanghai is one of China's key economic centers, from whence large quantities of products are exported throughout the world (Roques 2010b; Lu et al. 2018). Moreover, half of the areas in which *Buxus* trees are produced for export are found in

eastern China, notably around Shanghai (René Eschen pers. comm.). Hence, these places could potentially be the sources of invasive *C. perspectalis* populations. That said, correctly identifying source populations or invasion pathways is not always straightforward. An invader's native range can be too large to characterize exhaustively (e.g., Orlova-Bienkowskaja et al. 2015; Orlova-Bienkowskaja and Volkovitsh 2018). The fine-scale reconstruction of invasion history is possible when there is significant genetic structure in the native range (Lombaert et al. 2011; Cristescu 2015). Here, it was challenging to define the source of the invasive moth because there was significant genetic diversity in the invasive range, a low level of genetic variation among Chinese populations, and a lack of samples from other provinces in southern China and from Japan.

A complex invasion process with multiple introduction events

The spatial genetic structure and genetic diversity observed in Europe and Asia Minor suggest that *C. perspectalis* was introduced multiple times. Moreover, *Buxus* trees were commercially imported from China by the EU (at least by the Netherlands and Italy) between 2006 and 2010 (EPPO 2012). No information is available for other European countries, but the moth was first observed in Germany in 2007 (Krüger 2008) and then, later that year, in Switzerland and the Netherlands (Van der Straten and Muus 2010). This pattern suggests multiple introduction events, where the source population was probably in China. The genetic diversity observed at these locations fits with the hypothesis of multiple introductions of moths arriving directly from China: the populations genetically differed by no more than one haplotype, which was shared by three of the four populations occurring in the locations where *C. perspectalis* was first recorded (I34 and I33 in Germany and I52 and I53 in the Netherlands). It is common for biological invasions to have multiple introductions (Estoup and Guillemaud 2010; Lawson et al. 2011; Cristescu 2015); indeed, the same pattern has been observed for many invasive insects across the world (e.g., Ciosi et al. 2008; Lozier et al. 2009; Marsico et al. 2011; Lesieur et al. 2018). This phenomenon may enhance invasion success and accelerate the spread of non-native species (Estoup and Guillemaud 2010; Cristescu 2015). Recently, multiple introduction events have been observed for non-native insects coming from China, such as the Harlequin ladybeetle, *Harmonia axyridis* (Lombaert et al. 2010); the brown marmonated stink bug, *H. halys* (Garipey et al. 2015); the Asian long-horned beetle, *A. glabripennis* (Javal et al. 2017); and the spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Framout et al. 2017). The box tree moth is an additional example, even if more detailed data on *Buxus* tree imports to Europe are needed to decipher the number of introduction events and the number of founders. Having estimates for these two variables will help clarify their role in the successful establishment and spread of *C. perspectalis* in Europe and Asia Minor (Estoup and Guillemaud 2010; Blackburn et al. 2015; Cristescu 2015).

It is assumed that *C. perspectalis* has a natural dispersal rate of around 10 km per year (Van der Straten and Muus 2010; Casteels et al. 2011), which is far too slow to explain the moth's fast colonization of Europe and Asia Minor. The distances between some occurrences, such as

between locations in Romania (Gutue et al. 2014), Turkey (Hizal et al. 2012), and Russia (Gninenko et al. 2014), are greater than 400 km, which suggests human-mediated transport. The moth’s spatial genetic structure suggests that three main groups exist. The evidence is as follows: (1) genetic diversity was highest in western Europe; (2) haplotype HTB1 was found throughout central Europe and in the Balkans; and (3) haplotypes HTA1 and HTA2 were mostly observed in countries near the Black Sea. This pattern may have resulted from several introduction events, some directly from the moth’s native range as well as some from the moth’s invasive range. Indeed, all the haplotypes except for one (HTA2) were observed at the locations where *C. perspectalis* was first reported. Even though patterns of genetic diversity in some countries (i.e., Switzerland, Belgium, Luxembourg, and Slovenia) could be explained by the moth dispersing on its own, in most countries (i.e., France, Italy, Bulgaria, Turkey, Russia, and Georgia), *C. perspectalis* seems to have spread via human-mediated dispersal, as has been hypothesized for the invasive populations in Russia (Gninenko et al. 2014). For non-native species, anthropogenic activity is known to promote dispersal, subsequent introduction events, and range expansion (Estoup and Guillemaud 2010). Box trees are very popular ornamental plants (Matošević 2013); their international trade may have favored multiple introductions of *C. perspectalis* into Europe. The box tree trade within Europe (Dehnen-Schmutz et al. 2010; Eschen et al. 2015a) may have increased moth dispersal and likely led to a bridgehead effect, as occurred in the invasion of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Lesieur et al. 2018).

Our study provides a new example of a pest species with a complex invasion history, and we have highlighted the role played by the ornamental plant trade in its introduction and dispersal. However, to better pinpoint the moth’s region of origin in China and to disentangle the effects of anthropogenic activity on its current distribution patterns, we need to carry out broader sampling efforts and acquire more information about the moth’s natural distribution in its native range (Muirhead et al. 2008). Additionally, more powerful tools such as microsatellite markers (Estoup and Guillemaud 2010; Cristescu 2015; Estoup et al. 2016) could help flesh out *C. perspectalis* invasion scenarios and clarify how the species spread across Europe and Asia Minor in less than ten years.

Compliance with Ethical Standards:

Funding: This study was funded by the Centre-Val de Loire regional government in France (project INCA APR IR 2015 – 0009 673).

Conflict of interest: The authors state that there is no conflict of interest.

Ethical approval: All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Specimens sampled did not involve endangered nor protected species.

References

- Auger-Rozenberg M-A, Boivin T, Magnoux E, *et al* (2012) Inferences on population history of a seed chalcid wasp: invasion success despite a severe founder effect from an unexpected source population. *Mol Ecol* 21:6086–6103.
- Bella S (2013) The box tree moth *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) continues to spread in southern Europe: new records for Italy (Lepidoptera Pyraloidea Crambidae). *Redia* 96:51–55
- Bengtsson BÅ. (2017) Remarkable records of Microlepidoptera in Sweden during 2016. *Entomol Tidskr* 138:1–24
- Beshkov S, Abadjiev S, Dimitrov D (2015) *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae: Spilomelinae) – New invasive pest moth in Bulgaria. *Entomol Rec J Var* 127:18–22
- Blackburn TM, Lockwood JL, Cassey P (2015) The influence of numbers on invasion success. *Mol Ecol* 24:1942–1953.
- Blaik T, Hebda G, Maślowski J (2016) *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) – inwazyjny gatunek motyla w faunie Polski (Lepidoptera: Crambidae). *Przyr Sudet* 19:121–124
- Carter ME, Smith MT, Harrison RG (2009) Patterns of genetic variation among populations of the Asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) in China and Korea. *Ann Entomol Soc Am* 102:895–905.
- Casteels H, Witters J, Vandierendonck S, *et al* (2011) First report of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in Belgium. In: *Proceedings of the 63rd International Symposium on Crop Protection*. Ghent, pp 151–155
- Ciosi M, Miller NJ, Kim KS, *et al* (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Mol Ecol* 17:3614–3627.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9:1657–1659
- Cristescu ME (2015) Genetic reconstructions of invasion history. *Mol Ecol* 24:2212–2225.
- Dehnen-Schmutz K, Holdenrieder O, Jeger MJ, Pautasso M (2010) Structural change in the international horticultural industry: Some implications for plant health. *Sci Hortic* 125:1–15.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol Ecol* 17:431–449.
- EPPO (2012). EPPO Technical Document No. 1061, EPPO Study on the Risk of Imports of Plants for Planting EPPO Paris.
- Eschen R, Douma JC, Grégoire J-C, *et al* (2017) A risk categorisation and analysis of the geographic and temporal dynamics of the European import of plants for planting. *Biol Invasions* 19:3243–3257.
- Eschen R, Grégoire J-C, Hengeveld GM, *et al* (2015a) Trade patterns of the tree nursery industry in Europe and changes following findings of citrus longhorn beetle, *Anoplophora chinensis* Forster. *NeoBiota* 26:1–20.
- Eschen R, Roques A, Santini A (2015b) Taxonomic dissimilarity in patterns of interception and establishment of alien arthropods, nematodes and pathogens affecting woody plants in Europe. *Divers Distrib* 21:36–45.
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Mol Ecol* 19:4113–4130.
- Estoup A, Ravigné V, Hufbauer R, *et al* (2016) Is there a genetic paradox of biological invasion? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 47:51–72.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567.
- Fang J, Wang Z, Tang Z (eds) (2011) *Atlas of woody plants in China: distribution and climate*. Springer ; Higher Education Press, Heidelberg ; New York : Beijing
- Feldtrauer J-F, Feltrauer J-J, Brua C (2009) Premiers signalements en France de la Pyrale du Buis *Diaphania perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante s'attaquant aux Buis. *Bull Soc ent Mulhouse* 65:55–58
- Fraimout A, Debat V, Fellous S, *et al* (2017) Deciphering the routes of invasion of *Drosophila suzukii* by means of ABC random forest. *Mol Biol Evol* 34:980 – 996.
- Garipey TD, Bruin A, Haye T, *et al* (2015) Occurrence and genetic diversity of new

- populations of *Halyomorpha halys* in Europe. J Pest Sci 88:451–460.
- Garipey TD, Haye T, Fraser H, Zhang J (2014) Occurrence, genetic diversity, and potential pathways of entry of *Halyomorpha halys* in newly invaded areas of Canada and Switzerland. J Pest Sci 87:17–28.
- Garnas JR, Auger-Rozenberg M-A, Roques A, *et al* (2016) Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. Biol Invasions 18:935–952.
- Gninenko YI, Shiryayeva NV, Shurov VI (2014) The box tree moth - a new invasive pest in the Caucasian Forests. Plant Health - Res Pract 1:32–39
- Gutue C, Gutue M, Rosca I (2014) Crambidae associated with parks and ornamental gardens of Bucharest. LVIII:323–326
- Hizal E, Kose M, Yesil C, Kaynar D (2012) The new pest *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera : Crambidae) in Turkey. J Anim Vet Adv 11:400–403
- Hrnčić S, Radonjić S, Perović T (2017) The impact of alien horticultural pests on urban landscape in the southern part of Montenegro. Acta Zool Bulg 9:191–202
- Javal M, Roques A, Haran J, *et al* (2017) Complex invasion history of the Asian long-horned beetle: fifteen years after first detection in Europe. J Pest Sci.
- John R, Schumacher J (2013) Der Buchsbaum-Zünsler (*Cydalima perspectalis*) im Grenzach-Wyhlener Buchswald – Invasionschronik und Monitoringergebnisse. Gesunde Pflanz 65:1–6.
- Kawazu K, Honda H, Nakamura S, Adati T (2007) Identification of Sex Pheromone Components of the Box Tree Pyralid, *Glyphodes perspectalis*. J Chem Ecol 33:1978–1985.
- Kenis M, Li H, Fan J, *et al* (2018) Sentinel nurseries to assess the phytosanitary risks from insect pests on importations of live plants. Sci Rep 8:11217.
- Kenis M, Nacambo S, Leuthardt F, *et al* (2013) The box tree moth *Cydalima perspectalis*, in Europe : horticultural pest or environmental disaster ? Aliens 33 38–41
- Kenis M, Rabitsch W, Auger-Rozenberg M-A, Roques A (2007) How can alien species inventories and interception data help us prevent insect invasions? Bull Entomol Res 97:489–502.
- Kim J, Park I-K (2013) Female sex pheromone components of the box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis*, in Korea: Field test and development of film-type lure. J Asia-Pac Entomol 16:473–477.
- Koren T, Crne M (2012) The first record of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859)(Lepidoptera, Crambidae) in Croatia. Nat Croat 21:507
- Krüger EO (2008) *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) - new for the European fauna (Lepidoptera: Crambidae). Entomol Z Mit Insekten-Börse 118:81–83
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinform 9:299–306.
- Lawson L-J, Estoup A, Evans DM, *et al* (2011) Ecological genetics of invasive alien species. BioControl 56:409–428.
- Lesieur V, Lombaert E, Guillemaud T, *et al* (2018) The rapid spread of *Leptoglossus occidentalis* in Europe: a bridgehead invasion. J Pest Sci 1–12
- Leuthardt F, Billen W, Baur B (2010) Ausbreitung des Buchsbaumzünslers *Diaphania perspectalis* (Lepidoptera, Pyralidae) in der Region Basel– eine für die Schweiz neue Schädlingsart. Entomo Helvetica 3:51–57
- Leuthardt FLG, Baur B (2013) Oviposition preference and larval development of the invasive moth *Cydalima perspectalis* on five European box-tree varieties. J Appl Entomol 137:437–444.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25:1451–1452.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet J-M, *et al* (2010) Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. PLoS ONE 5:e9743.
- Lombaert E, Guillemaud T, Thomas CE, *et al* (2011) Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. Mol Ecol 20:4654–4670.
- Lozier JD, Roderick GK, Mills NJ (2009) Tracing the invasion history of mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae), in North America: a population genetics approach. Biol Invasions 11:299–314.

- Lu J, Li S, Wu Y, Jiang L (2018) Are Hong Kong and Taiwan stepping-stones for invasive species to the mainland of China? *Ecol Evol*.
- Marsico TD, Wallace LE, Ervin GN, *et al* (2011) Geographic patterns of genetic diversity from the native range of *Cactoblastis cactorum* (Berg) support the documented history of invasion and multiple introductions for invasive populations. *Biol Invasions* 13:857–868.
- Maruyama T, Shinkaji N (1987) Studies on the life cycle of the box-tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). I. Seasonal adult emergence and developmental velocity. *Jpn J Appl Entomol Zool* 31:226–232
- Matošević D (2013) Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*, Lepidoptera; Crambidae), new invasive insect pest in Croatia. *South-East Eur For* 4:89–94
- Matošević D, Lukić I, Bras A, *et al* (2017) Spatial distribution, genetic diversity and food choice of Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*) in Croatia. *South-East Eur For* 8:41–46.
- Matsiakh I, Kramarets V, Mamadashvili G (2018) Box tree moth *Cydalima perspectalis* as a threat to the native populations of *Buxus colchica* in Republic of Georgia. *J Entomol Res Soc* 20:29–42
- Meng X-F, Shi M, Chen X-X (2008) Population genetic structure of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae): strong subdivision in China inferred from microsatellite markers and mtDNA gene sequences. *Mol Ecol* 17:2880–2897.
- Meurisse N, Rassati D, Hurley BP, *et al* (2018) Common pathways by which non-native forest insects move internationally and domestically. *J Pest Sci*.
- Mitchell R, Chitanava S, Dbar R, *et al* (2018) Identifying the ecological and societal consequences of a decline in *Buxus* forests in Europe and the Caucasus. *Biol Invasions*.
- Muirhead JR, Gray DK, Kelly DW, *et al* (2008) Identifying the source of species invasions: sampling intensity vs. genetic diversity. *Mol Ecol* 17:1020–1035.
- Nacambo S, Leuthardt FLG, Wan H, *et al* (2014) Development characteristics of the box-tree moth *Cydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. *J Appl Entomol* 138:14–26.
- Nagy A, Szarukán I, Csabai J, *et al* (2017) Distribution of the box tree moth (*Cydalima perspectalis* Walker 1859) in the north-eastern part of the Carpathian Basin with a new Ukrainian record and Hungarian data. *Eppo Bull* 47:279–282
- Nentwig W, Bacher S, Kumschick S, *et al* (2017) More than “100 worst” alien species in Europe. *Biol Invasions* 20:1611–1621.
- Orlova-Bienkowskaja MJ, Ukrainsky AS, Brown PMJ (2015) *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Asia: a re-examination of the native range and invasion to southeastern Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Biol Invasions* 17:1941–1948.
- Orlova-Bienkowskaja MJ, Volkovitsh MG (2018) Are native ranges of the most destructive invasive pests well known? A case study of the native range of the emerald ash borer, *Agilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Biol Invasions* 20:1275–1286.
- Ostojić I, Zovko M, Petrović D, Elez D (2015) New records of box tree moth *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) in Bosnia and Herzegovina. *Works Fac Agric Food Sci Univ Sarajevo* 60:139–143
- Pérez-Otero R, Mansilla JP, Vidal M (2015) *Cydalima perspectalis* Walker, 1859 (Lepidoptera, Crambidae): una nueva amenaza para *Buxus* spp. en la Península Ibérica. *Arq Entomoloxicos* 10:225–228
- Pons O, Petit RJ (1996) Measwring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144:1237–1245
- Ries C, Arendt A, Braunet C, *et al* (2017) Environmental impact assessment and black, watch and alert list classification after the ISEIA Protocol of invertebrates in Luxembourg. *Bull Société Nat Luxemb* 119:63–70
- Roques A (2010a) Taxonomy, time and geographic patterns. Chapter 2. *BioRisk* 4:11–26.
- Roques A (2010b) Alien forest insects in a warmer world and a globalised economy: impacts of changes in trade, tourism and climate on forest biosecurity. *N Z J For Sci* 77–94
- Roques A, Auger-Rozenberg M-A, Blackburn TM, *et al* (2016) Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biol Invasions* 18:907–920.
- Sáfián S, Horváth B (2011) Box tree moth—*Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), new member in the Lepidoptera fauna of Hungary

- (Lepidoptera: Crambidae). Nat Somogyiensis 19:245–246
- Salisbury A, Korycinska A, Halstead AJ (2012) The first occurrence of larvae of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in private gardens in the UK. Br J Entomol Nat Hist 25:1
- Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, *et al* (2017) No saturation in the accumulation of alien species worldwide. Nat Commun 8:14435.
- Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, *et al* (2018) Global rise in emerging alien species results from increased accessibility of new source pools. Proc Natl Acad Sci 115:E2264–E2273.
- Seljak G (2012) Six new alien phytophagous insect species recorded in Slovenia in 2011. Acta Entomol Slov 20:31–44
- Simberloff D, Martin J-L, Genovesi P, *et al* (2013) Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. Trends Ecol Evol 28:58–66
- Strachinis I, Kazilas C, Karamaouna F, *et al* (2015) First record of *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) in Greece. Hell Plant Prot J 8:66–72.
- 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 Res 22:4673–4680
- Vajgand D (2016) Contribution to the study of Lepidoptera of Čelarevo (Vojvodina, Serbia). Acta Entomol Serbica 21:49–92
- Van der Straten MJ, Muus TS (2010) The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. Proc Neth Entomol Soc Meet 21:107–111
- Van Kleunen M, Essl F, Pergl J, *et al* (2018) The changing role of ornamental horticulture in alien plant invasions. Biol Rev 93:1421–1437
- van Valkenburg J, Brunel S, Brundu G, *et al* (2014) Is terrestrial plant import from East Asia into countries in the EPPO region a potential pathway for new emerging invasive alien plants? EPPO Bull 44:195–204.
- Wan H, Haye T, Kenis M, *et al* (2014) Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe? J Appl Entomol 138:14–26.
- Xiao H-J, Xin H-Q, Zhu X-F, Xue F-S (2011) Photoperiod and temperature of diapause induction in *Diaphania perspectalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Chin J Appl Entomol 48:116–120
- Zhu B-J, Liu Q-N, Dai L-S, *et al* (2013) Characterization of the complete mitochondrial genome of *Diaphania pyloalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Gene 527:283–291.

Tables and Figures

Table 1. Sampling information for and genetic diversity of native and invasive populations of *Cydalima perspectalis* based on the current study and Matošević et al. (2017).

N°	Country	County	Populations	GPS coordinates	Collection date	N	Haplotype	H	<i>h</i> (±SD)	<i>k</i>	<i>n</i> (±SD)
Native Range						132		12	0.755 (0.018)	4.25	0.0028 (0.0001)
N1	China	Anhui	Huaibei	33°57'N; 116°47'E	2017	5	HTB1 (4); HTB2 (1)	2	0.400 (0.237)	0.40	0.0003 (0.0002)
N2		Beijing	Beijing	39°57'N; 116°17'E	2016-2017	7	HTA1 (5); HTB1 (1); HTB2 (1)	3	0.524 (0.209)	3.62	0.0024 (0.0008)
N3		Fujian	Fuzhou	26° 3'N; 119°11'E	2017	1	HTA1 (1)	1	-	-	-
N4			Youxi	26°10'N; 118°11'E	2017	5	HTA1 (1); HTB1 (3); HTB2 (1)	3	0.700 (0.218)	3.20	0.0021 (0.0011)
N5		Guizhou	Guiyang	26°25'N; 106°40'E	2017	8	HTA1 (1); HTB1 (4); HTB2 (3)	3	0.679 (0.122)	2.29	0.0015 (0.0008)
N6		Henan	Xinyang	32° 7'N; 114° 5'E	2017	1	HTB1 (1)	1	-	-	-
N7		Jiangsu	Nanjing	32° 2'N; 118°47'E	2017	5	HTA1 (3); HTB1 (1); HTB2 (1)	3	0.700 (0.218)	4.60	0.0031 (0.0009)
N8		Liaoning	Shenyang	41°48'N; 123°25'E	2017	7	HTA1 (2); HTB1 (4); HTB2 (1)	3	0.667 (0.160)	3.62	0.0024 (0.0008)
N9		Nei Mongol	Ordos	39°35'N; 109°45'E	2016	5	HTA1 (2); HTA2 (2); HTB6 (1)	3	0.800 (0.164)	3.80	0.0025 (0.0013)
N10		Shandong	Jinan	36°38'N; 117° 7'E	2012	5	HTA1 (2); HTA3 (1); HTB1 (2)	3	0.800 (0.164)	4.60	0.0031 (0.0008)
N11			Tai'an	36°11'N; 117° 5'E	2012-2017	8	HTA1 (2); HTA2 (1); HTB1 (3); HTB2 (2)	4	0.821 (0.101)	4.43	0.0030 (0.0006)
N12			Dongying	37°25'N; 118°40'E	2017	3	HTA1 (1); HTA4 (1); HTB1 (1)	3	1 (0.272)	5.33	0.0036 (0.0015)
N13		Shanghai	Wendeng	37°12'N; 122° 4'E	2016	2	HTB2 (2)	1	0	-	0
N14			Shanghai	31°13'N; 121°28'E	2016-2017	14	HTA1 (5); HTA4 (1); HTA5 (1); HTB2 (7)	4	0.659 (0.090)	4.59	0.0031 (0.0003)

N15		Yunnan	Kunming	25° 8'N; 102°45'E	2016	8	HTB1 (4); HTB2 (2); HTB4 (1); HTB5 (1)	4	0.750 (0.139)	0.93	0.0006 (0.0002)
N16			Lijiang	26°54'N; 100°13'E	2016	9	HTB1 (4); HTB2 (5)	2	0.556 (0.090)	0.56	0.0004 (0.0001)
N17		Zhejiang	Fuyang	30°0'N; 119°47'E	2014-2015	12	HTA1 (4); HTB1 (3); HTB2 (1); HTC1 (4)	4	0.773 (0.069)	5.98	0.0040 (0.0003)
N18			Hangzhou	30°15'N; 120° 9'E	2012	8	HTA1 (6); HTB1 (1); HTB2 (1)	3	0.464 (0.200)	3.25	0.0022 (0.0009)
N19			Lishui	28°28'N; 119°55'E	2017	6	HTA1 (5); HTB2 (1)	2	0.333 (0.215)	2.67	0.0018 (0.0012)
N20	South Korea	Gyeonggi	Seoul	37°26'N; 126°58'E	2012	13	HTB1 (7); HTB3 (6)	2	0.538 (0.060)	1.08	0.0007 (0.0001)
<i>Invasive range</i>						305		5	0.668 (0.012)	3.79	0.0027 (0.0001)
I1	Austria	Vienna	Vienna	48°14'N; 16°20'E	2015	6	HTB1 (6)	1	0	-	0
I2		Vorarlberg	Rankweil	47°16'N; 9°38'E	2009	2	HTB1 (2)	1	0	-	0
I3	Belgium	East Flanders	Ghent	51° 2'N; 3°43'E	2015-	5	HTA1 (5)	1	0	-	0
I4		Antwerp	Mechlin	51° 2'N; 4°28'E	2015	1	HTB1 (1)	1	-	-	-
I5			Vremde	51°10'N; 4°30'E	2016	3	HTA1 (1); HTB1 (2)	2	0.667 (0.314)	4.67	0.0031 (0.0015)
I6	Bulgaria	Plòvdiv	Plovdiv	42° 7'N; 24°45'E	2016	4	HTA1 (1); HTA2 (3)	2	0.500 (0.265)	0.50	0.0003 (0.0002)
I7		Sofia	Sofia	42°41'N; 23°19'E	2016	5	HTA1 (1); HTB1 (4)	2	0.400 (0.237)	2.80	0.0019 (0.0011)
I8	Croatia	Varaždin	Vinica	46°19'N; 16° 9'E	2014	6	HTA2 (1); HTB1 (5)	2	0.333 (0.215)	2.67	0.0018 (0.0012)
I9		Primorje-Gorski Kotar	Osor	44°41'N; 14°21'E	2014	1	HTB1 (1)	1	-	-	-
I10			Artatore	44°33'N; 14°22'E	2014	1	HTA1 (1)	1	-	-	-
I11		Zagreb	Zagreb	45°49'N; 15°59'E	2014	5	HTA1 (3); HTB1 (2)	2	0.600 (0.175)	4.20	0.0028 (0.0008)
I12		Osijek-Baranja	Višnjevac	45°34'N; 18°37'E	2014	5	HTB1 (5)	1	0	-	0
I13	Czech	South Moravian	Brno	49°12'N; 16°36'E	2016	5	HTA1 (2); HTA2 (2);	3	0.800 (0.164)	3.40	0.0023 (0.0011)
I14	France	Auvergne-Rhône-	Grenoble	45° 6'N; 5°43'E	2014	3	HTA1 (3)	1	0	-	0
I15		Centre-Val de Loire	Orléans	47°53'N; 1°53'E	2014	5	HTA1 (2); HTB1 (3)	2	0.600 (0.175)	4.20	0.0028 (0.0008)
I16			Tours	47°22'N; 0°41'E	2015 - 2016	7	HTA1 (4); HTA2 (1); HTB1 (2)	3	0.667 (0.160)	3.62	0.0024 (0.0008)
I17		Corse	Bastia	42°40'N; 9°26'E	2015	4	HTA1 (2); HTA2	2	0.667 (0.204)	0.67	0.0005 (0.0001)
I18		Grand Est	Saint Louis	47°36'N; 7°32'E	2016	9	HTA1 (6); HTA4 (1); HTB2 (2)	3	0.556 (0.165)	3.33	0.0022 (0.0009)
I19			Strasbourg	48°36'N; 7°46'E	2016	4	HTB2 (4)	1	0	-	0

I20		Île-de-France	Paris	48°50'N; 2°20'E	2014	5	HTA1 (5)	1	0	-	0
I21		Nouvelle-Aquitaine	Bordeaux	44°46'N; 0°41'O	2015	4	HTA2 (2); HTB1 (2)	2	0.667 (0.204)	5.33	0.0036 (0.0011)
I22			La Rochelle	46° 9'N; 1° 9'O	2014-	5	HTA1 (1); HTA2 (4)	2	0.400 (0.237)	0.40	0.0003 (0.0002)
I23		Occitanie	Marcillac-Vallon	44°26'N; 2°28'E	2016	2	HTA2 (1); HTB1 (1)	2	1 (0.500)	8.00	0.0054 (0.0027)
I24			Roquefort-sur-Garonne	43° 9'N; 0°58'E	2015	4	HTA1 (2); HTA2 (1); HTB1 (1)	3	0.833 (0.222)	4.00	0.0027 (0.0012)
I25		Pays de la Loire	Nantes	47°15'N; 1°29'O	2015	5	HTA1 (3); HTA2 (1); HTB1 (1)	3	0.700 (0.218)	3.20	0.0021 (0.0011)
I26		Provence-Alpes-Côte d'Azur	Lagnes	43°53'N; 5° 6'E	2014-2015	11	HTA1 (7); HTA2 (2); HTB1 (1); HTB2 (1)	4	0.600 (0.154)	2.80	0.0019 (0.0008)
I27	Georgia	Abkhazia	Bzyb Valley	43°17'2N; 40°23'E	2015	5	HTA1 (3); HTA2 (1); HTB1 (1)	3	0.700 (0.218)	3.20	0.0021 (0.0011)
I28		Adjara	Mtirala National	41°41'N; 41°49'E	2015	5	HTA1 (2); HTA2 (3)	2	0.600 (0.175)	0.60	0.0004 (0.0001)
I29		Samegrelo	Zugdidi	42°30'N; 41°52'E	2015	4	HTA2 (3); HTB1 (1)	2	0.500 (0.265)	4.00	0.0027 (0.0014)
I30		-	Tbilisi	41°41'N; 44°47'E	2016	5	HTA2 (2); HTB1 (3)	2	0.600 (0.175)	4.80	0.0032 (0.0009)
I31	Germany	Hesse	Lorsch	49°38'N; 8°33'E	Rearing	5	HTA1 (3); HTB1 (2)	2	0.600 (0.175)	4.20	0.0028 (0.0008)
I32		Baden-	Kandern	47°43'N; 7°39'E	2008 -	4	HTA1 (4)	1	0	-	0
I33			Kehl	48°34'N; 7°49'E	2017	3	HTB2 (3)	1	0	-	0
I34			Weil Am Rhein	47°35'N; 7°37'E	2008 -	4	HTA1 (2); HTA4 (2)	2	0.667 (0.204)	0.67	0.0005 (0.0001)
I35	Greece	Central Macedonia	Filiria	40°53'N; 22°28'E	2016	2	HTB1 (2)	1	0	-	0
I36			Katerini	40°16'N; 22°30'E	2016	7	HTB1 (7)	1	0	-	0
I37	Hungary	Baranya	Harkány	45°51'N; 18°13'E	2015	5	HTB1 (5)	1	0	-	0
I38		Csongrád	Hódmezővásárhely	46°25'N; 20°20'E	2014	5	HTA1 (3); HTB1 (2)	2	0.600 (0.175)	4.20	0.0028 (0.0008)
I39		Pest	Budaörs	47°27'N; 18°57'E	2015	5	HTA1 (3); HTB1 (2)	2	0.600 (0.175)	4.20	0.0028 (0.0008)
I40		Vas	Kőszeg	47°23'N; 16°32'E	2014	5	HTA1 (1); HTB1 (4)	2	0.400 (0.237)	2.80	0.0019 (0.0011)
I41	Iran	Mazandaran	Si Sangan National Park	36°34'N ; 51°48'E	2017	3	HTA1 (1); HTB1 (2)	2	0.667 (0.314)	4.67	0.0031 (0.0015)
I42	Italy	Emilia-Romagna	Bologna	44°29'N; 11°20'E	2014	3	HTA2 (3)	1	0	-	0
I43		Liguria	Ruta	44°20'N; 9°10'E	2014	3	HTA1 (1); HTA2 (1); HTB1 (1)	3	1 (0.272)	5.33	0.0036 (0.0015)
I44		Veneto	Legnaro	45°20'N; 11°57'E	2014	5	HTB1 (5)	1	0	-	0
I45			Tregnago	45°31'N; 11° 9'E	2014	4	HTB1 (4)	1	0	-	0

I46		Tuscany	Cesa	43°19'N; 11°48'E	2016	2	HTA1 (1); HTA2 (1)	2	1 (0.500)	1.00	0.0007 (0.0003)
I47			Florence	43°44'N; 11°15'E	2016	4	HTA2 (3); HTB1 (1)	2	0.500 (0.265)	4.00	0.0027 (0.0014)
I48			Lucca	43°51'N; 10°27'E	2016	4	HTA1 (1); HTA2 (2); HTB1 (1)	3	0.833 (0.222)	4.17	0.0028 (0.0013)
I49		Piedmont	Turin	45° 4'N; 7°43'E	2016	4	HTA1 (2); HTA2 (2)	2	0.667 (0.204)	0.67	0.0005 (0.0001)
I50		Lazio	Viterbo	42°25'N; 12° 6'E	2016	4	HTA1 (2); HTA2 (1); HTB1 (1)	3	0.833 (0.222)	4.00	0.0027 (0.0012)
I51	Luxembourg		Luxembourg	49°36'N; 6° 7'E	2016	2	HTA1 (1); HTB1 (1)	2	1 (0.5)	7.00	0.0047 (0.0023)
I52	Netherlands	North Brabant	Giessen	51°46'N; 5° 3'E	2009-	9	HTA1 (1); HTB1 (8)	2	0.222 (0.166)	1.56	0.0010 (0.0008)
I53		South Holland	Boskoop	52° 4'N; 4°39'E	2008	3	HTA1 (3)	1	0	-	0
I54			Rotterdam	51°55'N; 4°29'E	2016	5	HTA1 (3); HTB1 (2)	2	0.600 (0.175)	4.20	0.0028 (0.0008)
I55		Groningen	Rhederbrug	53° 5'N; 7° 9'E	2016	3	HTB1 (3)	1	0	-	0
I56	Portugal	Minho-Lima	Vila Nova de Cerveira	41°56'N; 8°44'O	2016	5	HTA1 (2); HTA2 (3)	2	0.600 (0.175)	0.60	0.0004 (0.0001)
I57	Romania	Timiș	Timișoara	45°44'N; 21°13'E	2015	3	HTA2 (2); HTB1 (1)	2	0.667 (0.314)	5.33	0.0036 (0.0017)
I58	Russia	Krasnodar Krai	Solokhaul	43°48'N; 39°40'E	2014	4	HTA1 (3); HTA2 (1)	2	0.500 (0.265)	0.50	0.0003 (0.0002)
I59			Komsomolsk	44°56'N; 37°18'E	2014	2	HTA1 (2)	1	0	-	0
I60			Krasnodar	45° 1'N; 38°57'E	2014	5	HTA1 (4); HTA2 (1)	2	0.400 (0.237)	0.40	0.0003 (0.0002)
I61	Serbia	Belgrade	Belgrade	44°47'N; 20°27'E	2014	5	HTA1 (2); HTB1 (3)	2	0.400 (0.237)	4.20	0.0028 (0.0008)
I62	Slovakia	Banská Bystrica	Zvolen	48°34'N; 19° 8'E	2015	5	HTA2 (5)	1	0	-	0
I63		Bratislava	Bratislava	48° 8'N; 17°11'E	2015	4	HTB1 (4)	1	0	-	0
I64	Slovenia	Prekmurje	Dobrovnic	46°38'N; 16°19'E	2012	2	HTB1 (2)	1	0	-	0
I65		Goriška	Nova Gorica	45°57'N; 13°39'E	2015	6	HTA1 (2); HTB1 (4)	2	0.533 (0.172)	3.73	0.0025 (0.0008)
I66		Slovenian Littoral	Sečovelje	45°27'N; 13°36'E	2012-	2	HTB1 (2)	1	0	-	0
I67	Spain	Girona	Besalú	42°12'N; 2°41'E	2016	4	HTA1 (3); HTA2 (1)	2	0.500 (0.265)	0.50	0.0003 (0.0002)
I68	Switzerland	Jura	Delémont	47°21'N; 7°20'E	2014-	6	HTA1 (6)	1	0	-	0
I69		Basel-Landschaft	Liestal	47°28'N; 7°44'E	2014	3	HTA1 (3)	1	0	-	0
I70		Ticino	Monteggio	45°59'N; 8°47'E	2012	3	HTA1 (3)	1	0	-	0
I71	Turkey	Marmara	Istanbul	41° 0'N; 28°59'E	2014	5	HTA1 (3); HTB1 (2)	2	0.600 (0.175)	4.20	0.0028 (0.0008)
I72			Yalova	40°38'N; 29°15'E	2015	2	HTA1 (1); HTA2 (1)	2	1 (0.5)	1.00	0.0007 (0.0003)

The information provided for each location is population number (N°); haplotype number (H); haplotype diversity (h , with standard deviation SD); average number of nucleotide differences (k); and nucleotide diversity (n , with standard deviation SD).

Table 2. Results of the hierarchical AMOVA of COI-COII sequence data obtained from *Cydalima perspectalis* in its (a) native range and (b) invasive range.

Source of variation	df	Sum of squares	% of variation	Fixation index
(a) Native range				
Among groups	4	6.067	9.37	$F_{CT} = 0.093^*$
Among populations within groups	15	7.725	8.43	$F_{SC} = 0.094^*$
Within populations	112	35.693	82.20	$F_{ST} = 0.178^{***}$
(b) Invasive range				
Among groups	3	11.091	11.61	$F_{CT} = 0.116^{**}$
Among populations within groups	20	15.291	12.30	$F_{SC} = 0.139^{***}$
	281			$F_{ST} = 0.239^{***}$
Within populations		75.132	76.09	

Statistical probabilities were derived from 50,175 permutations; * p value < 0.05, ** p value < 0.01, *** p value < 0.001. (a) In the native range, five groups were defined: (1) N8, N20; (2) N2, N9; (3) N3, N4, N6, N10, N11, N12, N13, N14; (4) N1, N7, N17, N18, N19; and (5) N5, N15, N16 (see Table 1 for population numbers). (b) In the invasive range, four groups were defined: (1) Germany, Netherlands, France, Italy, Belgium; (2) Switzerland, Spain, Portugal, Luxembourg; (3) Austria, Hungary, Czech Republic, Slovenia, Slovakia, Croatia, Greece, Serbia; and (4) Romania, Turkey, Russia, Bulgaria, Georgia, Iran.

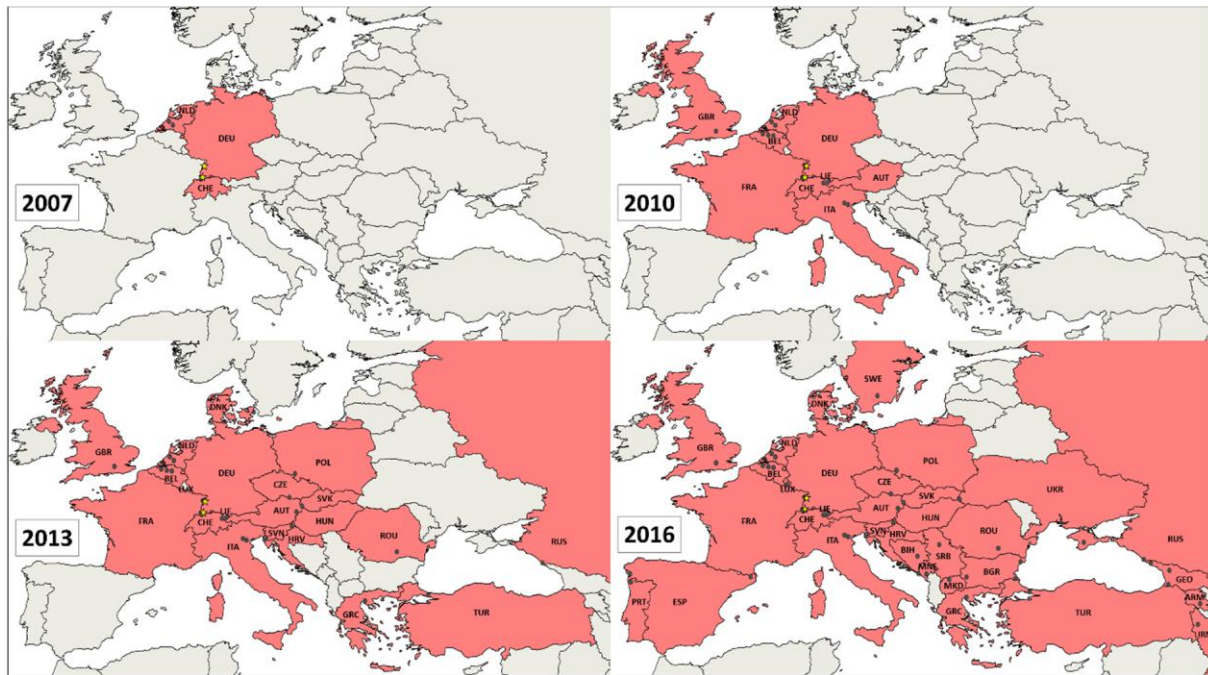


Figure 1. Spread of *Cydalima perspectalis* across Europe and Asia Minor between 2007 (the year the species was first observed) and 2016. The two yellow stars indicate the first places that *C. perspectalis* was detected—in Germany (DEU) in 2007 (Krüger 2008). The gray dots represent the first observation(s) of the moth in each country, which were determined based on a literature review. Country abbreviations are as follows (listed by year of first moth observation): CHE: Switzerland (Leuthardt et al. 2010); NLD: Netherlands (Van der Straten and Muus 2010); FRA: France (Feldtrauer et al. 2009); GBR: United Kingdom (Salisbury et al. 2012); AUT: Austria; LIE: Liechtenstein; DNK: Denmark; ITA: Italy (Bella 2013); BEL: Belgium (Casteels et al. 2011); ROU: Romania (Gutue et al. 2014); TUR: Turkey (Hizal et al. 2012); HUN: Hungary (Sáfián and Horváth 2011); CZE: Czech Republic (Bella 2013); SVN: Slovenia (Seljak 2012); HRV: Croatia (Koren and Crne 2012); POL: Poland (Blak et al. 2016); RUS: Russia (Gninenko et al. 2014); SVK: Slovakia (Bella 2013); GRC: Greece (Strachinis et al. 2015); ESP: Spain (Pérez-Otero et al. 2015); BGR: Bulgaria (Beshkov et al. 2015); SRB: Serbia (Vajgand 2016); MNE: Montenegro (Hrnčić et al. 2017); BIH: Bosnia and Herzegovina (Ostojić et al. 2015); MKD: Macedonia (Irena Papazova-Anakieva pers. comm.); GEO: Georgia and Abkazia (Matsiakh et al. 2018); UKR: Ukraine (Nagy et al. 2017); LUX: Luxembourg (Ries et al. 2017); PRT: Portugal (Maria da Conceição de Lemos Viana Boavida pers. comm.); ARM: Armenia (Shiroma Sathyapala pers. comm.); IRN: Iran (Mitchell et al. 2018); and SWE: Sweden (Bengtsson 2017).

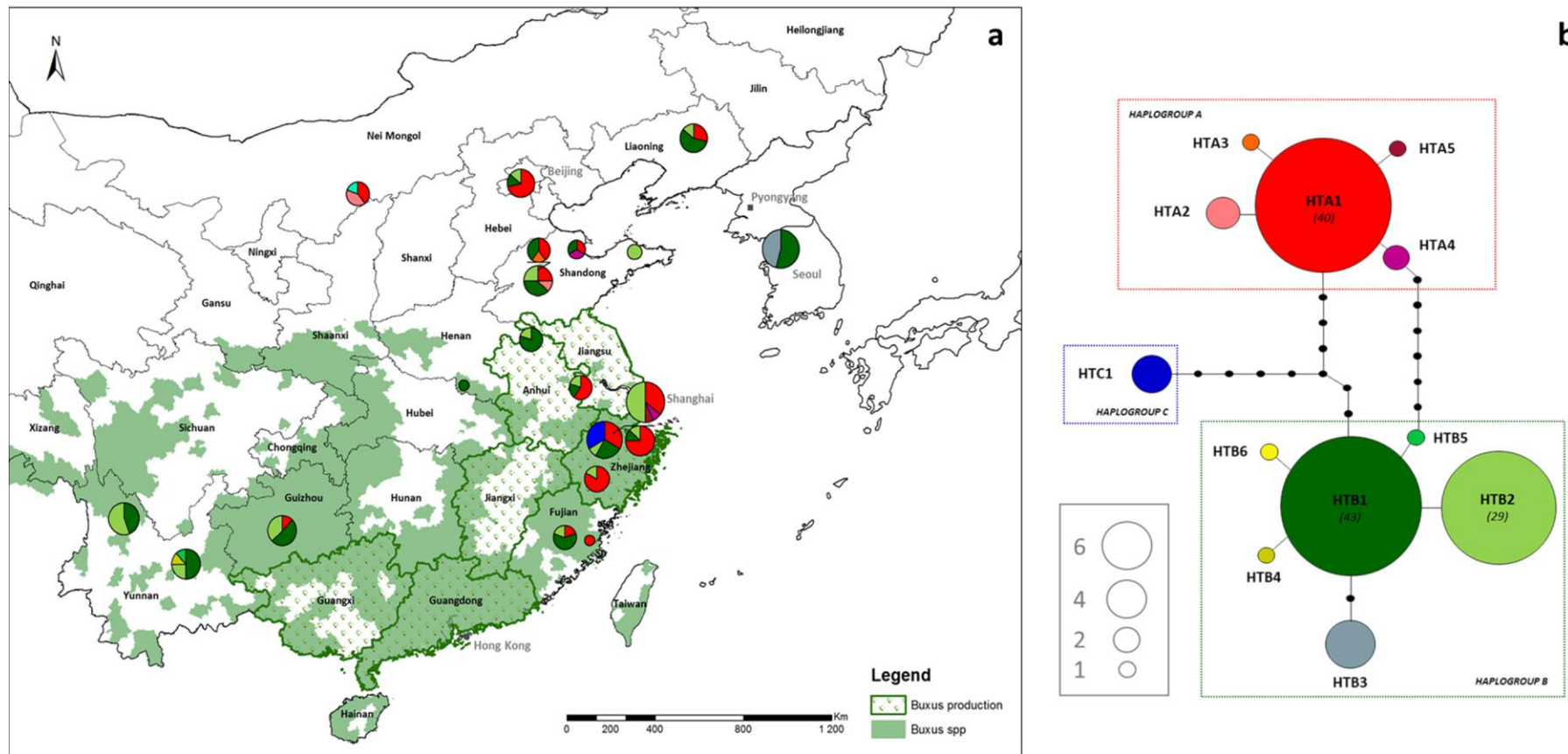


Figure 2a. Spatial distribution of *Cydalima perspectalis* COI-COII haplotypes in the moth's native range. The color codes indicate the color used in the haplotype network (see Figure 2b). The putative natural range of *C. perspectalis* was characterized based on records in the literature and moths collected as part of this study. The distribution of *Buxus* species was estimated based on Fang et al. (2011), and *Buxus* production in Chinese provinces was estimated using unpublished data provided by René Eschen.

b. Network of *Cydalima perspectalis* COI-COII haplotypes based on the haplotype frequencies observed in the moth's native range. Each circle represents a haplotype (HTA1 to HTC1) and is labeled using a specific color. Circle size is proportional to the number of individuals. Each line between circles corresponds to a mutational step, and the small empty circles are missing intermediate haplotypes.

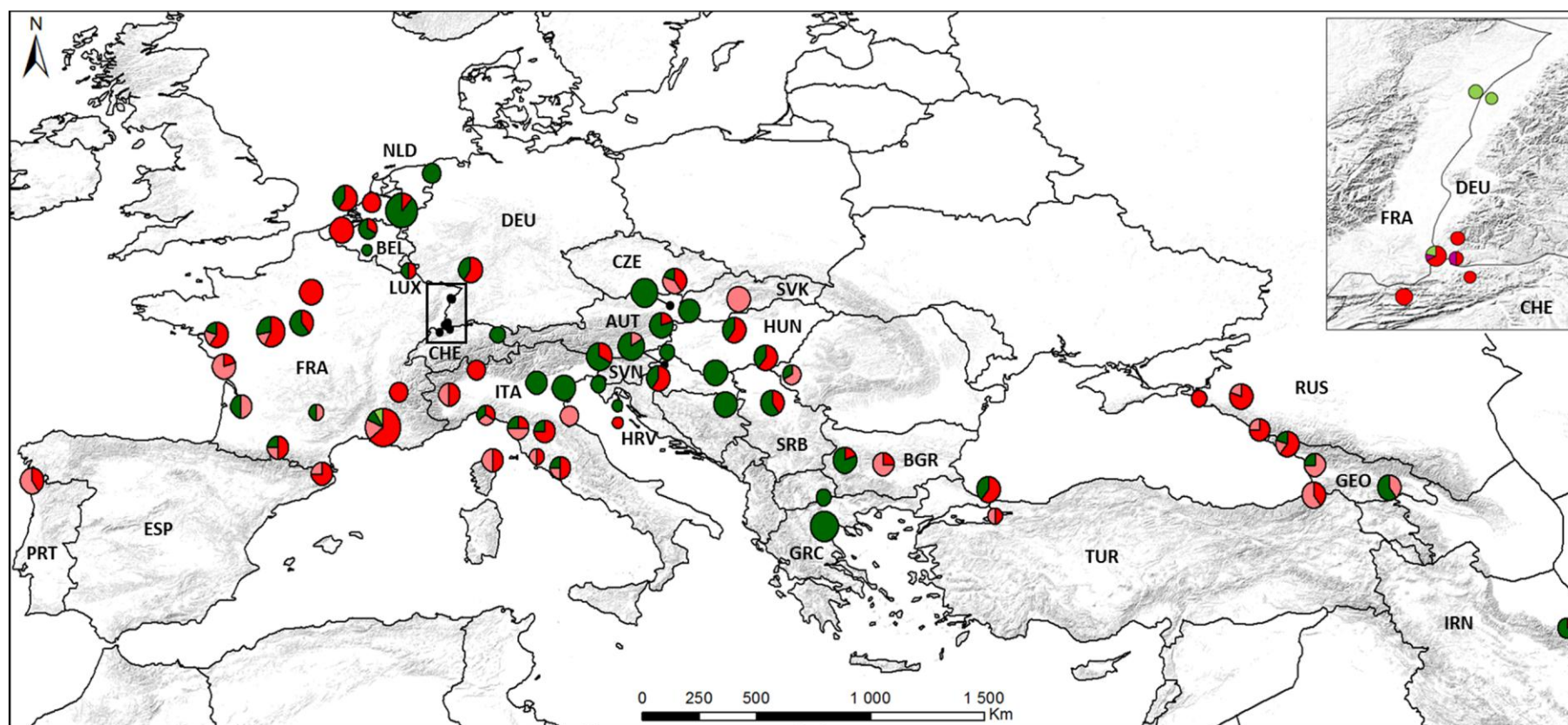


Figure 3. Geographical distribution of *Cydalima perspectalis* COI-COII haplotypes in the moth's invasive range based on the results of the current study and Matošević et al. (2017). Circle size is proportional to the number of individuals. The color codes indicate the color used in the haplotype network (see Figure 2b). Country abbreviations are as follows: DEU: Germany; CHE: Switzerland; NLD: Netherlands; FRA: France; AUT: Austria; ITA: Italy; BEL: Belgium; ROU: Romania; TUR: Turkey; HUN: Hungary; CZE: Czech Republic; SVN: Slovenia; HRV: Croatia; RUS: Russia; SVK: Slovakia; GRC: Greece; ESP: Spain; BGR: Bulgaria; SRB: Serbia; GEO: Georgia; LUX: Luxembourg; PRT: Portugal; and IRN: Iran.

Supplementary Material:

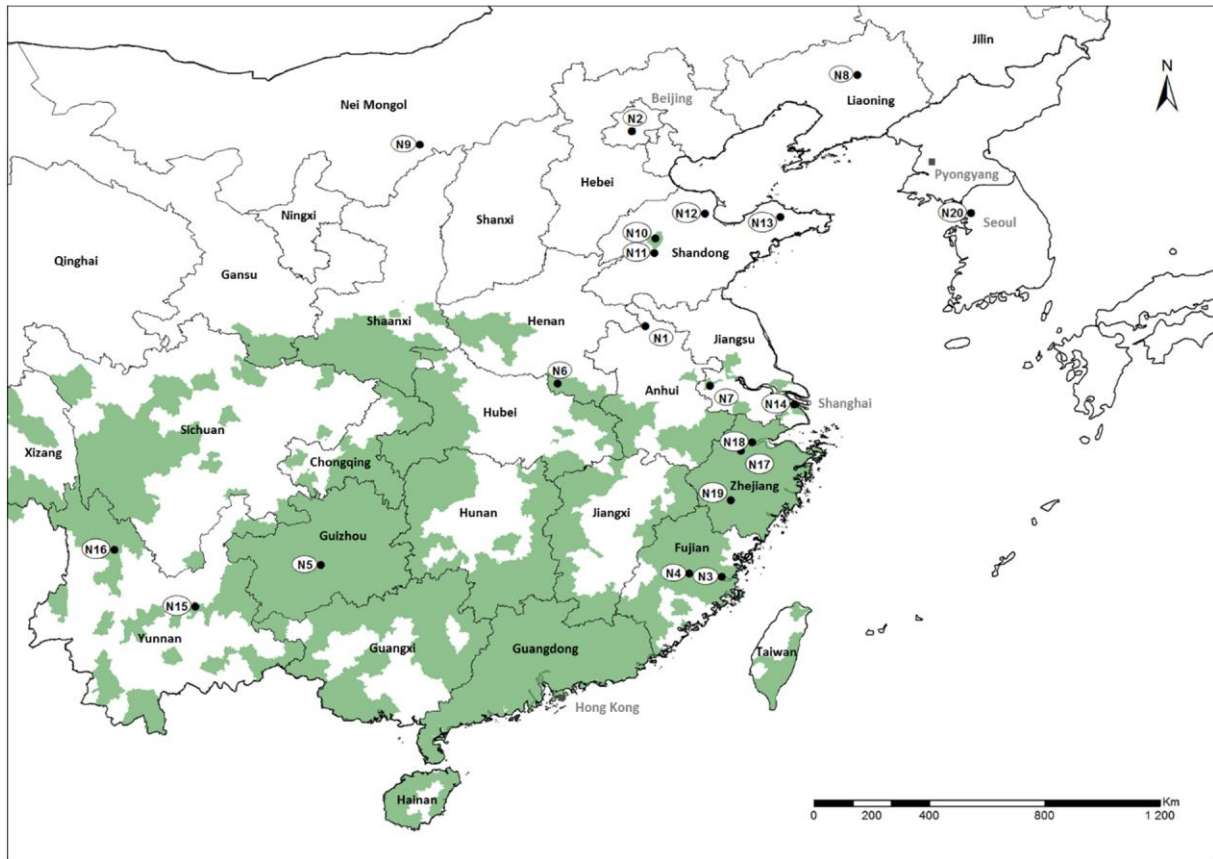


Figure S1. Geographical distribution of sampled *Cydalima perspectalis* populations in the species' native range. The numbers represent the different populations (see Table 1). The distribution of *Buxus* species was estimated using Fang et al. (2011).

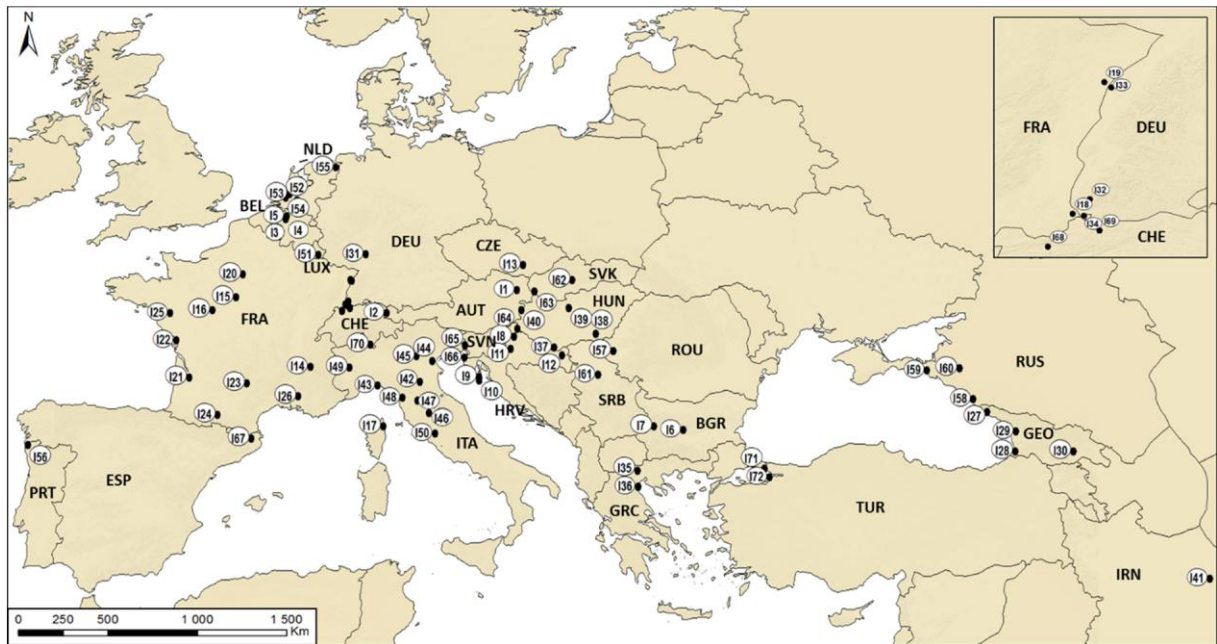


Figure S2. Geographical distribution of sampled *Cydalima perspectalis* populations in the species' invasive range. The numbers represent the different populations (see Table 1). DEU: Germany; CHE: Switzerland; NLD: Netherlands; FRA: France; AUT: Austria; ITA: Italy; BEL: Belgium; ROU: Romania; TUR: Turkey; HUN: Hungary; CZE: Czech Republic; SVN: Slovenia; HRV: Croatia; RUS: Russia; SVK: Slovakia; GRC: Greece; ESP: Spain; BGR: Bulgaria; SRB: Serbia; GEO: Georgia; LUX: Luxembourg; PRT: Portugal; and IRN: Iran.

3.3 Une première étape dans la compréhension des routes d'invasion de la pyrale du buis

Notre étude a permis de reconstituer l'histoire évolutive de la pyrale du buis dans un espace géographique particulier qui est, d'une part la zone d'origine correspondant au cadre historique, et d'autre part la zone d'introduction, avec l'hypothèse d'une ou plusieurs introductions. Les résultats obtenus avec l'ADN mitochondrial ont montré une distribution complexe de la variabilité génétique dans le temps et dans l'espace en Asie ainsi qu'en Europe et en Asie Mineure, mais n'avaient pas la résolution suffisante pour cibler précisément une zone géographique réduite comme source probable. Le manque d'informations sur la distribution de l'insecte dans sa zone native, notamment en milieu naturel, a complexifié l'échantillonnage, ce qui a limité la description de la diversité génétique présente. De plus, le passage du milieu forestier à urbain dans la zone d'origine a aussi embrouillé la compréhension de son histoire évolutive. En effet, le changement de compartiment est représentatif du rôle des activités humaines dans le transport de populations d'insectes au sein de l'aire native. Cela a pu atténuer, voire flouter la structuration génétique des populations chinoises comme cela a été envisagé pour le capricorne asiatique *Anoplophora glabripennis* (Carter et al. 2009, Javal et al. 2017a). Dans la zone envahie, l'insuffisance de données historiques et la forte diversité génétique observée avec l'ADN mitochondrial sur l'ensemble de la zone envahie n'ont pu permettre de définir clairement le nombre d'évènements d'introduction depuis la zone d'origine et de les différencier d'introductions provenant de populations déjà envahissantes.

Dans le cas de certaines espèces envahissantes, l'utilisation de l'ADN mitochondrial comme seul marqueur, associée aux données historiques, a permis de décrire assez précisément l'histoire de l'invasion chez l'espèce étudiée (e.g Chapple et al. 2013, Kolbe et al. 2013). Dans d'autres cas, comme pour *C. perspectalis*, les données manquantes dans la zone d'origine et le peu de données historiques, comme des données d'interceptions ou d'informations précises sur les circuits commerciaux, compliquent le traçage des routes d'invasion (Downie 2002, Zhang & Hou 2014). C'est aussi le cas pour deux espèces récemment introduites en Europe : la punaise diabolique, *Halyomorpha halys*, dont l'historique de l'invasion est encore mal connu malgré plusieurs études génétiques sur les populations des zones envahies (Xu et al. 2014a, Garipey et al. 2014, 2015, Cesari et al. 2014, 2018, Valentin et al. 2017), ou pour le capricorne asiatique, *A. glabripennis*, (Carter et al. 2009, 2010, Javal et al. 2017a).

L'utilisation de marqueurs plus polymorphes, tels que les microsatellites, associée à des analyses plus fines pourront permettre ainsi de mieux décrire et comprendre l'histoire de l'invasion de *C. perspectalis* en Europe, comme cela a été fait pour de nombreux insectes envahissants (e.g. Lombaert et al. 2010, Boubou et al. 2012, Auger-Rozenberg et al. 2012, Guillemaud et al. 2015, Correa et al. 2018). Ils nous permettront de mieux comprendre les flux de gènes et donc la dynamique temporelle des populations et les processus de dispersion de l'insecte.

Chapitre 4

De l'introduction à la dispersion dans la zone envahie



4.1 Les marqueurs microsatellites et leur utilisation dans les études d'invasions biologiques

4.1.1 L'apport des microsatellites dans l'étude des routes d'invasion

L'utilisation des marqueurs microsatellites permet de caractériser la diversité génétique de différentes populations et individus, la présence de structuration génétique et d'étudier les flux de gènes entre populations (Putman & Carbone 2014). Ces éléments aident, dans un certain nombre de cas, à définir de manière précise les routes d'invasion d'espèces envahissantes (Lombaert et al. 2010, Lombaert et al. 2014, Arca et al. 2015, van Boheemen et al. 2017), d'autant plus quand les microsatellites sont associés à des données historiques, géographiques et/ou écologiques (Estoup & Guillemaud 2010, Cristescu 2015). Leur utilisation a ainsi permis de mettre en évidence les zones sources, le nombre d'évènements d'introduction, la présence d'*admixture* au sein des populations envahissantes ou encore l'existence de phénomène tête de pont (Estoup & Guillemaud 2010, Lawson Handley et al. 2011, Cristescu 2015). Dans certaines études, les goulots d'étranglements subis par les espèces ont pu être quantifiés en utilisant ces marqueurs (Arca et al. 2015, Dittrich-Schröder et al. 2018).

Les microsatellites sont des séquences répétées en tandem de 1 à 6 nucléotides. Ce sont des marqueurs nucléaires neutres, co-dominants, à hérédité biparentale et présentant un fort taux de polymorphisme (plus élevé que l'ADN mitochondrial) (Roderick 1996, Selkoe & Toonen 2006, Guichoux et al. 2011, Senan et al. 2014). Ils sont répartis sur l'ensemble du génome d'une espèce et sont présents dans les parties non-codantes. Ces marqueurs présentent l'avantage de pouvoir amplifier plusieurs loci du génome de l'espèce d'intérêt et permettent d'estimer la diversité ainsi que la structure génétique à l'échelle de la population et entre populations. Il est ainsi possible d'étudier les migrations contemporaines (Roderick 1996, Zhang & Hewitt 2003, Guichoux et al. 2011) mais aussi les processus d'invasion (Estoup & Guillemaud 2010, Lawson et al. 2011, Cristescu 2015). Cependant, ce sont des marqueurs assez spécifiques qui nécessitent souvent d'être développés pour chaque espèce (Selkoe & Toonen 2006, Senan et al. 2014). Les dessins d'amorces se font généralement au niveau des régions flanquantes qui entourent les microsatellites (Selkoe & Toonen 2006). Le développement de tels marqueurs peut être ainsi complexe selon les organismes considérés. C'est le cas des Lépidoptères, chez qui la présence « d'ADN répétés » au niveau des régions flanquantes tend à empêcher l'amplification de certains allèles, augmentant ainsi le taux d'allèles nuls (Sinama et al. 2011). De plus, les microsatellites peuvent être parfois moins présents chez ce groupe et redondants, ce qui peut rendre plus difficile la mise au point de ces marqueurs (Zhang 2004).

4.1.2 Les différentes étapes du développement

Les nouvelles techniques de séquençage permettent de couvrir aléatoirement l'ensemble du génome, rapidement et à bas coût (Santana et al. 2009, Guichoux et al. 2011, Senan et al. 2014). Cela permet d'identifier un nombre conséquent de séquences contenant des motifs microsatellites, optimisant les chances d'obtenir des microsatellites uniques, qui pourraient être utilisés comme marqueurs. Il est important de bien définir les individus sur lesquels le développement va se faire pour essayer d'être le plus représentatif de la diversité génétique des populations étudiées (Senan et al. 2014, Meirmans 2015). Ainsi, dans le cas des espèces envahissantes, il est recommandé d'utiliser des individus génétiquement différents et de choisir autant d'individus venant de la zone native que de la zone envahie à toutes les étapes du processus de développement. Au cours des différentes étapes de développement, un grand nombre de marqueurs sont écartés car soit ils présentent trop de similarités avec d'autres séquences, soit ils n'amplifient pas sur tous les individus choisis, soit ils présentent plus de trois bandes lors de la migration sur gel ou ne sont finalement pas polymorphes (Guichoux et al. 2011). Les caractéristiques des marqueurs (e.g polymorphisme, allèles nuls) aideront ensuite au choix des marqueurs qui seront gardés et utilisés en routine en fonction des questions écologiques posées.

Dans le cas de la pyrale du buis, aucun marqueur microsatellite n'avait encore été développé. J'ai donc dû en mettre au point pour étudier la dynamique des routes d'invasion de *C. perspectalis*. Les premières étapes du développement ont été réalisées par l'entreprise Genoscreen. Les étapes externalisées correspondaient à l'enrichissement en microsatellites, le séquençage, la sélection des séquences contenant un motif microsatellite et le dessin des amorces. Le reste du développement a été réalisé au laboratoire sur des individus génétiquement différents provenant de la zone native et envahie. Au final, 15 marqueurs microsatellites polymorphes ont été identifiés. Ils ont été caractérisés sur 2 populations natives et sur 2 populations envahissantes géographiquement éloignées et possédant des haplotypes différents (Article I). Les résultats ont été publiés dans *European Journal of Entomology* et correspondent à l'Article II.

Article II

*Isolation and characterization of 15 microsatellite markers for the highly invasive box tree moth *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae).*

Bras A., Sauné L., Roques A., Rousselet J., Auger-Rozenberg M-A.

European Journal of Entomology, 2018, Vol. 115, 264–267.



Isolation and characterization of 15 microsatellite markers for the highly invasive box tree moth *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae)

AUDREY BRAS¹, LAURE SAUNÉ², ALAIN ROQUES¹, JÉRÔME ROUSSELET¹ and MARIE-ANNE AUGER-ROZENBERG¹

¹ INRA, UR633 Unité de Recherche de Zoologie Forestière, 2163 Avenue de la Pomme de Pin, CS 40001 ARDON 45075 ORLEANS Cedex 2, France; e-mails: audrey.bras@inra.fr, alain.roques@inra.fr, jerome.rousselet@inra.fr, marie-anne.auger-rozenberg@inra.fr

² UMR1062 CBGP (INRA, CIRAD, IRD, Montpellier Supagro), INRA, 755 avenue du campus Agropolis, CS 30016, 34988 Montpellier-sur-lez Cedex, France; e-mail: laure.saune@inra.fr

Key words. Lepidoptera, Crambidae, *Cydalima perspectalis*, microsatellites, invasive insect, genetic diversity

Abstract. In this study, we report the development of a set of 15 polymorphic microsatellite markers for the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker), a highly invasive insect in Europe causing significant damage to natural and ornamental *Buxus* trees. The markers were characterized for four distant populations in both its native (China, two populations) and invasive ranges (Czech Republic and Turkey, one population each). The number of alleles ranged from 2 to 12. No marker significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium for all the populations sampled. These microsatellite markers are promising tools for further studies on the invasive pathways and dispersal pattern of the box tree moth in Europe.

INTRODUCTION

The box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), is a pest insect native to East Asia. Its natural distribution includes China, Korea and Japan. The larvae feed on leaves and shoots of plants in the genus *Buxus*, which can result in their death (Wan et al., 2014). This invasive species was first recorded in 2007 in Germany (Krüger, 2008). Since then, it quickly spread across Europe causing significant damage in both urban areas planted with ornamental box trees and natural forest stands of *Buxus sempervirens* (Kenis et al., 2013). The trade in ornamental box plants between China and Europe is hypothesized as the invasion pathway for the box tree moth (Casteels et al., 2011) and the trade between European countries could account for its fast subsequent spread (Matošević, 2013). Elucidating invasion pathways of invasive species is essential for developing appropriate management programmes and preventing further introductions of Asian populations of *C. perspectalis* as well as those of other species that may use the same pathways (Estoup & Guillemaud, 2010). Most of our knowledge about invasive pathways comes from historical and observational data, which may be incomplete and/or misleading. In this context, genetic markers have proved to be efficient tools for disentangling complex invasive pathways. The use of such markers facilitated the detection of a bridgehead effect in the invasion of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, in Europe (Lombaert et al., 2010). A similar approach used in the case of the invasive fruit fly *Drosophila suzukii* led to the suggestion that northeast China was the most probable source of the fly populations invasive in Europe while those invasive in western North America likely originated from southeast China and Hawaii (Framout et al., 2017). However, genetic markers

are usually not available for recently-arrived invasive species and require development. Here, we report the development of a set of 15 polymorphic microsatellite markers for *C. perspectalis* and characterize the genetic variation for these loci in two native Asian populations and two populations invasive in Europe and Asia Minor.

MATERIALS AND METHODS

Total genomic DNA was isolated for the first step of the microsatellite loci screening, from one pooled sample of 15 individuals collected in both the native and invaded regions (Table 1). Both larvae and adult stages were dissected and DNA was extracted from thoracic muscles using the DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Then, 1 µg of the pooled DNA was used by GenoScreen (Lille, France) to develop microsatellite libraries using 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries as described in Malausa et al. (2011). Briefly, total DNA was mechanically fragmented and enriched for (TG)₁₀, (TC)₁₀, (AAC)₈, (AAG)₈, (AGG)₈, (ACG)₈, (ACAT)₆ and (ACTC)₆ repeat motifs. Enriched fragments were subsequently amplified. PCR products were purified, quantified and one GsFLX library was then created following the manufacturer's protocols and sequenced on a GsFLX PTP. The bioinformatics program QDD (Megléczy et al., 2010) was used to analyze sequences. QDD was used to conduct all bioinformatic steps from raw sequences until PCR primers were obtained. Briefly, adapters/vectors were removed and sequences with microsatellites were identified. Sequences with redundancy and/or enriched with possible mobile element associations were detected through an "all against all" BLAST in order to remove microsatellite sequences that were

Table 1. Description of *Cydalima perspectalis* samples used in the different steps in the development of the microsatellites.

Area	Country	Locality	GPS coordinates	Year of collection	Insect stage	Insect sex	454 sequencing ¹	PCR amplification tests ²	Population polymorphism analysis ³
Invaded	Belgium	Lochristi	51°5'37"N; 3°50'15"E	2015	Adult	F	1	–	–
	Czech Republic	Brno	49°12'44"N; 16°36'53"E	2016	Larvae	–	–	–	30
	France	Barjenville	48°24'38"N; 1°28'39"E	2015	Adult	M	1	–	–
	France	Orléans	47°54'21"N; 1°57'53"E	2015	Adult	M	1	2	–
	France	Lagnes	43°53'38"N; 5°6'31"E	2015	Adult	M	1	2	–
	Georgia	Zugdidi	42°30'46"N; 41°52'26"E	2015	Larvae	–	1	–	–
	Germany	Lorsch	49°38'58"N; 8°33'54"E	2014	Adult	F	1	–	–
	Serbia	Belgrade	44°47'18"N; 20°27'38"E	2015	Larvae	–	1	–	–
	Turkey	Istanbul	41°0'40"N; 28°59'0"E	2015	Larvae	–	–	–	30
	China	Lu'an	NA	2015	Adult	M	1	1	–
Native	China	Jinan	36°38'27"N; 117°7'12"E	2012	Adult	F	1	–	–
	China	Linyi	NA	2015	Adult	M	1	–	–
	China	Linyi	NA	2015	Adult	M	1	1	–
	China	Taian	36°11'18"N; 117°5'14"E	2012	Adult	M	1	–	–
	China	Lijiang	26°54'22"N; 100°13'28"E	2016	Larvae	–	–	–	29
	China	Fuyang	30°0'12"N; 119°47'59"E	2015	Larvae	–	1	1	23
	China	Fuyang	30°0'12"N; 119°47'59"E	2015–2016	Adult	M/F	–	–	7
	China	Hangzhou	30°15'35"N; 120°9'15"E	2012	Adult	F	1	–	–
	South Korea	Seoul	37°26'3"N; 126°58'43"E	2012	Larvae	–	1	1	–

Information for each sample includes insect stage; Insect sex when known; ¹Number of individuals (n = 15) used for biotin-enrichment and 454 pyrosequencing steps; ²Number of individuals (n = 8) used to test PCR amplification on an agarose gel of the 40 primer set selected; ³Number of individuals used for screening for polymorphism, testing HW equilibrium, LD and null allele frequency.

unlikely to provide a clear amplification pattern. Then, a selection of sequences with target microsatellites were used to design primer sets using BLAST, ClustalW and Primer3 programmes. Among 4,243 sequences containing a microsatellite motif, 336 primer sets were designed using this software.

A total of 40 candidate primer sets with both an expected size between 90–110 bp, 150–200 bp or 250–300 bp and at least 7 or more repetitions of the microsatellite motif were assessed for amplification performance in 8 individuals of *C. perspectalis* from native and invaded ranges. A total of 15 primer sets were

Table 2. Description of the fifteen microsatellite loci developed for *Cydalima perspectalis*.

Locus	Primer sequence (5'–3')	GenBank	Repeat motif	Set	Ta	Dye	Na	Allele size range
BTM01	F: AGTTGTGGAGATCCATGCAA R: ATTTAATCACTGCGCGTTCA	MH151896	(GA) ₈	1	58	6-FAM	2	83–85
BTM06	F: GTCCAGGTGGCTTTGTGTTT R: TCAATAAAATTCTGACCGCAA	MH151897	(AG) ₈	1	58	NED	4	87–93
BTM09	F: CATGAGCGGGTCTTAGCATT R: TGAAGGCCGTATTACCGTT	MH151898	(AG) ₇	2	59	6-FAM	10	89–111
BTM13	F: AACCTTATGACGGATCCAAAA R: GGGGACCTTGCTTCTCTACC	MH151899	(GA) ₈	2	59	NED	5	93–113
BTM15	F: CTAGGCCAGATATGCCGAAA R: CGCACCGTGACTATTGCT	MH151900	(GA) ₇	2	59	VIC	4	146–152
BTM16	F: CATTATACGAGCAGGCGCAG R: AGAACGTTAGGCAGATGTTCA	MH151901	(AT) ₇	3	61	6-FAM	9	143–159
BTM20	F: TTTGATTAGTTTAGAATTGGTCAGTTT R: CCGTCTCAGCGTTTACACA	MH151902	(GT) ₁₀	1	58	VIC	10	153–175
BTM22	F: CCTGTGTAAACGATACCCCTG R: CCGTTTACTCCATTAGCGA	MH151903	(TC) ₇	2	59	PET	3	164–167
BTM23	F: AATGGGAATTCGTCGCTCACT R: AACACCAACCACACAGCAA	MH151904	(GTT) ₁₃	1	58	6-FAM	12	150–195
BTM27	F: AACCTCTAGAAACCGCTCAGT R: GTTTGAGCGGAGCTTGTAACC	MH151905	(TG) ₁₁	1	58	NED	7	167–179
BTM28	F: CGGGGATTATAGGCGTGAT R: CCCTTAATGCATCTCGAAACA	MH151906	(TATG) ₁₃	3	61	VIC	4	151–179
BTM34	F: TCCCCATATGATTTTCATTTGTTT R: CATTTGGAAATTCATTACGCA	MH151907	(TC) ₇	2	59	6-FAM	4	240–248
BTM35	F: GACCCTATGCCCACTGCTA R: ACTGCCGATTATCTGCCTCA	MH151908	(AG) ₉	2	59	NED	4	234–260
BTM36	F: TAAACTCCCACGCTAATGGG R: TGGCAAAGGTCCATGACATA	MH151909	(AC) ₁₄	1	58	PET	9	257–273
BTM40	F: TCAGCGGTTTAAAGTTCCAG R: CTCCACAACCGACTTAACCG	MH151910	(AGT) ₈	2	59	VIC	10	263–329

Information presented includes primer sequence, GenBank accession number, Repeat motif, Multiplex PCR set, Annealing temperatures in °C (Ta), Fluorescent dye colour, Number of observed alleles (Na), and Allele size range.

Table 3. Polymorphism characterization of 15 microsatellite loci of two native populations of *Cydalima perspectalis* (Fuyang & Lijiang, China) and two invasive populations (Brno, Czech Republic and Istanbul, Turkey).

Locus	Fuyang (n = 30)					Lijiang (n = 29)					Brno (n = 30)					Istanbul (n = 30)				
	Na	Ho	He	P-value	f	Na	Ho	He	P-value	f	Na	Ho	He	P-value	f	Na	Ho	He	P-value	f
BTM01	2	0.000	0.127	0.0009	0.170	1	–	–	–	0.001	1	–	–	–	0.001	1	–	–	–	0.001
BTM06	3	0.267	0.532	0.0060	0.163	3	0.345	0.518	0.0580	0.106	2	0.233	0.463	0.0125	0.158	2	0.200	0.452	0.0034	0.176
BTM09	10	0.733	0.858	0.0695	0.077	7	0.759	0.819	0.2582	0.029	5	0.700	0.705	0.4368	0.000	4	0.633	0.699	0.6142	0.023
BTM13	3	0.357	0.408	0.2604	0.022	4	0.793	0.624	0.3102	0.000	2	0.103	0.216	0.0320	0.127	2	0.200	0.398	0.0113	0.151
BTM15	4	0.300	0.374	0.1863	0.079	2	0.036	0.275	0.0001	0.219	2	0.233	0.345	0.1006	0.095	4	0.367	0.489	0.1514	0.065
BTM16	7	0.552	0.729	0.0858	0.101	8	0.465	0.753	0.0019	0.159	3	0.300	0.332	0.2145	0.005	4	0.367	0.585	0.0017	0.155
BTM20	8	0.700	0.764	0.2450	0.037	7	0.793	0.753	0.1774	0.000	6	0.733	0.686	1.0000	0.000	7	0.400	0.534	0.0402	0.096
BTM22	2	0.033	0.210	0.0006	0.188	3	0.125	0.191	0.2047	0.137	2	0.034	0.313	0.0000	0.237	2	0.172	0.267	0.1051	0.096
BTM23	6	0.900	0.775	0.7037	0.000	7	0.517	0.658	0.0054	0.119	4	0.759	0.681	0.6327	0.000	7	0.759	0.754	0.6382	0.000
BTM27	7	0.733	0.801	0.5650	0.010	6	0.643	0.736	0.0564	0.032	5	0.733	0.767	0.9152	0.000	5	0.633	0.668	0.0848	0.008
BTM28	4	0.200	0.273	0.0163	0.079	2	0.071	0.070	1.0000	0.000	2	0.067	0.066	1.0000	0.000	2	0.100	0.097	1.0000	0.000
BTM34	1	–	–	–	0.001	4	0.286	0.377	0.1515	0.066	1	–	–	–	0.001	1	–	–	–	0.001
BTM35	3	0.633	0.508	0.3250	0.000	3	0.215	0.314	0.0695	0.105	1	–	–	–	0.001	2	0.433	0.413	1.0000	0.000
BTM36	7	0.467	0.678	0.0034	0.110	6	0.560	0.735	0.0017	0.081	5	0.700	0.746	0.5158	0.000	4	0.733	0.743	0.8144	0.006
BTM40	8	0.800	0.738	0.3599	0.000	5	0.539	0.772	0.0156	0.128	4	0.379	0.467	0.1249	0.084	7	0.567	0.519	0.6948	0.000

Information for each population presented includes Number of observed alleles (Na); Observed heterozygosity (Ho); Expected heterozygosity (He); and Null allele frequency (f). P-value of the deviation from Hardy-Weinberg proportion (HW) provided (without Bonferroni correction).

selected and microsatellite forward primers were labelled using fluorescent dyes NED, 6-FAM, PET and VIC (Applied Biosystems, Renfrewshire, UK) to allow for PCR product multiplexing (Table 2). PCR amplifications were done in a total volume of 10 µL using the Multiplex PCR Kit (Qiagen®). Thermocycling was carried out in a Veriti® 96 well fast thermal cycler (Applied Biosystems®) and the following protocol: initial denaturation step of 94°C for 15 min followed by 40 amplification cycles of 94°C for 30 s, 58–61°C for 45 s, 72°C for 30 s and a final elongation step at 72°C for 30 min. Fragments were run on an ABI Prism 3500 sequencer. Raw data for each fluorescent DNA product were visualized using GeneMapper v. 4.1 (Applied Biosystems®) and allele sizes were scored against an internal GenScan-600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems®).

The fifteen microsatellite markers were characterized using 4 populations (29–30 individuals each): 2 populations sampled in the two distant parts of the native range of the box tree moth in China (southwestern China – Lijiang and southeastern China – Fuyang) and 2 populations sampled in two distant parts in the area presently invaded in Europe and Asia Minor (Czech Republic – Brno and Turkey – Istanbul; Table 1). Observed and expected heterozygosity, deviation from Hardy-Weinberg proportion (HW) and Linkage Disequilibrium (LD) were calculated using Arlequin v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), and the conservative correction of Bonferroni was not applied. The presence of null alleles was checked using FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

The total number of alleles ranged from 2 to 12 (Table 2). Two loci (BTM01 and BTM34) were found to be monomorphic in the invading populations studied (Table 3) whereas in the native populations BTM01 was monomorphic for those at Lijiang and BTM34 monomorphic for those at Fuyang. Observed and expected heterozygosity ranged from 0.000 to 0.900 and 0.066 to 0.858, respectively. Global expected heterozygosity H_e was 0.518 at Fuyang, 0.519 at Lijiang, 0.386 at Brno and 0.441 at Istanbul. Significant departures from HW proportion were detected for different markers in the four populations sampled. Nevertheless, no primer pair significantly deviated from HW in the four populations. LD results showed that only one pair (BTM13–BTM15) was linked in the populations from Fuyang, Brno and Istanbul. The other microsatellite markers did not show significant LD in

the four populations. Null allele frequency ranged from 0.000 to 0.237. The null allele frequency of six markers was larger than 15% in at least one population (BTM01, BTM06, BTM13, BTM15, BTM16 and BTM22). Presence of null alleles and HW disequilibrium for some loci was not surprising since it has also been observed in microsatellite sets developed for other lepidopteran species (Kim et al., 2008; Sinama et al., 2011; Lebigre et al., 2015). Moreover, a part of the HW disequilibrium recorded for BTM01, BTM06, BTM13, BTM15, BTM16 and BTM22 loci in no more than three of the four populations studied could be explained by the presence of null alleles, sex-linked loci or population demography history.

For further genetic analyses on *C. perspectalis*, sex-linked disequilibrium still needs to be investigated since we did not have enough adults in the genotyped populations to test for it. In addition, BTM01 loci characteristics will need to be tested in other populations to determine the utility of this marker because this primer was found to be monomorphic in three of the four populations studied, and significantly deviated from HWE and there was a high null allele frequency in the Fuyang population. Moreover, LD, especially in the native area, needs to be more investigated for the BTM13 and BTM15 markers. Nevertheless, these first microsatellite markers available for *C. perspectalis* are promising molecular tools for further analysing the invasion routes of this highly invasive pest and disentangling the dispersal patterns that could explain its very fast spread in Europe and the Caucasus region.

ACKNOWLEDGEMENTS. We would like to acknowledge C. Kerdelluë for her advices and H. Li, M. Kenis, A. Herz, E. Morel, L. Van Remoortere and M. Glavendekić for help with collecting the insects. This research was supported by the project INCA (“Invasion fulgurante de la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* en Région Centre Val de Loire”) financed by the French Region Centre Val-de-Loire (project INCA APR IR 2015-0009673). We also would like to acknowledge two anonymous reviewers for their comments on the manuscript and F. Marec for his helpful editorial comments.

REFERENCES

CASTEELS H., WITTERS J., VANDIERENDONCK S., VAN REMOORTERE L. & GOOSSENS F. 2011: First report of *Cydalima perspectalis*.

- lis (Lepidoptera: Crambidae) in Belgium. In Vandekerhove B. (ed.): *Proceedings of the 63rd International Symposium on Crop Protection, Gent, May 24, 2011. Vol. 2. — Comm. Appl. Biol. Sci. (Ghent)* 76: 151–155.
- CHAPUIS M.-P. & ESTOUP A. 2007: Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. — *Mol. Biol. Evol.* 24: 621–631.
- ESTOUP A. & GUILLEMAUD T. 2010: Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? — *Mol. Ecol.* 19: 4113–4130.
- EXCOFFIER L. & LISCHER H.E.L. 2010: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. — *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564–567.
- FRAIMOUT A., DEBAT V., FELLOUS S., HUFBAUER R.A., FOUCAUD J., PUDLO P., MARIN J.-M., PRICE D.K., CATTEL J., CHEN X. ET AL. 2017: Deciphering the routes of invasion of *Drosophila suzukii* by means of ABC random forest. — *Mol. Biol. Evol.* 34: 980–996.
- KENIS M., NACAMBO S., LEUTHARDT F., DI DOMENICO F. & HAYE T. 2013: The box tree moth *Cydalima perspectalis*, in Europe: Horticultural pest or environmental disaster? — *Aliens* 33: 38–41.
- KIM K.S., COATES B.S., HELLMICH R.L., SUMERFORD D.V. & SAPPINGTON T.W. 2008: Isolation and characterization of microsatellite loci from the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Crambidae). — *Mol. Ecol. Resour.* 8: 409–411.
- KRÜGER E.O. 2008: *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) – new for the European fauna (Lepidoptera: Crambidae). — *Entomol. Z. Mit. Insekten-Börse* 118: 81–83 [in German with English abstr.].
- LEBIGRE C., TURLURE C. & SCHTICKZELLE N. 2015: Characterisation of sixteen additional polymorphic microsatellite loci for the spreading but locally rare European butterfly, *Brenthis ino* (Lepidoptera: Nymphalidae). — *Eur. J. Entomol.* 112: 389–392.
- LOMBAERT E., GUILLEMAUD T., CORNUET J.-M., MALAUSA T., FACON B. & ESTOUP A. 2010: Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. — *PLoS ONE* 5: e9743, 7 pp.
- MALAUSA T., GILLES A., MEGLÉCZ E., BLANQUART H., DUTHOY S., COSTEDOAT C., DUBUT V., PECH N., CASTAGNONE-SERENO P., DELYE C. ET AL. 2011: High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. — *Mol. Ecol. Resour.* 11: 638–644.
- MATOŠEVIĆ D. 2013: Box tree moth (*Cydalima perspectalis*, Lepidoptera: Crambidae), new invasive insect pest in Croatia. — *SEEFOR South-East Eur. For.* 4: 89–94.
- MEGLÉCZ E., COSTEDOAT C., DUBUT V., GILLES A., MALAUSA T., PECH N. & MARTIN J.-F. 2010: QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. — *Bioinformatics* 26: 403–404.
- SINAMA M., DUBUT V., COSTEDOAT C., GILLES A., JUNKER M., MALAUSA T., MARTIN J.-F., NEVE G., PECH N., SCHMITT T. ET AL. 2011: Challenges of microsatellite development in Lepidoptera: *Euphydryas aurinia* (Nymphalidae) as a case study. — *Eur. J. Entomol.* 108: 261–266.
- WAN H., HAYE T., KENIS M., NACAMBO S., XU H., ZHANG F. & LI H. 2014: Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe? — *J. Appl. Entomol.* 138: 14–26.

Received February 2, 2018; revised and accepted May 16, 2018

Published online June 6, 2018

4.2 Les nouvelles analyses statistiques de type ABC et ABC-RF pour définir les scénarios d'invasion et de dispersion

4.2.1 Principe de l'ABC

L'*Approximate Bayesian Computation*, ou ABC (Beaumont et al. 2002), est une méthode statistique permettant de simuler un large nombre de jeux de données sous une hypothèse de scénario « d'évolution ». Elle est utilisée dans différents domaines de l'écologie pour comprendre, par exemple, les processus d'évolutions ou encore les routes d'invasion d'espèces (Bertorelle et al. 2010, Beaumont 2010). L'ABC est utilisée pour estimer de nombreux paramètres démographiques des populations comme la taille efficace d'une population, la datation d'événements démographiques passés, ou la vitesse de propagation d'un pathogène (Bertorelle et al. 2010). Cette méthode permet d'inclure des données historiques, génétiques et démographiques mais aussi des populations non-échantillonnées pour tester différents modèles (ou scénarios) d'évolution voire d'introductions dans le cas d'espèces envahissantes (Beaumont et al. 2002, Bertorelle et al. 2010). Ainsi, les logiciels d'ABC peuvent être utilisés pour tenter de démêler des scénarios complexes d'invasion impliquant plusieurs introductions ou des événements d'*admixture* et permettent de distinguer statistiquement quel scénario serait le plus probable (Guillemaud et al. 2010, Estoup et al. 2016). Les logiciels d'ABC comme DIYABC permettent d'utiliser différents types de marqueurs comme des séquences de l'ADN mitochondrial, des SNP ou encore des microsatellites (Cornuet et al. 2008, 2014).

Néanmoins, cette méthode présente des contraintes comme le temps de calcul qui limite le nombre de populations pouvant être analysées simultanément, le côté subjectif du choix des scénarios et des paramètres du modèle (Estoup et al. 2012) ou encore la nécessité d'utiliser des populations d'une vingtaine d'individus *a minima* (Guillemaud et al. 2010). L'utilisateur doit également garder à l'esprit que la méthode permet de définir un modèle ou scénario **probable**. Plusieurs scénarios peuvent expliquer le jeu de données réel, et la méthode ne pouvant être exhaustive, chaque scénario est fondamentalement faux (Csilléry et al. 2010).

4.2.2 Les différentes étapes

L'ABC se découpe en plusieurs étapes (Figure 11) allant de la définition du modèle (ou des modèles à tester) à la sélection du meilleur modèle ou scénario dans le cas des invasions biologiques. Pour pouvoir définir les différents scénarios à tester, il faut avoir au préalable décrit la diversité et la structure génétique des populations considérées à l'aide d'une approche phylogéographique avec un marqueur mitochondrial et/ou des marqueurs nucléaires comme les microsatellites. Dans les reconstructions des routes d'invasion, les méthodes bayésiennes de clustering avec des marqueurs multilocus sont largement utilisées pour estimer la structure des populations (Putman & Carbone 2014), les zones sources potentielles et l'historique de l'invasion

(Lombaert et al. 2014). Ces méthodes sont implantées dans un certain nombre de logiciels comme STRUCTURE (Lombaert et al. 2018), BAPS ou encore Geneland (Putman & Carbone 2014). Elles permettent de caractériser la diversité et la structuration génétique des populations et de formuler des hypothèses sur les scénarios d'introduction et de dispersion. Cette étape préliminaire est importante car elle permet de caricaturer l'histoire évolutive de l'espèce dans sa zone native. En caricaturant la zone d'origine, cela permet de ne considérer qu'une population par zone génétiquement différente à utiliser dans les scénarios d'ABC. Minimiser le nombre de populations utilisées diminue ainsi le nombre de scénarios potentiels et donc le nombre de simulations nécessaires pour estimer le meilleur scénario (Estoup & Guillemaud 2010). Cela permet aussi de maximiser la présence de populations informatives et d'apporter un poids statistique plus fort au meilleur scénario. Cette approche « caricaturale » peut aussi être utilisée dans la zone d'introduction, même si les populations testées en ABC sont souvent choisies en fonction des données historiques obtenues. Pour augmenter la robustesse des scénarios testés, des populations alternatives peuvent être choisies dans les mêmes groupes génétiques identifiés avec les méthodes bayésiennes de clustering (Lombaert et al. 2014).

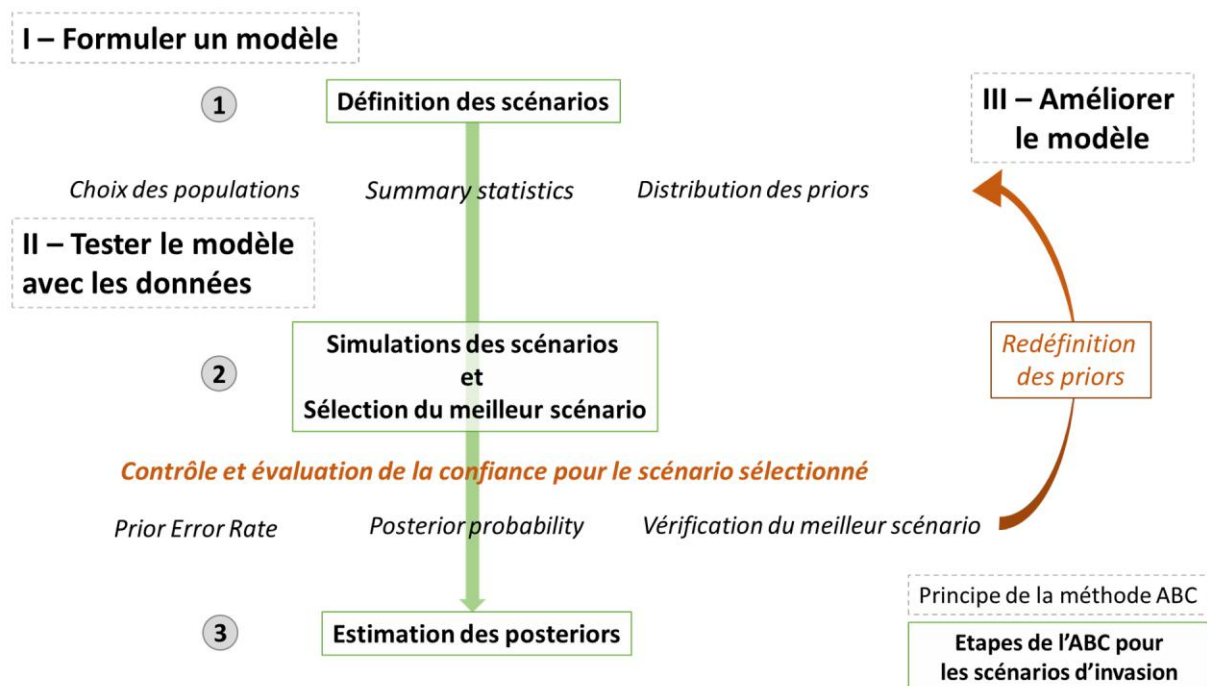


Figure 11. Les différentes étapes de l'Approximate Bayesian Computation (ABC) dans le cas de reconstruction des routes d'invasion, d'après Csilléry et al. (2010) et Bertorelle et al. (2010).

Encadré n°1: *Le petit glossaire de l'ABC*

- **Distribution des paramètres d'entrées (*priors*)** : Distribution de la valeur des différents paramètres (*e.g.* historique, démographique), définie avant les analyses ABC, et qui permet la simulation des jeux de données.
- **Distribution des paramètres de sorties (*posteriors*)** : Correspond à la distribution des valeurs estimées des paramètres d'entrées utilisée pour simuler les jeux de données.
- **Statistiques résumées (*Summary statistics*)** : Valeurs qui vont résumer chaque jeu de données et qui permettent de décrire les variations génétiques intra et inter-populationnelles (*e.g.* nombre moyen d'allèles par locus, F_{ST} , *Admixture*).
- **Forêt d'arbres décisionnels (*Random Forest*)** : Méthode statistique qui classe les variables explicatives en fonction de leur lien avec la variable à expliquer.
- **Taux d'erreur (*Prior error rate*)** : Valeur représentant la mauvaise classification des scénarios lors de la création des arbres décisionnels et calculée après avoir réutilisé les valeurs non prises en compte lors de la création des arbres de décision.
- **Probabilités postérieures (*Posterior probabilities*)** : Valeur donnant la fiabilité du scénario défini comme étant le meilleur par la méthode de *Random Forest* et calculée à partir des arbres de décision.

Une fois que le choix des populations et des scénarios à tester est fait, on définit les statistiques résumées ou « *summary statistics* » (Encadré 1) et la distribution des « *priors* ». Ils vont permettre d'inclure des données génétiques liées aux populations ainsi que des informations démographiques et historiques connues ou estimées. Ces paramètres seront utilisés pour simuler les jeux de données. Le nombre de jeux de données simulés par scénario est choisi en fonction de la technique d'estimation du meilleur scénario. Si l'utilisateur souhaite définir le meilleur modèle avec la méthode implémentée dans DIYABC, il est alors fortement conseillé de simuler un très grand nombre de jeux de données par scénario (10^6 simulations). Cette méthode est une régression logistique basée sur les jeux de données simulés ayant été conservés (Estoup et al. 2012). A l'inverse, si l'utilisateur souhaite utiliser la méthode de « *Random Forest* » pour définir le meilleur scénario, alors le nombre de jeux de données peut être plus faible (10^4 simulations par scénario ; cf 4.2.4 pour plus de précisions sur cette méthode). L'estimation du meilleur scénario se fait en comparant les jeux de données simulés au jeu de données réel. Le meilleur scénario correspond alors à celui qui est le plus proche du jeu de données réel. Il existe différentes méthodes pour évaluer la confiance qu'on peut avoir dans le meilleur scénario, dont la comparaison de la distribution des paramètres simulés avec les paramètres réels du jeu de données. L'étape de vérification et de calcul des intervalles de confiance est importante car elle permet de donner un poids statistique et de la robustesse au scénario choisi. Il est possible que le meilleur scénario ne soit pas représentatif du jeu de données réel. On retourne alors à l'étape 1

afin de vérifier la distribution des *priors* et des *summary statistics* et d'améliorer le scénario pour obtenir un modèle plus proche du jeu de données réel.

4.2.3 L'ABC dans l'inférence des routes d'invasion

Depuis une décennie, l'ABC est couramment utilisée dans la reconstruction des routes d'invasion (Guillemaud et al. 2010, Benazzo et al. 2015) pour de nombreux organismes (*e.g.* Rijal et al. 2015, van Boheemen et al. 2017, Lippens et al. 2017) dont les insectes (*e.g.* Boubou et al. 2012, Valentin et al. 2017, Dittrich-Schröder et al. 2018). Dans le cas, désormais bien connu, de la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis*, l'utilisation de cette méthode a non seulement mis en évidence un phénomène tête de pont (Lombaert et al. 2010) mais a également révélé l'existence d'introductions multiples depuis la zone d'origine ainsi que des phénomènes d'*admixture* parmi les populations envahissantes (Lombaert et al. 2010, Lombaert et al. 2014). Plus récemment, cette méthode a suggéré que l'invasion du frelon asiatique *Vespa velutina* en Europe serait due à l'introduction en France d'un très faible nombre de femelles, voire d'une seule femelle fécondée par plusieurs mâles (Arca et al. 2015). Elle a également permis de souligner, à l'échelle du globe, la complexité des routes d'invasion de la mouche des fruits *Drosophila suzukii*. En effet, il est vraisemblable que cette invasion cumule différentes populations ayant servi de source, des introductions multiples, un phénomène tête de pont, ainsi que l'existence très probable d'*admixture* dans certaines populations envahissantes (Fraimout et al. 2017). Dans le cas de l'Ambrosie à feuilles d'armoïse *Ambrosia artemisiifolia*, van Boheemen et al. (2017) ont montré que les populations introduites résultent d'un phénomène d'*admixture* entre 2 populations de la zone native.

4.2.4 L'apport de l'ABC-RF dans la compréhension des routes d'invasion

Depuis peu, une nouvelle méthode d'analyse des jeux de données simulés par l'ABC a été développée pour estimer le meilleur scénario et se base sur la méthode statistique dite de *Random Forest* (Pudlo et al. 2016). C'est une méthode de « *machine learning* » permettant de prendre en compte de manière aléatoire toutes les valeurs des *summary statistics* simulées avec l'ABC, à partir desquelles des arbres aléatoires sont construits pour définir le scénario le plus probable sans influencer les performances de calcul. Pour construire ces arbres, les *summary statistics* sont tirées aléatoirement par arbre, où chaque branche de l'arbre dépend de la relation entre les données simulées et les statistiques qui les décrivent. La méthode estime ensuite le nombre de fois où chaque scénario ressort et lui attribue un nombre de votes qui correspondent au nombre de fois où le scénario est tiré. Le meilleur scénario est alors celui qui possède le plus de votes. Le « *prior error rate* » et le « *posterior probability* » (Encadré 1) sont calculés par la suite et permettent d'évaluer la robustesse du scénario choisi. Le *prior error rate* donne une estimation du taux d'erreur dans l'attribution du meilleur scénario, c'est-à-dire combien de fois le logiciel a

attribué un vote au mauvais scénario. La valeur est estimée en recréant des arbres de décisions à partir des jeux de données non utilisés pour déterminer le meilleur scénario. A l'inverse, le *posterior probability* donne une valeur de probabilité au meilleur scénario sélectionné.

Le *Random Forest* a été utilisé pour la première fois pour le traçage des routes de l'invasion complexe de la mouche des fruits *Drosophila suzukii* (Fraimout et al., 2017), évoquée plus haut (cf 4.2.3), et a été récemment utilisé pour celles de l'Ambroisie à feuilles d'armoise *Ambrosia artemisiifolia* (van Boheemen et al. 2017). Le *Random Forest* permet de pallier deux problèmes liés aux analyses ABC (Pudlo et al. 2016) : (i) devoir sélectionner une partie des *summary statistics* à utiliser pour les analyses et (ii) les problèmes de temps de calcul dus au grand nombre de jeux de données simulés par scénario (Estoup et al. 2012). Néanmoins, l'utilisation de l'ABC *Random Forest* dans la définition des scénarios d'invasion d'espèces envahissantes est encore récente et par conséquent, ses limites sont encore peu connues.

4.3 Identification des routes d'invasion de la pyrale du buis

Contexte de l'étude

La reconstruction des routes d'invasion à l'aide de l'ABC pour des insectes présentant une invasion fulgurante a montré la complexité des invasions récentes (Lombaert et al. 2010, Lombaert et al. 2014, Lesieur et al. 2018). La première approche génétique réalisée avec le marqueur mitochondrial n'ayant pas permis d'affiner les routes utilisées par *C. perspectalis* en Europe, j'ai utilisé des marqueurs microsatellites plus polymorphes, couplés à une approche ABC pour confirmer l'hypothèse (i) d'une origine de l'Est de la Chine comme suggérée par les résultats de la phylogéographie, (ii) d'une introduction multiple depuis la Chine et (iii) d'un phénomène tête de pont lié au commerce de plantes d'ornement à l'intérieur de l'Europe.

Echantillonnage

L'utilisation de marqueurs microsatellites nécessite un échantillonnage géographiquement moins large mais avec un effort plus important pour chaque population (de 20 à 30 individus). L'échantillonnage de cette étude s'est basé tout d'abord sur celui réalisé pour l'*Article I* lorsque le nombre d'individus collectés par population était suffisant. Ainsi, j'ai utilisé 13 des 20 populations chinoises échantillonnées pour l'*Article I* et 20 des 72 populations envahissantes. L'échantillonnage a été complété par 4 populations envahissantes dont les chenilles ont été prélevées dans la mesure du possible sur plusieurs pieds de buis pour minimiser la consanguinité.

Dans la zone d'origine, j'ai été confrontée aux mêmes problèmes d'échantillonnage que pour l'*Article I*. Les collectes proviennent ainsi de milieux urbains et ont été infructueuses au Japon et dans les provinces du Guangxi, du Guangdong et à Hong Kong. De plus, les provinces de la

Mongolie intérieure (Nei Mongol) et du Fujian (Figure 7 - **Chapitre 2**) n'ont pas été couvertes en raison du faible nombre d'individus collectés. La couverture de l'échantillonnage incluait *a minima* les trois zones géographique suggérées par l'approche phylogéographique. Au final, une province coréenne et 10 provinces chinoises, incluant 3 provinces productrices de buis, ont été échantillonnées, et 13 populations ont été génotypées.

Dans la zone d'introduction, les collègues de l'URZF et moi-même sommes tout d'abord allés collecter des chenilles dans les premiers foyers de 2007 (Giessen, Weil Am Rhein et Kehl) pour avoir le maximum de chance d'obtenir des populations représentatives de la diversité génétique introduite. Nous avons également fait un effort d'échantillonnage dans les pays leaders du commerce ornemental à l'échelle européenne (Pays-Bas, Allemagne, Italie, France). Au total, 12 pays (et 24 populations) ont été échantillonnés couvrant à la fois (i) la zone envahie au niveau spatial et (ii) les localités de premières observations en Europe et en Asie Mineure au niveau temporel (de 2007 à 2015).

Résultats majeurs

La présence d'une structuration génétique au sein de l'aire d'origine (*Article 1*) a été confirmée. L'analyse des données microsatellites de la zone d'origine avec le logiciel STRUCTURE a montré une séparation de la Corée du Sud, de la Chine de l'Est et la Chine du Sud-Ouest. Elle suggère également la présence d'*admixture* au sein de la Chine de l'Est. Les populations de cette zone géographique pourraient être issues de mélanges entre des populations locales et des populations d'une zone géographique non échantillonnée ou bien du mélange entre populations de 2 zones géographiques non échantillonnées (*e.g.* Sud Est et Centre de la Chine). Ces résultats sont en accord avec la co-occurrence des haplogroupes dans l'Est chinois observée dans l'*Article 1*.

L'étude des routes d'invasion avec la méthode d'ABC a permis d'écarter la Corée du Sud, le Sud-Ouest de la Chine et le Japon comme sources probables des populations envahissantes. Les résultats sont également en faveur de l'Est chinois comme zone d'origine probable pour ces populations. Les résultats ont permis d'avancer l'hypothèse de deux introductions indépendantes depuis l'Est de la Chine vers les deux premiers foyers d'Allemagne de 2007 (Krüger 2008). Au sein de l'Europe, les résultats ABC tendent à montrer plusieurs phénomènes tête de pont depuis des pays leaders du commerce de plantes d'ornement : d'abord à partir du premier foyer allemand de Weil Am Rhein puis à partir des Pays-Bas et de l'Italie. L'implication d'autres populations que les premiers foyers allemands et hollandais de 2007 comme têtes de pont a été plus difficile à interpréter, car les votes obtenus avec l'ABC *Random Forest* ne permettaient pas de différencier clairement les meilleurs scénarios (votes de 2 ou 3 modèles souvent proches). Il est possible que le nombre d'individus introduits soit élevé quelle que soit la population considérée (premiers foyers ou foyers secondaires), ce qui a pu favoriser l'établissement et la dispersion de l'insecte en Europe, mais complexifier l'estimation du meilleur scénario (Estoup & Guillemaud 2010). De plus,

le transport de plantes et la complexité du commerce d'ornement entre les pays européens a pu donner lieu à un brassage des populations (Dehnen-Schmutz et al. 2010, Pautasso & Jeger 2014).

Nos résultats ont montré toute la complexité des phénomènes d'introduction de ce type d'insectes en lien avec les circuits commerciaux, où même un échantillonnage conséquent ne permet pas toujours de bien définir les scénarios de dispersion de l'insecte en Europe.

Article III

The fast invasion of the box tree moth in Europe: Multiple introduction events coupled with a bridgehead phenomenon.

Bras A., Lombaert E., Kenis M., Li H., Bernard A., Roques A., Rousselet J., Auger-Rozenberg M-A.

Molecular Ecology (en préparation)

**The fast invasion of the box tree moth in Europe:
Multiple introduction events coupled with a bridgehead phenomenon**

¹Audrey Bras, ²Eric Lombaert, ³Marc Kenis, ⁴Hongmei Li, ¹Alexis Bernard, ¹Alain Roques, ¹Jérôme Rousselet, ¹Marie-Anne Auger-Rozenberg.

¹INRA, UR633 Unité de Recherche de Zoologie Forestière, 2163 Avenue de la Pomme de Pin, CS 40001 ARDON 45075 ORLEANS Cedex 2, France;

²INRA, CNRS, Université Côte d'Azur, ISA, Paris, France;

³CABI, Delémont, Switzerland;

⁴MoA-CABI Joint Laboratory for Biosafety, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing, China,

Corresponding author : Audrey Bras, audreyb061992@gmail.com

Abstract

Identifying the invasion routes followed by non-native species introduced to other continents is required to understand the invasion process and to adjust management strategies. The box tree moth, *Cydalima perspectalis*, is an Asian insect recently introduced accidentally to Europe along with the ornamental plant trade. In less than ten years, it has colonized most of Europe until Asia Minor, threatening *Buxus* shrubs in urban as well as forest areas. In order to investigate its invasion routes, moth populations were sampled in both the native and invaded range, and their genetic diversity and structure was compared using microsatellite markers. Approximate Bayesian Computations suggested complex invasion pathways with probably two independent introduction events from Eastern China to Germany. Results also shed light on a possible bridgehead effect, which may have involved at least three primary invasive moth populations in Europe as sources for other populations invasive in Europe. The bridgehead populations were suggested to be those observed in the countries dominating the trade of ornamental plants in Europe; i.e., Germany, the Netherlands and Italy. An admixture event was also suggested in Hungary. All these invasion processes have probably played a key role in the fast expansion of the moth across Europe and Asia Minor. This study illustrates the putative role played by the ornamental plant trade in the moth introductions from China to Europe but also in its dispersal within the invaded range. Moreover, our results highlight the complexity of inferring the dispersal of non-native species using ABC analyses when this process involved human-mediated dispersal and when few historical information are available.

Key words : *Cydalima perspectalis*, Approximate Bayesian computation, multiple introductions, bridgehead effect, ornamental plant trade

Introduction

Human activities are well known to allow species transportation and introduction throughout the world (Blackburn et al., 2011; Brockerhoff & Liebhold, 2017; Essl et al., 2015). Nevertheless, the rate of non-native insect species introduced beyond their native range is still increasing in Europe with no signs of saturation observed in their establishment (Seebens et al., 2017). Moreover, once established most of the non-native insect having entered Europe since the 1990s spread faster than before across the continent. The economic changes related to the liberalization of trade and travel in Europe, and the subsequent dismantling of custom checkpoints within the European Union (EU), have facilitated trade, especially of ornamental plants, but may also have simultaneously facilitated the dispersal of non-native species across Europe (Roques et al., 2016). Understanding the invasive pathways and evolutionary histories of non-native insect species is required to apprehend the drivers of invasion process (Allendorf & Lundquist, 2003; Bock et al., 2015) and to adopt appropriate management strategies (Essl et al., 2015; Sakai et al., 2001).

Human-mediated invasions often involve complex invasion pathways (Garnas et al., 2016; Meurisse et al., 2018). Collecting data on the biology and ecology of non-native species, their dates of first record in the invaded areas as well as the possible interception records at borders and the associated commodities is useful to understand the invasive pathways (Brockerhoff & Liebhold, 2017; Essl et al., 2015). However, such data can be misleading, sparse, incomplete or missing, leading to difficulties in tracing the invasion history of non-native species. When historical information are missing, molecular resources may help to supplement interception and trapping data and to disentangle invasive pathways (Estoup & Guillemaud, 2010; Lawson et al., 2011). Microsatellite markers are powerful tools presenting a high polymorphism allowing to estimate relatedness between individuals and to describe demography and history of populations at a smaller evolutionary scale than mitochondrial DNA (Selkoe & Toonen, 2006). They can provide evidence for common events happening during biological invasion such as bottlenecks, multiple introductions or admixture events (Bock et al., 2015; Dlugosch et al., 2015; Estoup & Guillemaud, 2010; Lawson et al., 2011). They can also be useful to highlight a bridgehead effect, which corresponds to a primary invasive population serving as source for secondary invasive populations (Lawson et al., 2011; Lombaert et al., 2010). Nevertheless, inferring invasion routes is not always straightforward with molecular data due to a lack of appropriate methods as shown in different studies (Cristescu, 2015; Guillemaud et al., 2010). Recently, Approximate Bayesian Computation (ABC) has proven to be particularly effective in dealing with complex scenarios. It is a powerful tool combining the use of simulated datasets and summary statistics (Beaumont, 2010; Beaumont et al., 2002; Bertorelle et al., 2010; Csilléry et al., 2010), and it fits particularly well the study of non-native species (e.g. Fraimout et al., 2017; Lesieur et al., 2018; Lippens et al., 2017; Lombaert et al., 2010; van Boheemen et al., 2017). Indeed, for recent invasive populations, geographical and historical information can be used to define precisely several competing scenarios in order to infer route(s) of introduction(s) and the number of introduction events (Estoup & Guillemaud, 2010). Besides, the ABC method makes it possible to manage large dataset and to estimate demographic,

historic and genetic parameters (Guillemaud et al., 2010). Thus, such as a method was used to suggest possible invasive for some of the recently arrived non-native insects having shown a fast spread across Europe such as the Harlequin ladybeetle, *Harmonia axyridis* (Lombaert et al., 2010, 2014), the fruit fly *Drosophila suzukii* (Fraimout et al., 2017) and the North American seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Lesieur et al., 2018). In all of these case studies, complexity in invasion and subsequent dispersal processes were spotted, involving multiple introductions, admixture and bridgehead effect. Nevertheless, these cases are still scarce, especially for insects associated to the ornamental plant trade, one of the major pathways for non-native insects nowadays (Eschen et al., 2017; Kenis et al., 2007; Liebhold et al., 2016; Roques, 2010).

The box tree moth (BTM), *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae), is an insect species native of China, Japan and Korea (Kim & Park, 2013; Maruyama & Shinkaji, 1987; Xiao et al., 2011) which has colonized Europe and Asia Minor in less than ten years. It is a multivoltine species presenting between 2 to 4 generations per year in its invaded range (Göttig & Herz, 2017; Nacambo et al., 2014) and its larvae feed specifically on the foliage of *Buxus* spp. (Matošević et al., 2017; Wan et al., 2014). This insect was accidentally introduced from Asia to Europe probably through the trade of ornamental plants (Kenis et al., 2013; Bras et al., XX). BTM was first detected in the German cities of Weil am Rhein and Kehl in 2007 (Krüger, 2008). That same year, invading populations were also recorded in nearby cities of Switzerland (Leuthardt et al., 2010), as well as in nursery areas in the Netherlands (Van der Straten & Muus, 2010). Then, between 2007 and 2010 BTM was successively recorded in several countries of Western Europe, i.e France (Feldtrauer et al., 2009), Belgium (Casteels et al., 2011), Italy (Bella, 2013) and United Kingdom (Salisbury et al., 2012). During the following years, the moth has been observed in Central and South-Eastern Europe (e.g. Croatia, (Koren & Crne, 2012); Hungary, (Sáfián & Horváth, 2011); Greece, (Strachinis et al., 2015); Romania, (Székely et al., 2011)), and Asia Minor (e.g. Turkey, (Hizal et al., 2012); Russia, (Gninenko et al., 2014); Georgia, (Matsiakh et al., 2018)). Nowadays, *C. perspectalis* is present in more than 30 countries (Nacambo et al., 2014; Bras et al., XX), threatening the *Buxus* species native to Europe (Mitchell et al., 2018).

Box trees are widely used as ornamental plants in historical, public and private gardens in Europe, which triggers an important trade (Kenis et al., 2018; Matošević, 2013; EPPO, 2012). At the intercontinental scale, the trade of ornamental box trees between China and Europe has been hypothesized as the insect's introduction route (Casteels et al., 2011; Leuthardt et al., 2010; Nacambo et al., 2014). A preliminary genetic study comparing native and invasive populations of *C. perspectalis* pointed out that the insect was probably introduced several times in Europe from the Eastern part of China (Bras et al., XX). The suspicion of multiple introductions is enhanced by the geographic disconnection of the quite simultaneous first records in 2007 (Krüger, 2008; Leuthardt et al., 2010; Van der Straten & Muus, 2010). Moreover, the genetic structure shown by Bras et al. (XX) in the invaded range also suggested that BTM has spread through Europe likely owing to the ornamental plant trade between European countries (Kenis et al., 2013; Matošević, 2013). Indeed, the moth interception in 2008 in the Netherlands (EPPO, 2012), which is a leader

country in the horticulture industry (Eschen et al., 2017), the occurrence in nurseries of the first records in some invaded countries (Casteels et al., 2011; Salisbury et al., 2012; Van der Straten & Muus, 2010), and the large distances between places of first observations, are in favor of a human-mediated dispersal. Nevertheless, ornamental plant trade into Europe is not easy to trace (Dehnen-Schmutz et al., 2010). Plant genus specific data is not recorded in many countries (Eschen et al., 2017) leading to difficulties in elucidating the roads of the imported and exported *Buxus* trees into Europe. It is also not straightforward to trace invasive routes of pests which are introduced along with the ornamental plant trade, especially for species not included in the EPPO alert list such as BTM (Strachinis et al., 2015).

In this study, we aimed at tracing the invasion routes of *C. perspectalis* into Europe. We assessed the relative contribution of multiple introduction events proposed by Bras et al. (XX) as well as bridgehead phenomenon or admixture events to the successful introduction and fast expansion of *C. perspectalis* across Europe. As genetic methods are a good complement to historical information when these ones are scarce (Estoup & Guillemaud, 2010), we first sampled and genotyped individuals from both the native and invaded range of BTM. In a second step, we used an ABC approach to (i) verify the origin of the invasive populations, (ii) define whether invasive populations were resulting from multiple introduction events from China and (ii) infer the invasion routes and dispersal of this pest across Europe.

Materials and Methods

Sampling

Individuals of *C. perspectalis* were collected in both the native and invasive range between 2012 and 2017 (Table 1). At each site, larvae and pupae were preferentially collected on different *Buxus* trees in order to minimize consanguinity and, when it was not possible, pheromone traps were used to collect adults.

Because the moth is considered in its native range as a pest in urban areas but not in natural *Buxus* forests (Kawazu et al., 2007; Kim & Park, 2013; Nacambo et al., 2014), our prospections in China, South Korea and Japan were mostly carried out in cities. Prospections were unsuccessful in Japan, despite *C. perspectalis* has been recorded in this country (Kawazu et al., 2007; Maruyama & Shinkaji, 1987), and in the southern provinces of Guangdong, Guangxi and Fujian in China, where moth densities were apparently very low. In other parts of China and in South Korea, larvae and pupae were collected in urban areas, except at Fuyang (N-FU, Zhejiang province, China) where they were sampled on *Buxus* shrubs planted in a sentinel plant nursery established at a border between a natural forest and an agricultural land (Kenis et al., 2018). In total, 13 populations were successfully sampled. The collections spanned most of the putative distribution range of *C. perspectalis* with 10 sampled provinces ranging from Northern to Southern China (Supplementary Material Figure S1), including the invasive source suggested by Bras et al. (XX).

In the invaded range, samples were obtained from 13 countries of Europe and Asia Minor. Large sampling efforts were applied in the locations where *C. perspectalis* was first observed in 2007 in Germany, i.e., Weil Am Rhein and Kehl, and in the nearby areas in France (Strasbourg and Saint Louis). Similar efforts were also carried out in other locations of the Netherlands, Italy and France which constitute major countries for import/export of plants for planting (Dehnen-Schmutz et al., 2010; Eschen et al., 2017). Only larvae and pupae were collected, except at Legnaro (I-LE), Italy, where we used adults caught by pheromone traps. All samples were obtained from urban areas except for Bzyb Valley (I-BV) and Mtirala Park (I-MNP) in Georgia, and Solokhaul (I-SO) in Russia where insects were collected in natural forests of *Buxus colchica*. A total of 24 invading populations were thus collected (Supplementary Material Figure S2). All specimens were put in 96% alcohol to preserve DNA and stored at -21°C.

Genotyping

All insect stages were dissected and DNA was extracted from either the thoracic muscles of larvae and pupae or an adult leg for adults using the DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA was diluted with ultrapure water when concentration exceeded 50ng/μL. Fifteen microsatellite markers developed by Bras et al. (2018) were used to genotype individuals from both native and invasive range with the same multiplex PCR sets. PCR amplifications as well as allele scoring were performed following the methodology detailed in Bras et al (2018). Briefly, PCR amplifications were carried out in a total volume of 10 μL including 1μL of DNA using the Multiplex PCR kit (Qiagen®) and thermocycling in a Veriti® 96 well fast thermal cycler (Applied Biosystems, Renfrewshire, UK). PCR products were run on an ABI Prism 3500 sequencer visualized using GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems®). Allele sizes were scored against an internal GenScan-600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystem®). In total, 303 individuals from the native range and 593 from the invasive range were successfully genotyped.

Genetic Analysis

Mean number of allele (A_n), observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), deviation from Hardy-Weinberg proportion (HW) and Linkage Disequilibrium (LD) were calculated using Arlequin v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). The sequential correction of Bonferroni (Rice 1989) for multiple comparisons were applied for both tests. Estimation of null alleles for each locus was computed with FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007). We used FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995) to calculate allelic richness (AR) for each population based on the minimum sample size of 14 individuals. FreeNA software was also used to calculate FST values using the excluding null allele (ENA) correction method. We reconstructed a population-based neighbor-joining tree with Population 1.2.32 (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>) using Cavalli-Sforza and Edwards chord distance. A Discriminant Analysis of Principal Components (DACP) (Jombart et al., 2010) was

carried out as a first exploration of genetic structure with adegenet package (Jombart, 2008) implemented in R software (R Development Core Team, 2008).

To further explore the genetic structure of the dataset and to identify the number of potential genetic clusters, we used the Bayesian clustering approach implemented in STRUCTURE software (Pritchard et al., 2000). Three independent STRUCTURE analyses were performed using (i) the whole dataset, (ii) populations sampled from the native range (East Asia), and (iii) populations sampled from the invaded range (Europe, Asia Minor). Parameters were estimated assuming an admixture model with correlated allele frequencies among populations. For each analysis, a total of 15 replicate runs were performed for each value of the number of cluster (K). Each run comprised 200,000 MCMC iterations burn-in period followed by 1,000,000 iterations. For the global dataset and the invasive dataset, K was set between 1 and 15. For the native dataset of 13 populations, K was set between 1 and 10. The uppermost level of population structure was estimate for each analysis by using the ΔK method (Evanno et al., 2005) implemented in Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2011). The modal result among runs was checked for each K by using the Greedy algorithm in Clumpp (Jakobsson & Rosenberg, 2007) with the online pipeline CLUMPAK (Kopelman et al., 2015). The graphical display of genetic structure were visualized with Distruct v.1.1 (Rosenberg, 2004).

Inferring invasion scenarios by ABC

We used Approximate Bayesian Computation (ABC; Beaumont et al., 2002) with DIYABC v2.1.0 (Cornuet et al., 2008, 2014) to infer the invasion routes of BTM. As ABC scenarios could become complex with hard feasibility to process (Estoup et al., 2012), we used only a part of the whole dataset. The populations considered in the ABC analysis corresponded to the genetic clusters previously identified with STRUCTURE following Lombaert et al. (2014).

In the native range, each genetic cluster was represented by a single site-sample according to the result of the STRUCTURE analysis carried out on the native dataset. Hence, the native range was characterized by three main genetic clusters corresponding to South Korea (Seoul, N-SE), Eastern China (Shanghai, N-SH) and South Western China (Lijiang, N-LIJ). They corresponded to the three areas described by Bras et al. (XX). As we were unable to sample Japan, we added a fourth unsampled population in the ABC analyses. No alternative dataset was conducted within the native range because only one population with more than 15 individuals was obtained for South Korea and South Western China.

In the invaded range, among the whole genotyped populations, we selected 7 of them. To do so, we took into account population geographic position and the historical information (e.g., year of first introduction, data by country on importation values of *Buxus* and plants for planting) in the invaded range. For these reasons, we chose Weil Am Rhein (I-WAR), Strasbourg (I-ST) and Giessen (I-GI) (Van der Straten & Muus, 2010), localities of first observation of BTM in Europe. We also chose Budapest (I-BU) (Gábor Véték pers. comm.) and Lucca (I-LU) which have imported *Buxus*

plants from China (EPPO 2012). Finally, we chose Solokhaul (I-SO) which has imported *Buxus* plants from Italy (Gninenko et al., 2014). We were able to genotype no more than 15 individuals for this population. As low sampling effort could affect negatively the rate of identification of the true scenario (Guillemaud et al., 2010), we followed the methodology proposed by Lombaert et al. (2014) and used an alternative dataset including the closest population, Bzyb Valley (I-BV). The ABC analyses were conducted step by step from the first population recorded in the literature (Weil Am Rhein, I-WAR) to the most recent (Solokhaul, I-SO and Bzyb Valley, I-BV) (Gninenko et al., 2014; Krüger, 2008; Matsiakh et al., 2018). The scenario topologies were based on the dates of first observation.

The ABC analyses considered at first the oldest invasive population recorded in Europe in order to understand introduction's pathways from East Asia. The goal was to (i) verify that Eastern China was the source and (ii) define whether the 3 first European populations recorded in 2007 resulted from a single introduction or from multiple independent introduction events (Table 2). For these analyses, admixture was not included in the scenarios as the three populations were first observed on the same year. Moreover, among these three populations, Weil Am Rhein (I-WAR) and Strasbourg (I-ST) are geographically close and were sampled ten year after the first observation. For these reason, we carried out different ABC analyses with these two populations to verify the accuracy of ABC results and we took into account both the mtDNA results from Bras et al. (XX) and our microsatellites results to define the final ABC analysis. In a second step, we conducted ABC analyses to assess insect dispersal into Europe and to define whether the invasive populations of Lucca (I-LU), Budapest (I-BU) or Solokhaul (I-SO) resulted from introduction directly from China, from an older invasive population or from an admixture event. In total, we conducted 6 ABC analyses to infer invasion routes and we simulated from 4 to 36 scenarios regarding the question asked. For each ABC analysis, all scenarios were supposed to be equally probable. After each ABC analysis, the most likely scenario was used as a basis for subsequent analyses.

In our ABC analyses, we used historical, demographic and mutation parameter values for simulations. Historical parameters were drawn from prior distributions defined from historical data (Table 3). Briefly, the years of introductions of BTM in Europe were drawn from uniform distributions bounded by 2000 and 2007 for the three first populations observed in Europe. Taking into account that *C. perspectalis* presents 2-4 generations in the invaded range, we considered a medium value with one year corresponding to 3 generations. Hence, we translated one year as corresponding to three generations for *C. perspectalis*. The same distribution range (i.e. 7 years) was applied to the other invasive populations observed after 2007. The divergence time was immediately followed by a bottleneck period (DB_i generations) characterized by a reduction of the effective population size (N_{inf_i}). After the bottleneck, the population effective size is going back to a normal effective population size N_i . Dataset were summarized using all the summary statistics proposed by DIYABC software. They describe genetic variation per population (e.g mean number of alleles), per pair of population (e.g F_{ST}) or admixture between populations. The total number of summary statistic ranged from 76 to 576.

The recent ABC-Random Forest (ABC-RF) method described by Pudlo et al. (2016) was used to compare the scenarios. Random forest is a machine-learning non parametric algorithm which uses hundreds of bootstrapped decision trees to perform classification using the summary statistics as predictor variables. A “prior error rate” could be estimate by using the simulations which are not used to build the trees. The prior error rate gives a direct method for cross validation. We simulated 10,000 microsatellite dataset by scenario with DIYABC software and then, we grew a classification forest of 1,000 trees based on all simulated dataset. The scenario presenting the highest number of votes was selected as the most likely. When the number of votes was close between several scenarios (less than 50 votes of differences), only the selected scenario and the closest one were run again with ABC-RF to verify the accuracy of the scenario selection. We used the *abcrf* R package (Pudlo et al., 2016) to perform all the ABC-RF analyses. Finally, we inferred posterior distribution values for the final scenario of the final analysis under a regression by random forest methodology (Raynal et al, 2017) with classification forests of 1,000 trees. We carried out the same estimation on DIYABC by simulated 1,000,000 simulations for the final scenario and after, we applied a local linear regression on the 10,000 simulated data sets closest to our real data in order to verify the posterior distribution accuracy. Simultaneously, model checking was run with DIYABC to verify that simulated dataset was close to the real dataset.

Results

Genetic diversity of BTM

Multilocus genotypes were obtained with high genotyping success (98.85%) for the complete dataset including 896 individuals from 37 site-samples and a mean of 8.07 alleles per locus over all samples. Six cases of linkage disequilibrium were found after sequential Bonferroni corrections in the whole dataset. A given pair of loci was never in significant linkage disequilibrium in more than one population. The 15 microsatellite markers were thus considered independent.

After Bonferroni corrections, 3 populations of the native range (N-BE, N-XI, N-HU; Table 1) and 12 invading populations (I-ST, I-GI, I-RH, I-LU, I-LE, I-BR, I-KA, I-NI, I-PA, I-LR, I-SA and I-CV; Table 1) presented at least one locus showing significant departures from Hardy-Weinberg proportion. Among the loci, BTM22 was in significant departures from Hardy-Weinberg proportion for 11 populations (1 in the native range and 10 in the invaded one) but also presented a high null allele frequency (21%). Concerning the other locus, mean null allele frequencies for each locus was lower or equal at 10%. We performed the following analyses with and without BTM22 to achieve unbiased and robust results. As the results were similar in both cases, we reported analyses with the fifteen microsatellites dataset.

Allelic richness was higher in the native populations (4.23) than in the invading populations (2.96). In the invaded areas, the highest allelic richness was observed in Weil Am Rhein (I-WAR) and Budapest (I-BUD) (Table 1). In the native range, the observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity ranged from 0.43 to 0.56 and from 0.50 to 0.57, respectively. In the invaded range,

H_o and H_e were lower and ranged from 0.33 to 0.48 and from 0.28 to 0.49, respectively. Pairwise F_{ST} value in the whole dataset ranged from 0.01 to 0.38 whereas it ranged from 0.01 to 0.14 in the native range (Suppl. Mat. Table S1). In the invaded populations, Rhederbrug (I-RH) (0.16 to 0.37) and Katerini (I-KA) (0.24 to 0.38) presented the highest values of F_{ST} whereas Giessen (I-GI) presented the lowest one (0.02 to 0.19).

Population structure

In the unrooted neighbor-joining tree, the invasive and native populations were separated (Suppl. Mat. Figure S3). In the native range, the unrooted neighbor-joining tree was consistent with the geographic distribution of the site-samples. In the invaded range, the first observation sites of 2007 (Weil Am Rhein, I-WAR; Strasbourg, I-ST; Giessen, I-GI) were separated and most of the invasive populations were grouped with Giessen (I-GI). However, the low bootstrap values at most nodes make it difficult to draw any robust conclusions about the relationship between groups of sampled populations observed in the neighbor-joining tree. DAPC analysis presented the same pattern except for Katerini (I-KA) which was separated from the other invaded sampled populations (Suppl. Mat. Figure S4).

Global results obtained with STRUCTURE were congruent with the neighbor joining tree, DAPC and F-statistics analyses (Figure 1). At $K=2$, which was selected by the method of Evanno et al. (2005), all the native populations belonged to the same genetic cluster as well as Weil Am Rhein (I-WAR) and Strasbourg (I-ST), two of the three first European locations, and Delémont (I-DE), the nearest population to Weil Am Rhein (I-WAR). The second genetic cluster included all the other invasive populations. Budapest (I-BU) and Paris (I-PA) presented admixture signature between these two clusters. Interestingly at $K=3$, the native populations were clustered in a group separated from all invasive populations.

The subset analysis in the native range showed the presence of a genetic structure (Figure 1, Suppl. Mat. Figure S5). The uppermost level of structure was $K=2$. South Korea and South Western China were clearly differentiated from the other native populations. Northern and Eastern China were grouped together with presence of individuals from Xinyang (N-XI) and Lishui (N-LIS) populations assigned to the first genetic cluster. $K=3$ also presented an interesting clustering which was consistent with population geography. South Korea and South Western China belonged to two separated genetic clusters whereas Northern and Eastern China were still grouped together with an unclear mixed pattern.

For the invasive dataset, $K=2$ was the uppermost level of structure. Weil Am Rhein (I-WAR), Strasbourg (I-ST) and Delémont (I-DE) clustered with Katerini (I-KA). The last genetic cluster included all the other invasive populations. Budapest (I-BU), Creuzier-le-vieux (I-CV), Paris (I-PA) and Nice (I-NI) presented admixture signature between the two invasive genetic clusters. $K=7$ was also suggested as a suitable number of cluster. Weil Am Rhein (I-WAR), Strasbourg (I-ST) and Delémont (I-DE) were still grouped together whereas Katerini (I-KA) as 3 other invasive

populations (Rhederburg, I-RH; Zagreb, I-ZA; Paris, I-PA) were clustering alone. The genetic pattern for the other invasive populations was less clear but Ghent (I-GH), Istanbul (I-IS), and Creuzier-le-vieux (I-CV) were mostly clustering together whereas Solokhaul (I-SO), Bzyb Valley (I-BV), Brno (I-BR), Mtirala National Park (I-MNP), Orléans (I-OR), Nice (I-NI), Saintes (I-SA) and La Rochelle (I-LR) were mostly clustering together with the few individuals of Florence (I-FL). Individuals from Giessen (I-GI) were belonging to several genetic clusters.

Colonization history of BTM in Europe inferred from ABC analyses

The first set of ABC analyses considered the oldest invasive populations recorded in Europe which were Weil Am Rhein (I-WAR), Strasbourg (I-ST) and Giessen (I-GI) respectively. The first ABC analysis clearly indicated that Weil Am Rhein (I-WAR) originated from Eastern China with a high posterior probability of 0.78 and a low prior error rate (5.25%) (Table 2, Figure 2). The second ABC analysis considering Strasbourg (I-ST) was more confused. The results of the ABC analysis with 5 scenarios were confusing with a number of votes between Weil Am Rhein (I-WAR) and Shanghai (I-SHA) as a source lower than 40 votes. It was selected a Weil Am Rhein (I-WAR) source model and when Random forest analysis was carried out only on these two models to verify the accuracy, the Shanghai (I-SHA) source model was selected as the best model. The other preliminary ABC analyses always selected a Chinese origin as the best model (results not shown). That is why the final ABC analysis only tested native populations as potential sources. The results suggested that Strasbourg (I-ST) was also coming from Eastern China (posterior probability 0.76). The third ABC analysis revealed that Giessen (I-GI) may derive from the first invasive population Weil Am Rhein (I-WAR) (posterior probability 0.67). In all ABC analyses we carried out, the scenarios involving South Korea, Southern China or an unsampled population as a source were never selected.

The second set of ABC analyses considered invasive populations recorded after 2007 which were Lucca (I-LU), Budapest (I-BU) and Solokhaul (I-SO) with the alternative population of Bzyb Valley (I-BV). The subsequent results were less clear-cut. The best model for Lucca (I-LU) was an origin from the invasive population of Giessen (I-GI). Nevertheless, differences in the number of votes for an admixture between Shanghai (N-SHA) and Giessen (I-GI) as well as an admixture between Weil Am Rhein (I-WAR) and Giessen (I-GI) were lower than 50 with a prior error rate of 41.45% and a posterior probability of 0.49. Random forest analysis was thus carried out only on the three scenarios and the results also supported Giessen (I-GI) as the most likely source (posterior probability 0.53, prior error rate 31.54%). Hence, this scenario was chosen to perform the subsequent analyses. Concerning Budapest (I-BU), the best model found with Random Forest was an admixture event between native Shanghai (N-SHA) and invasive Giessen (I-GI) populations but with a high prior error rate (47.37%) and a low posterior probability (0.49). Moreover, differences in the number of votes for an admixture event between Weil Am Rhein (I-WAR) and Giessen (I-GI) were less than 15 votes. The same procedure as for Lucca (I-LU) was applied and the selected model was an admixture event between Shanghai (N-SHA) and Giessen (I-GI) (posterior

probability 0.72, prior error rate 15.55%). We used this scenario to perform the subsequent analyses. Finally, the model corresponding to Lucca (I-LU) as source for Solokhaul (I-SO) and the alternative population Bzyb Valley (I-BV) was selected with a posterior probability of 0.48 and 0.53 respectively, with a prior error rates of 46.3% and 37.35% respectively. For the final scenario, the posterior estimations were inferred for Ninfiv, the duration of the bottleneck DBi, introduction time t_i and the admixture rate (r_a) for Budapest (I-BU). These results are presented in Table S2.

Discussion

Understanding routes of invasion and dispersal of non-native species is essential to define efficient risk assessments and monitoring methods as well as management strategies (Essl et al., 2015). Our study definitely confirmed the complex invasion pathways of *C. perspectalis* suggested by Bras et al. (XX). Besides, it emphasized the role of ornamental plant trade, a major pathway for non-native phytophagous insects (Eschen et al., 2017; M. Kenis et al., 2007; Roques, 2010), in BTM introduction but also in its dispersal routes across Europe and Asia Minor.

New insights into introduction history of BTM in Europe

Nowadays, Asia is one of the major source of introduction of non-native insects to Europe (Roques, 2010), and most of the recently introduced species, such as *D. suzukii*, *H. axyridis* or *C. perspectalis*, are quickly expanding their invasion range (Roques et al., 2016). A precise identification of the area from which the non-native species originates within the native range is required in order to spot the potential source areas to be surveyed and adapt management strategies (Essl et al., 2015). Using mtDNA markers, Bras et al. (XX) suggested that the invading populations of *C. perspectalis* in Europe probably originated from Eastern China through several introduction events. The use of microsatellite markers and Bayesian analyses provided statistical information to support this Eastern Chinese origin, the ABC analyses clearly excluding South Korea, South Western China and a potential unsampled Asian population as source for the sampled invasive populations. Besides, the Chinese origin is congruent with the volumes of *Buxus* trees imported from China to Europe (EPPO, 2012) and with the evolution of the trade of plants for planting (Eschen et al., 2015). Eastern China was also proposed as source for the invasive yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, which has recently been introduced to France (Arca et al., 2015), and for the emerald ash borer, *Agilus planipennis*, introduced to North America (Bray et al., 2011).

Our results also suggested that at least two independent introductions occurred from Eastern China to Germany, corresponding to the two first records of BTM in Europe (Krüger, 2008) but the quite simultaneous additional 2007 records in the distant Netherlands and Switzerland (Krüger, 2008; Leuthardt et al., 2010; Van der Straten & Muus, 2010) together with the genetic diversity observed in mtDNA (Bras et al, XX) indicated that more introduction events may probably occurred from China. Both Netherlands and Germany are the European countries presenting the highest

volume of imported ornamental plants at the international scale (Eschen et al., 2017) but it seems that only one country served as an entry point for BTM invasive populations. Multiple introduction events directly from the native range may have facilitated the establishment of *C. perspectalis* in Europe (Bock et al., 2015; Cristescu, 2015). Yet, the propagule pressure usually plays a crucial role in the establishment of non-native species (Allendorf & Lundquist, 2003; Lockwood et al., 2005). Posterior parameter estimation suggested that *C. perspectalis* supported a low bottleneck. The insect was probably introduced with a large number of individuals from China to Europe, which could explain the significant genetic diversity observed by Bras et al. (XX) across its invaded range. Moreover, the reduction of effective population sizes estimated for the other populations used in the ABC analyses were also important, except for the Budapest population, suggesting that important volume of shipments including infested plants were imported into these countries. Additionally, the results from Structure and F-statistics suggested that two populations (Katerini, I-KA and Rhederburg, I-RH) experienced a bottleneck which is congruent with the results obtained by Bras et al. (XX) with mtDNA markers.

A bridgehead effect involved in the fast spread of BTM

Flight capacities of BTM do not allow to explain its expansion across Europe and Asia Minor in less than ten years. Thus, a dispersal of ca. ten kilometers per year was noticed around the two first locations of observation in Europe (Casteels et al., 2011; Van der Straten & Muus, 2010). Under laboratory conditions, Bras et al. (XX) showed larger flight capacities, susceptible to result in an expansion of ca. 60km per year, but it cannot explain the fast spread of the moth across Europe. Our ABC analyses suggested that bridgehead effects have been involved in this spread, with the primary invading population of Weil Am Rhein (I-WAR) serving as a source for the Giessen (I-GI) population in Netherlands. Thus, this Dutch nursery area does not seem to be an entry place of moth introduction directly from China as we could have thought. Additionally, our results suggested that the Giessen (I-GI) population may then have served as source for those having invaded the Italian city of Lucca (I-LU) near Pistoia, a region exhibiting a high density of nurseries. This is congruent with the role of European hub for ornamental plant trade played by the Netherlands (Dehnen-Schmutz et al., 2010; Eschen et al., 2015; Van Kleunen et al., 2010), and in a lesser extent by Italy (van Valkenburg et al., 2014). The ABC analyses also suggested that Giessen (I-GI) possibly served as a source in the admixture event observed in the Budapest (I-BU) population. Besides, the analyses confirmed a probable Italian origin of the population having invaded Russia, as it has been suspected by Gninenko et al. (2014). The implication of Italy in ornamental plant trade at the European level suggests that it may have also served as source for other invasive populations (van Valkenburg et al., 2014).

Multiple introduction events could lead to admixture events as it has been observed in several non-native insect species (e.g Fraimout et al., 2017; Lesieur et al., 2018; Lombaert et al., 2014). The two independent introduction events suggested from China to Europe coupled to the ever-

increasing trade of ornamental plants between European countries (Cadic & Widehem, 2006; Dehnen-Schmutz et al., 2010) is favoring the occurrence of admixture events between invasive populations. Within the sampled populations, admixture was only observed in the Budapest (I-BU) one. Despite the difficulties to define precisely the good model with ABC RF for this population, the two closest scenarios corresponding to an admixture event between Giessen (I-GI) and another population, coming directly from Eastern China (corresponding to the best model) or from Weil am Rhein (I-WAR) and was supported by Structure results.

Difficulties to trace dispersal routes of BTM in the invaded range

Molecular data cannot always supplement historical information. Our ABC results showed that it is difficult to define clear invasive routes when invasive scenarios rely on few assumptions and these scenarios include admixture events to be taken into account. The scenarios' topologies and numbers are chosen by the user and so they could be subject to bias when the number of population taken into account is high. Including all the possible alternative hypotheses could reduce these biases but could also reduce the confidence in the choice of scenarios. Moreover, several assessed scenarios could well explain the data and a model is not necessarily the true one even if it is statistically supported (Csilléry et al., 2010). This highlights the importance of appropriate sampling (Estoup & Guillemaud, 2010), choosing carefully the site-sampled for ABC analyses (Lombaert et al., 2014) and use as much as possible historical information to assess more precisely the invasion routes (Estoup & Guillemaud, 2010; Lawson et al., 2011), especially for the species dispersed with human activities within a short period of time.

The results also illustrated the complex invasion pathways of *C. perspectalis* and how difficult it could be to trace such pathways. The geographic proximity of Weil Am Rhein (I-WAR) with Strasbourg (I-ST) and the flight capacities of the insect (Van der Straten & Muus, 2010, Bras et al. XX) could explain why we had difficulties to define the origin of Strasbourg (I-ST) population whereas the complexity of the ornamental plant trade may explain the difficulties to define the invasive scenarios of the populations introduced after 2007. Indeed, tracing potential human-mediated dispersal due to trade such as the one of ornamental plants is not straightforward (Drew et al., 2010; Essl et al., 2018; Pautasso & Jeger, 2014). Rules concerning shipment importation and control measures to prevent pest entry depend on each country (Eschen et al., 2015), especially in EU where the liberalization of the trade lead to large difficulties in tracing the origin of imported shipments (Dehnen-Schmutz et al., 2010). Besides, the high volume of imported shipments also lead to difficulties to control pests (Brockerhoff & Liebhold, 2017).

Acknowledgements

This work benefited from the efficient help of many collaborators in the sampling. We would like to acknowledge Annette Herz, Anna Maria Vettraino, Delphine Fallour-Rubio, Dimitrios N. Avtzis,

Dinka Matošević, Evangelina Chatzidimitriou, Jean-Emmanuel Michaut, Jurate de Prins, Liesbet Van Remoortere, Marja Van der Straten, Gábor Véték and Valery Shurov for help with collecting the insects. We would like to acknowledge Carole Kerdelhué for her advices on this study. We also would like to acknowledge Laure Sauné, Augustine Jacquard, Alizée Ribas, Caroline Viot, Charlotte Mathieu and Claudine Courtin for technical assistance. This research was supported by the project INCA ("INvasion fulgurante de la Pyrale du buis *Cydalima perspectalis* en Région Centre Val de Loire") financed by the French Region Centre-Val de Loire (project INCA APR IR 2015 – 0009 673).

References

- Allendorf, F. W., & Lundquist, L. L. (2003). Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology*, 17(1), 24–30.
- Arca, M., Mougél, F., Guillemaud, T., Dupas, S., Rome, Q., Perrard, A., ... Silvain, J.-F. (2015). Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, in Europe. *Biological Invasions*, 17, 2357–2371.
- Beaumont, M. A. (2010). Approximate Bayesian Computation in Evolution and Ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41(1), 379–406.
- Beaumont, M. A., Zhang, W., & Balding, D. J. (2002). Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, 162(4), 2025–2035.
- Bella, S. (2013). The box tree moth *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) continues to spread in southern Europe: new records for Italy (Lepidoptera Pyraloidea Crambidae). *Redia*, 96, 51–55.
- Benazzo, A., Ghirotto, S., Vilaça, S. T., & Hoban, S. (2015). Using ABC and microsatellite data to detect multiple introductions of invasive species from a single source. *Heredity*, 115, 262–272.
- Bertorelle, G., Benazzo, A., & Mona, S. (2010). ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular Ecology*, 19, 2609–2625.
- Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarošík, V., ... Richardson, D. M. (2011). A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(7), 333–339.
- Bock, D. G., Caseys, C., Cousens, R. D., Hahn, M. A., Heredia, S. M., Hübner, S., ... Rieseberg, L. H. (2015). What we still don't know about invasion genetics. *Molecular Ecology*, 24(9), 2277–2297.
- Bras, A., Auger-Rozenberg, M.-A., Rousselet, J., Roques, A., Sauvard, D. Flight performance of the highly invasive box tree moth *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Ecological Entomology*, (In prep.)
- Bras, A., Avtzis, D.N., Kenis, M., Li, H., Véték, G., Bernard, A., Courtin, C., Rousselet, J., Roques, A., Auger-Rozenberg, M.-A. A complex invasion story underlies the fast spread of the invasive box tree moth (*Cydalima perspectalis*) across Europe. *Journal of Pest Science*, (In review)
- Bras, A., Saune, L., Roques, A., Rousselet, J., & Auger-Rozenberg, M.-A. (2018). Isolation and characterization of 15 microsatellite markers for the highly invasive box tree moth *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae). *European Journal of Entomology*, 115, 264–267.
- Bray, A. M., Bauer, L. S., Poland, T. M., Haack, R. A., Cognato, A. I., & Smith, J. J. (2011). Genetic analysis of emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Fairmaire) populations in Asia and North America. *Biological Invasions*, 13(12), 2869–2887.
- Brockerhoff, E. G., & Liebhold, A. M. (2017). Ecology of forest insect invasions. *Biological Invasions*, 19, 3141–3159.
- Cadic, A., & Widehem, C. (2006). L'horticulture ornementale française. Structure, acteurs et marchés. INRA Editions, Paris (France) 2-7380-1207-8.
- Casteels, H., Witters, J., Vandierendonck, S., Van Remoortere, L., & Goossens, F. (2011). First report of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in Belgium. In *Proceedings of the 63rd International Symposium on Crop Protection* (Vol. 76, pp. 151–155). Ghent.

- Chapuis, M.-P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621–631.
- Cristescu, M. E. (2015). Genetic reconstructions of invasion history. *Molecular Ecology*, 24, 2212–2225.
- Csilléry, K., Blum, M. G., Gaggiotti, O. E., & François, O. (2010). Approximate Bayesian computation (ABC) in practice. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(7), 410–418.
- Dehnen-Schmutz, K., Holdenrieder, O., Jeger, M. J., & Pautasso, M. (2010). Structural change in the international horticultural industry: Some implications for plant health. *Scientia Horticulturae*, 125(1), 1–15.
- Dlugosch, K. M., Anderson, S. R., Braasch, J., Cang, F. A., & Gillette, H. D. (2015). The devil is in the details: genetic variation in introduced populations and its contributions to invasion. *Molecular Ecology*, 24, 2095–2111.
- Drew, J., Anderson, N., & Andow, D. (2010). Conundrums of a complex vector for invasive species control: a detailed examination of the horticultural industry. *Biological Invasions*, 12, 2837–2851.
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2011). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361.
- Eschen, R., Britton, K., Brockerhoff, E., Burgess, T., Dalley, V., Epanchin-Niell, R. S., ... Theyse, M. (2015). International variation in phytosanitary legislation and regulations governing importation of plants for planting. *Environmental Science & Policy*, 51, 228–237.
- Eschen, R., Douma, J. C., Grégoire, J.-C., Mayer, F., Rigaux, L., & Potting, R. P. J. (2017). A risk categorisation and analysis of the geographic and temporal dynamics of the European import of plants for planting. *Biological Invasions*, 19, 3243–3257.
- Eschen, R., Grégoire, J.-C., Hengeveld, G. M., de Hoop, B. M., Rigaux, L., & Potting, R. P. J. (2015). Trade patterns of the tree nursery industry in Europe and changes following findings of citrus longhorn beetle, *Anoplophora chinensis* Forster. *NeoBiota*, 26, 1–20.
- Essl, F., Bacher, S., Blackburn, T. M., Booy, O., Brundu, G., Brunel, S., ... Jeschke, J. M. (2015). Crossing Frontiers in Tackling Pathways of Biological Invasions. *BioScience*, 65, 769–782.
- Essl, F., Bacher, S., Genovesi, P., Hulme, P. E., Jeschke, J. M., Katsanevakis, S., ... Richardson, D. M. (2018). Which Taxa Are Alien? Criteria, Applications, and Uncertainties. *BioScience*, 68(7), 496–509.
- Estoup, A., & Guillemaud, T. (2010). Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology*, 19(19), 4113–4130.
- Estoup, A., Lombaert, E., Marin, J.-M., Guillemaud, T., Pudlo, P., Robert, C. P., & Cornuet, J.-M. (2012). Estimation of demographic model probabilities with Approximate Bayesian Computation using linear discriminant analysis on summary statistics. *Molecular Ecology Resources*, 12, 846–855.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.
- Feldtrauer, J.-F., Feltrauer, J.-J., & Brua, C. (2009). Premiers signalements en France de la Pyrale du Buis *Diaphania perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante s'attaquant aux Buis, 65(4), 55–58.
- Fraimout, A., Debat, V., Fellous, S., Hufbauer, R. A., Foucaud, J., Pudlo, P., ... Estoup, A. (2017). Deciphering the routes of invasion of *Drosophila suzukii* by means of ABC random forest. *Molecular Biology and Evolution*, 34(4), 980 – 996.
- Garnas, J. R., Auger-Rozenberg, M.-A., Roques, A., Bertelsmeier, C., Wingfield, M. J., Saccaggi, D. L., ... Slippers, B. (2016). Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. *Biological Invasions*, 18(4), 935–952.
- Gninenko, Y. I., Shiryayeva, N. V., & Shurov, V. I. (2014). The box tree moth - a new invasive pest in the Caucasian Forests. *Plant Health - Research and Practice*, 1(7), 32–39.
- Göttig, S. (2017). Development of eco-friendly methods for monitoring and regulating the box tree pyralid, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive pest in

- ornamentals (PhD Thesis). Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- Göttig, S., & Herz, A. (2017). Observations on the seasonal flight activity of the box tree pyralid *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in the Rhine-Main Region of Hessa. *Journal Fur Kulturpflanzen*, 69(5), 157–165.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485–486.
- Guillemaud, T., Beaumont, M. A., Ciosi, M., Cornuet, J.-M., & Estoup, A. (2010). Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity*, 104(1), 88–99.
- Hizal, E., Kose, M., Yesil, C., & Kaynar, D. (2012). The new pest *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(3), 400–403.
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806.
- Jombart, T. (2008). ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405.
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1), 94.
- Kawazu, K., Honda, H., Nakamura, S., & Adati, T. (2007). Identification of Sex Pheromone Components of the Box Tree Pyralid, *Glyphodes perspectalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 33(10), 1978–1985.
- Kenis, M., Li, H., Fan, J., Courtial, B., Auger-Rozenberg, M.-A., Yart, A., ... Roques, A. (2018). Sentinel nurseries to assess the phytosanitary risks from insect pests on importations of live plants. *Scientific Reports*, 8, 11217.
- Kenis, M., Nacambo, S., Leuthardt, F., Di Domenico, F., & Haye, T. (2013). The box tree moth *Cydalima perspectalis*, in Europe: horticultural pest or environmental disaster? *Aliens* 33, 38–41.
- Kenis, M., Rabitsch, W., Auger-Rozenberg, M.-A., & Roques, A. (2007). How can alien species inventories and interception data help us prevent insect invasions? *Bulletin of Entomological Research*, 97(05), 489–502.
- Kim, J., & Park, I.-K. (2013). Female sex pheromone components of the box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis*, in Korea: Field test and development of film-type lure. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16(4), 473–477.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–1191.
- Koren, T., & Crne, M. (2012). The first record of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera, Crambidae) in Croatia. *Natura Croatica*, 21(2), 507.
- Krüger, E. O. (2008). *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) - new for the European fauna (Lepidoptera: Crambidae). *Entomologische Zeitschrift mit Insekten-Börse*, 118(2), 81–83.
- Lawson, L.-J., Estoup, A., Evans, D. M., Thomas, C. E., Lombaert, E., Facon, B., ... Roy, H. E. (2011). Ecological genetics of invasive alien species. *BioControl*, 56(4), 409–428.
- Lesieur, V., Lombaert, E., Guillemaud, T., Courtial, B., Strong, W., Roques, A., & Auger-Rozenberg, M.-A. (2018). The rapid spread of *Leptoglossus occidentalis* in Europe: a bridgehead invasion. *Journal of Pest Science*, 1–12.
- Leuthardt, F., Billen, W., & Baur, B. (2010). Ausbreitung des Buchsbaumzünslers *Diaphania perspectalis* (Lepidoptera, Pyralidae) in der Region Basel—eine für die Schweiz neue Schädlingsart. *Entomo Helvetica*, 3, 51–57.
- Liebold, A. M., Yamanaka, T., Roques, A., Augustin, S., Chown, S. L., Brouckhoff, E. G., & Pyšek, P. (2016). Global compositional variation among native and non-native regional insect assemblages emphasizes the importance of pathways. *Biological Invasions*. 18:893–905
- Lippens, C., Estoup, A., Hima, M. K., Loiseau, A., Tatar, C., Dalecky, A., ... Brouat, C. (2017). Genetic structure and invasion history of the house mouse (*Mus musculus domesticus*) in Senegal, West Africa: a legacy of colonial and contemporary times. *Heredity*, 119, 64–75.
- Lockwood, J. L., Cassey, P., & Blackburn, T. (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 223–228.

- Lombaert, E., Estoup, A., Facon, B., Joubard, B., Gregoire, J.-C., Jannin, A., ... Guillemaud, T. (2014). Rapid increase in dispersal during range expansion in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 27, 508–517.
- Lombaert, E., Guillemaud, T., Cornuet, J.-M., Malausa, T., Facon, B., & Estoup, A. (2010). Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE*, 5(3), e9743.
- Lombaert, E., Guillemaud, T., Lundgren, J., Koch, R., Facon, B., Grez, A., ... Estoup, A. (2014). Complementarity of statistical treatments to reconstruct worldwide routes of invasion: the case of the Asian ladybird. *Molecular Ecology*, 23, 5979–5997.
- Maruyama, T., & Shinkaji, N. (1987). Studies on the life cycle of the box-tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). I. Seasonal adult emergence and developmental velocity. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 31, 226–232.
- Matošević, D. (2013). Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*, Lepidoptera; Crambidae), New Invasive Insect Pest in Croatia. *South-East European Forestry*, 4(2), 89–94.
- Matošević, D., Lukić, I., Bras, A., Lacković, N., & Pernek, M. (2017). Spatial Distribution, Genetic Diversity and Food Choice of Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*) in Croatia. *South-East European Forestry*, 8(1), 41–46.
- Matsiakh, I., Kramarets, V., & Mamadashvili, G. (2018). Box tree moth *Cydalima perspectalis* as a threat to the native populations of *Buxus colchica* in Republic of Georgia. *Journal of the Entomological Research Society*, 20(2), 29–42.
- Meurisse, N., Rassati, D., Hurley, B. P., Bockerhoff, E. G., & Haack, R. A. (2018). Common pathways by which non-native forest insects move internationally and domestically. *Journal of Pest Science*.
- Mitchell, R., Chitanava, S., Dbar, R., Kramarets, V., Lehtijärvi, A., Matchutadze, I., ... Kenis, M. (2018). Identifying the ecological and societal consequences of a decline in *Buxus* forests in Europe and the Caucasus. *Biological Invasions*.
- Nacambo, S., Leuthardt, F. L. G., Wan, H., Li, H., Haye, T., Baur, B., ... Kenis, M. (2014). Development characteristics of the box-tree moth *Cydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. *Journal of Applied Entomology*, 138(1-2), 14–26.
- Nentwig, W., Bacher, S., Kumschick, S., Pyšek, P., & Vilà, M. (2017). More than “100 worst” alien species in Europe. *Biological Invasions*, 20, 1611–1621.
- Pautasso, M., & Jeger, M. J. (2014). Network epidemiology and plant trade networks. *AoB PLANTS*, 6, 1–14.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Pudlo, P., Marin, J.-M., Estoup, A., Cornuet, J.-M., Gautier, M., & Robert, C. P. (2016). Reliable ABC model choice via random forests. *Bioinformatics*, btv684.
- R Development Core Team (2008) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 3–36.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225.
- Roques, A. (2010). Taxonomy, time and geographic patterns. Chapter 2. *BioRisk*, 4, 11–26.
- Roques, A., Auger-Rozenberg, M.-A., Blackburn, T. M., Garnas, J., Pyšek, P., Rabitsch, W., ... Duncan, R. P. (2016). Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biological Invasions*, 18(18), 907–920.
- Rosenberg, N. A. (2004). Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138.
- Sáfián, S., & Horváth, B. (2011). Box tree moth–*Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), new member in the Lepidoptera fauna of Hungary (Lepidoptera: Crambidae). *Natura Somogyiensis*, 19, 245–246.
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., ... others. (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, (32), 305–332.
- Salisbury, A., Korycinska, A., & Halstead, A. J. (2012). The first occurrence of larvae of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in private gardens in the UK. *British Journal of Entomology and Natural History*, 25(1), 1.

- Seebens, H., Blackburn, T. M., Dyer, E. E., Genovesi, P., Hulme, P. E., Jeschke, J. M., ... Essl, F. (2017). No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nature Communications*, 8, 14435.
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629.
- Strachinis, I., Kazilas, C., Karamaouna, F., Papanikolaou, N. E., Partsinevelos, G. K., & Milonas, P. G. (2015). First record of *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) in Greece. *Hellenic Plant Protection Journal*, 8(2), 66–72.
- Székely, L., Dinca, V., & Mihai, C. (2011). *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), a new species for the Romanian fauna (Lepidoptera: Crambidae: Spilomelinae). *Bul Inf Entomol*, 22(3-4), 73–77.
- van Boheemen, L. A., Lombaert, E., Nurkowski, K. A., Gauffre, B., Rieseberg, L. H., & Hodgins, K. A. (2017). Multiple introductions, admixture and bridgehead invasion characterize the introduction history of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe and Australia. *Molecular Ecology*, 26:5421–5434.
- Van der Straten, M. J., & Muus, T. S. (2010). The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*, 21, 107–111.
- Van Kleunen, M., Dawson, W., Schlaepfer, D., Jeschke, J. M., & Fischer, M. (2010). Are invaders different? A conceptual framework of comparative approaches for assessing determinants of invasiveness: Comparisons on determinants of invasiveness. *Ecology Letters*, 13: 947–958.
- van Valkenburg, J., Brunel, S., Brundu, G., Ehret, P., Follak, S., & Uludag, A. (2014). Is terrestrial plant import from East Asia into countries in the EPPO region a potential pathway for new emerging invasive alien plants? *EPPO Bulletin*, 44, 195–204.
- Wan, H., Haye, T., Kenis, M., Nacambo, S., Xu, H., Zhang, F., & Li, H. (2014). Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe? *Journal of Applied Entomology*, 138(1-2), 14–26.
- Xiao, H.-J., Xin, H.-Q., Zhu, X.-F., & Xue, F.-S. (2011). Photoperiod and temperature of diapause induction in *Diaphania perspectalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(1), 116–120.

Author Contributions

ABr, AR, JR and MAAR conceived and designed research. ABr, MK, HM, ABe, and AR performed the sampling. ABr conducted experiments. ABr and EL analyzed data. ABr, EL, AR and MAAR and wrote the manuscript. All authors approved the manuscript.

Tables and Figures

Table 1. Sampling information and genetic diversity of *Cydalima perspectalis* in both its native and invaded range.

Pop	Country	County	Populations	GPS coordinates	Collection date	First Obs.	N	AR	An	Ho	He
N-HU	China	Anhui	Huaipei	33°57'21"N; 116°47'53"E	2017	-	30	3.57	4.46	0.56	0.50
N-BE		Beijing	Beijing	39°57'42"N; 116°17'40"E	2016-2017	-	30	4.32	5.39	0.51	0.54
N-GU		Guizhou	Guiyang	26°25'39"N; 106°40'6"E	2017	-	18	4.10	4.36	0.43	0.51
N-XI		Henan	Xinyang	32° 7'46"N; 114° 5'21"E	2017	-	25	4.84	5.13	0.48	0.57
N-NA		Jiangsu	Nanjing	32° 2'7"N; 118°47'14"E	2017	-	24	4.35	4.73	0.43	0.54
N-SHE		Liaoning	Shenyang	41°48'20"N; 123°25'53"E	2017	-	25	4.84	5.64	0.50	0.57
N-TA		Shandong	Tai'an	36°11'18"N; 117° 5'14"E	2012-2017	-	24	3.85	4.57	0.49	0.54
N-SHA		Shanghai	Shanghai	31°13'35"N; 121°28'0"E	2016-2017	-	30	4.02	5.08	0.47	0.50
N-KU		Yunnan	Kunming	25° 8'16"N; 102°45'1"E	2016	-	4*	-	-	-	-
N-LIJ			Lijiang	26°54'22"N; 100°13'28"E	2016	-	29	4.01	4.50	0.44	0.52
N-FU			Fuyang	30°0'12"N; 119°47'59"E	2014-2015	-	30	4.29	5.29	0.48	0.52
N-LIS			Lishui	28°28'3"N; 119°55'22"E	2017	-	19	4.16	4.29	0.45	0.51
N-SE	South Korea	Gyeonggi	Seoul	37°26'31"N; 126°58'43"E	2012	-	15	4.43	4.40	0.54	0.56
I-GH	Belgium	East Flanders	Ghent	51° 2'23"N; 3°43'15"E	2015-2016	2010	30	2.86	3.31	0.40	0.38
I-ZA	Croatia	Zagreb	Zagreb	45°49'13"N; 15°59'25"E	2014	2013	30	2.87	3.50	0.45	0.39
I-BR	Czech Republic	South Moravian	Brno	49°12'44"N; 16°36'53"E	2016	2011	30	2.81	3.50	0.42	0.38
I-CV	France	Auvergne-Rhône-Alpes	Creuzier-le-vieux	46° 9'38"N; 3°26'5"E			28	2.84	3.50	0.44	0.43
I-OR		Centre-Val de Loire	Orléans	47°53'25"N; 1°53'46"E	2014		22	3.02	3.91	0.47	0.42
I-ST		Grand Est	Strasbourg	48°36'28"N; 7°46'29"E	2016-2017	2008	30	2.78	3.39	0.45	0.46
I-PA		Île-de-France	Paris	48°50'32"N; 2°20'12"E	2014-2016		40	3.15	4.00	0.43	0.45
I-SA		Nouvelle Aquitaine	Saintes	45°44'31"N; 0°37'16"O			30	3.14	3.77	0.39	0.42
I-LR	Georgia		La Rochelle	46° 9'37"N; 1° 9'4"O	2015-2016		20	2.87	3.73	0.42	0.37
I-NI		Provence-Alpes-Côte d'Azur	Nice	43°42'3"N; 7°15'48"E			30	2.75	3.50	0.45	0.41
I-BV		Abkhazia	Bzyb Valley	43°17'24"N; 40°23'60"E	2015	2015	19	2.78	3.55	0.43	0.37
I-MNP		Adjara	Mtirala National Park	41°41'27"N; 41°49'48"E	2015		15	3.18	3.75	0.48	0.42

I-WAR	Germany	Baden-Württemberg	Weil Am Rhein	47°35'51"N; 7°37'46"E	2008 - 2017	2007	30	3.32	3.92	0.48	0.48
I-KA	Greece	Central Macedonia	Katerini	40°16'46"N; 22°30'20"E	2017	2013	29	2.46	2.92	0.37	0.35
I-BU	Hungary	Pest	Budapest	47°28'49"N; 19° 2'16"E		2011	30	3.32	3.79	0.43	0.47
I-LE	Italy	Veneto	Legnaro	45°20'45"N; 11°57'40"E	2014	2010	20	3.15	3.75	0.42	0.44
I-FL		Tuscany	Florence	43°44'57"N; 11°15'2"E	2016		3*	-	-	-	-
I-LU			Lucca	43°51'9"N; 10°27'25"E	2016		30	2.81	3.50	0.41	0.40
I-GI	Netherlands	North Brabant	Giessen	51°46'54"N; 5° 3'27"E	2009-2016	2007	28	3.18	3.92	0.41	0.43
I-RO		South Holland	Rotterdam	51°55'12"N; 4°29'26"E	2016		4*	-	-	-	-
I-RH		Groningen	Rhederbrug	53° 5'16"N; 7° 9'59"E	2016		29	2.26	3.30	0.33	0.28
I-SO	Russia	Krasnodar Krai	Solokhaul	43°48'14"N; 39°40'55"E	2014	2012	15	2.59	3.18	0.39	0.35
I-DE	Switzerland	Jura	Delémont	47°21'39"N; 7°20'40"E	2014 - 2016	2007	21	3.04	3.29	0.38	0.49
I-IS	Turkey	Marmara	Istanbul	41° 0'40"N; 28°59'0"E	2014	2011	30	3.20	4.00	0.43	0.44

Information presented for each locality includes population code number (Pop N°); GPS Coordinates; Year of sample collection; Year of first observation in the country (First Obs.); Number of individuals genotyped (N); Allelic richness based on the minimum sample size of 14 individuals (AR); Mean number of allele (A_n); Observed (H_o) and Expected heterozygosity (H_e). * Only use in Structure analysis

Table 2. Description of the model choice analyses to infer the invasive routes of *Cydalima perspectalis* and model checking results of each ABC analyses.

Compared scenarios	Population considered	Potential source	Admixture events	Selected model	NSS	Number of RF votes	Prior error rate	RF post. proba.
4	I-WAR	N-US; N-SE; N-SHA; N-LIJ	-	Introduction from N-SHA	76	724	5.25	0.78
4	I-ST	N-US; N-SE; N-SHA; N-LIJ	-	Introduction from N-SHA	76	599	5.20	0.76
6	I-GI	N-US; N-SE; N-SHA; N-LIJ; I-WAR; I-ST	-	Introduction from I-WAR	204	510	15.96	0.67
22	I-LU	N-US; N-SE; N-SHA; N-LIJ; I-WAR; I-ST; I-GI	Native x Invasive ; Invasive x Invasive	Introduction from I-GI	301	201	41.45	0.49
30	I-BU	N-US; N-SE; N-SHA; N-LIJ; I-WAR; I-ST; I-GI; I-LU	Native x Invasive ; Invasive x Invasive	Admixture event between N-SHA and I-GI	424	130	47.37	0.49
36	I-SO	N-US; N-SE; N-SHA; N-LIJ; I-WAR; I-ST; I-GI; I-LU; I-BU	Native x Invasive ; Invasive x Invasive	Introduction from I-LU	576	215	46.30	0.48
36	I-BV	N-US; N-SE; N-SHA; N-LIJ; I-WAR; I-ST; I-GI; I-LU; I-BU	Native x Invasive ; Invasive x Invasive	Introduction from I-LU	576	265	37.35	0.53

Information presented includes for each ABC analysis the number of compared scenarios; the invasive population considered; the potential source tested; Admixture event; the selected model define with Random Forest (RF), the number of summary statistics used (NSS); the number of RF votes for 1,000 simulated trees; the prior error rate and the RF posterior probability.

Table 3. Historical, demographic and mutation parameters, and prior distributions used to assess the invasion scenarios of *Cydalima perspectalis* with ABC analysis.

Interpretation	Parameter	Prior distribution
Effective stable size of populations	N_i	Log-uniform [100 ; 100000]
Founding effective population sizes	N_{inf_i}	Log-uniform [2 ; 100]
Bottleneck durations	DB_i	Uniform [0 ; 21]
Introduction time 2007	$t_{I-WAR}, t_{I-ST}, t_{I-GI}$	Uniform [30 ; 51]
Introduction time 2010	t_{I-LU}	Uniform [21 ; 42]
Introduction time 2011	t_{I-BU}	Uniform [18 ; 39]
Introduction time 2012	t_{I-SO}	Uniform [15 ; 36]
Introduction time 2015	t_{I-BV}	Uniform [6; 27]
Ancestral divergence time	$t_{N-US}, t_{N-SE}, t_{N-SHA}, t_{N-LU}$	Uniform [100 ; 50000]
Demographic event in the native range	N_{sup}	Uniform [100 ; 100000]
Admixture coefficient	ra	Uniform [0.1 ; 0.9]
Mutation parameters for microsatellite markers	μ	Uniform [1E-5 ; 1E-3]
	P	Uniform [1E-1 ; 3E-1]
	SNI	LogUniform [1E-8 ; 1E-5]

$N_{inf_{iv}}$ and DB_i correspond of prior only for the invasive populations. Times of events (t) are expressed in number of generations going back to the past. The microsatellite loci were assumed to follow a generalized stepwise mutation model and characterized by three parameters: the mutation rate (μ), the mean parameter of the geometric distribution of mutation length (P) and the mean mutation rate for single nucleotide insertion (SNI). Note that $[x ; y]$, x and y are the bounds of the distributions for each prior. Assumptions: $N_{sup} > N_{N-US}$; $t_{I-WAR} > t_{I-GI}$; $t_{I-GI} > t_{I-LU}$; $t_{I-GI} > t_{I-BU}$; $t_{I-LU} > t_{I-SO}$; $t_{I-LU} > t_{I-BV}$.

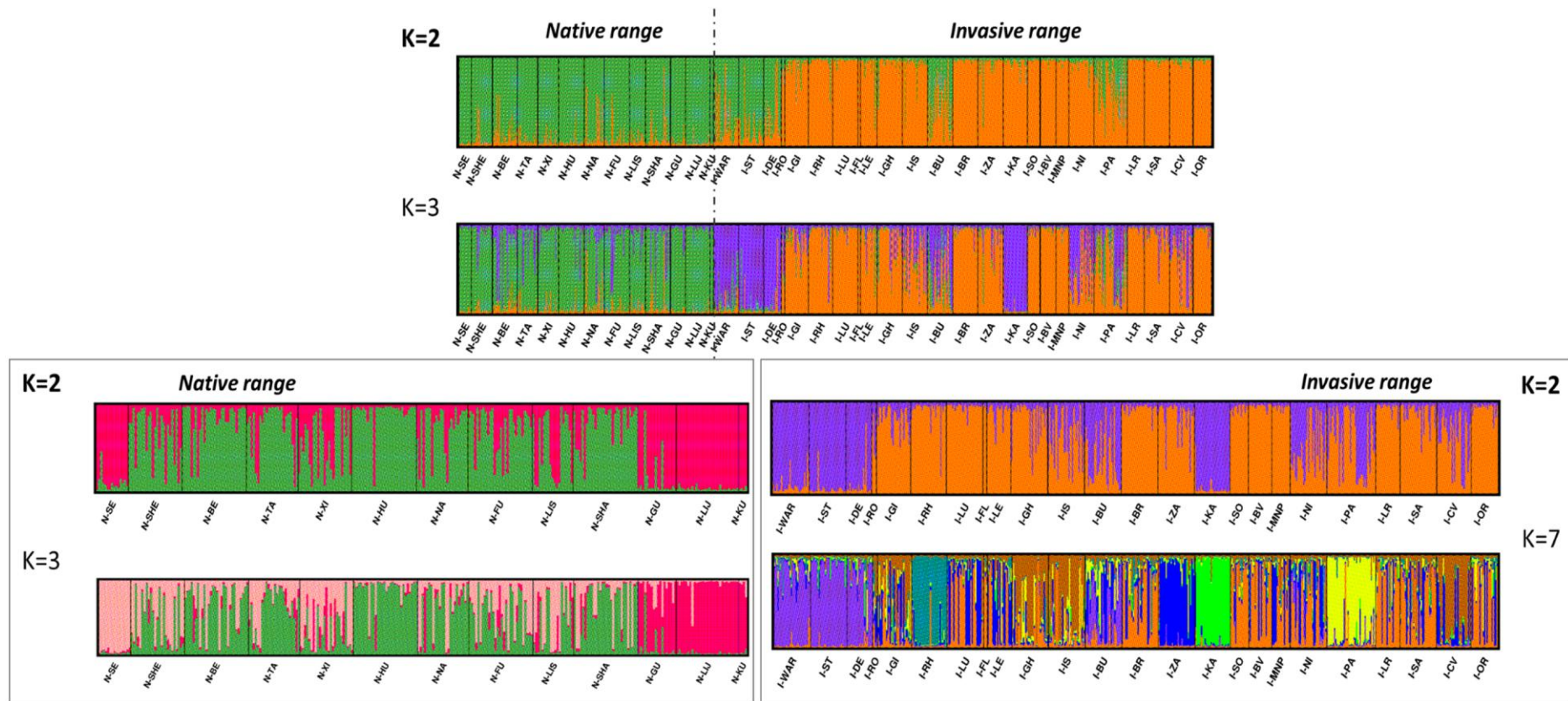


Figure 1. Graphical representation of *Cydalis perspectalis* population genetic structure estimated with the Bayesian clustering approach implemented in STRUCTURE software for the whole dataset, the native range and the invasive range. Population codes are indicated above the plots (see Table 1). Each individual is represented by a vertical line, and each colour represents a particular genetic cluster. In bold, the best K defined with Structure Harvester.



Figure 2. Invasive routes of *Cydalima perspectalis* suggested by ABC analyses. The black arrows correspond to well-supported ABC scenarios. The grey arrows correspond to less supported ABC scenarios.

Supplementary Material



Figure S1. Sampling of *Cydalis perspectalis* populations in the native range. Each number correspond to a population code (see Table 1). The grey dot line represents the putative natural range of *C. perspectalis* based on records from the literature and insect collections (Bras et al XX).

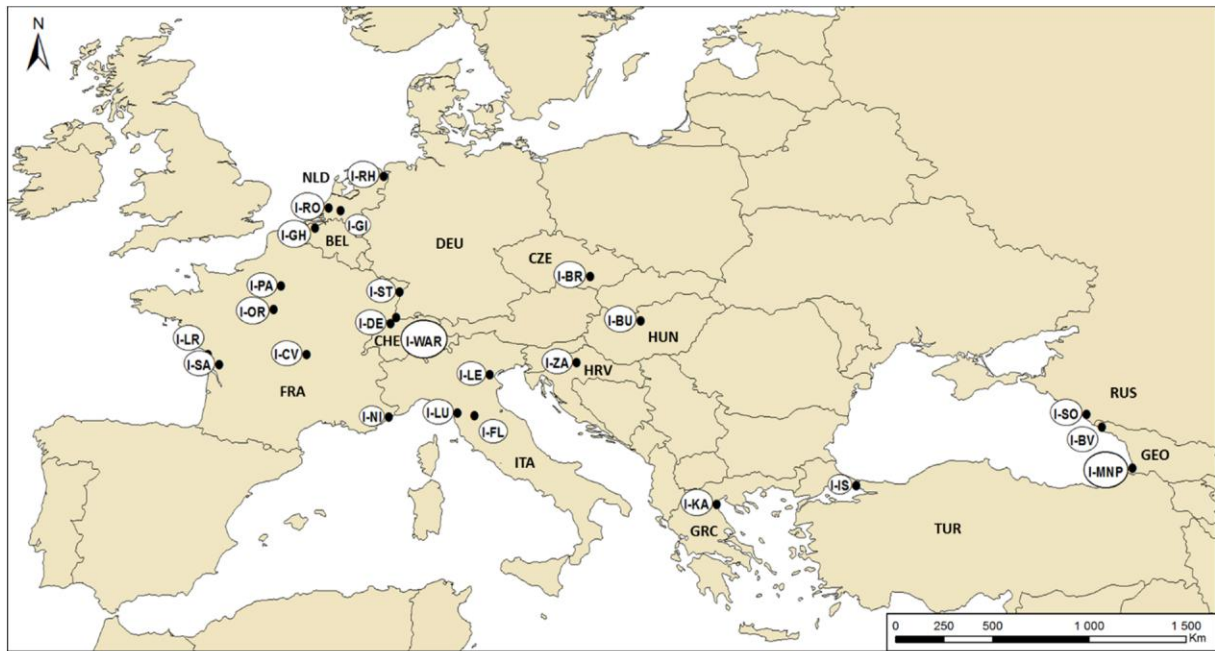


Figure S2. Sampling of *Cydalima perspectalis* populations in the invaded range. Each number correspond to a population code (see Table 1). Country abbreviations are listed by year of first observation: (2007) DEU: Germany, CHE: Switzerland, NLD: Netherlands; (2008) FRA: France; (2010) ITA: Italy, BEL: Belgium; (2011) TUR: Turkey, HUN: Hungary, CZE: Czech Republic; (2012) HRV: Croatia, RUS: Russia; (2013) GRC: Greece and (2015) GEO: Georgia.

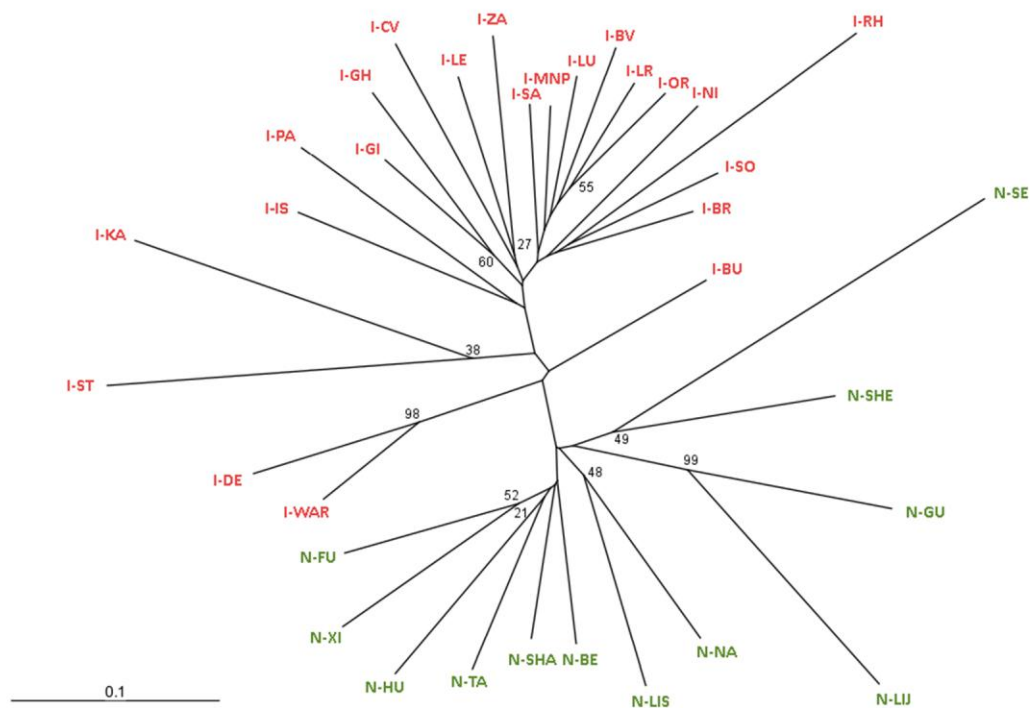


Figure S3. Population-based neighbor-joining tree for the studied *Cydalima perspectalis* site-samples computed with Cavalli-Sforza and Edwards chord distance. Native populations are

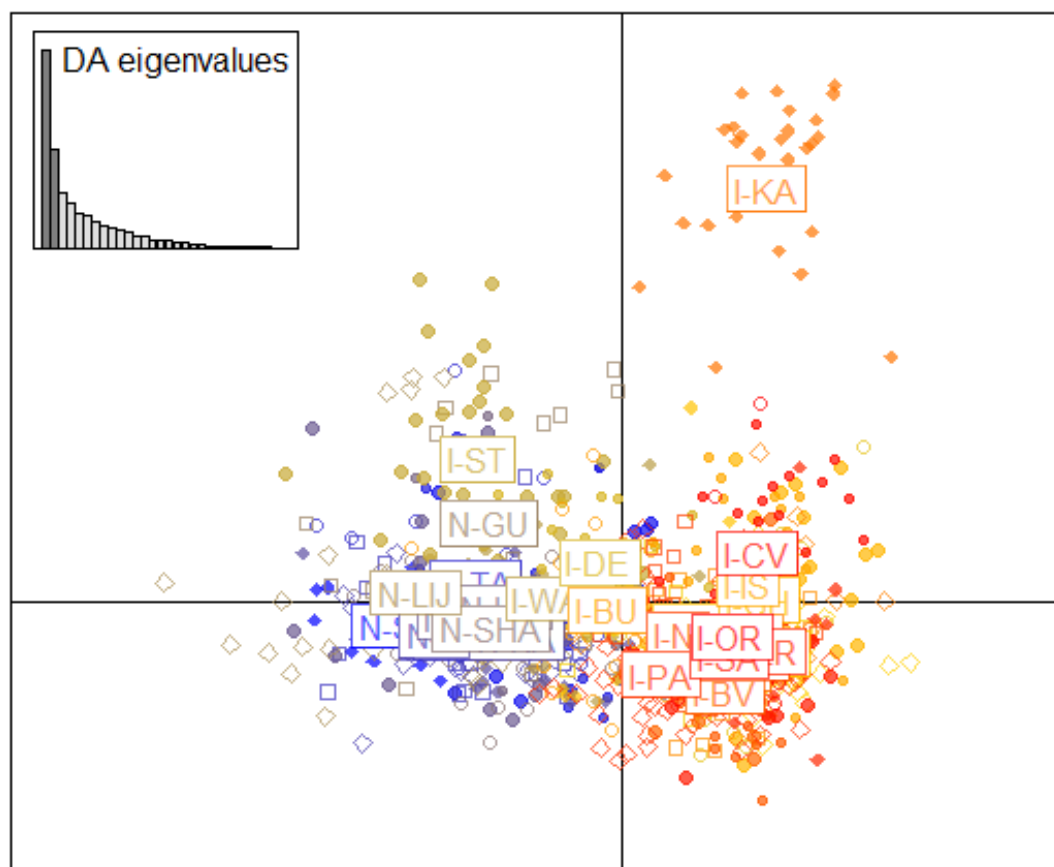


Figure S4. Discriminant Analysis of Principal Components (DACP) for the studied *Cydalima perspectalis* site samples. Blue cluster corresponds to native sampled populations, orange cluster corresponds to invaded sampled populations. For population codes see Table 1.

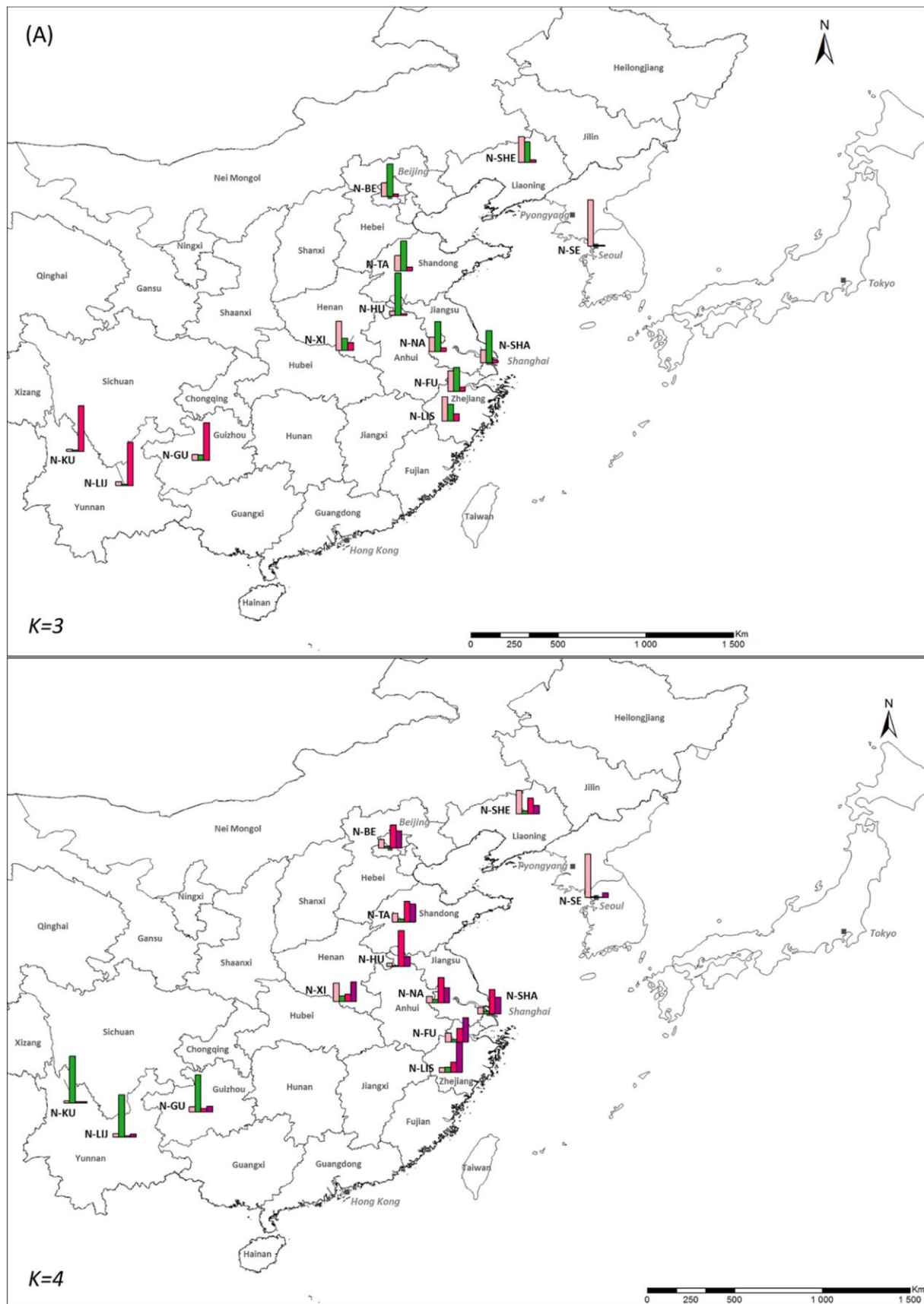


Figure S5. Geographic distribution of the genetic clusters identify with Structure software of *Cydalima perspectalis* in its native (A) and invasive (B) range. (A) Representation of the $K=3$ and $K=4$. (B) Representation of the $K=2$ and $K=7$. In (B) the countries presently invaded by *Cydalima*

perspectalis are figured in red. For population codes see Table 1. Country abbreviations are listed by year of first observation: (2007) DEU: Germany, CHE: Switzerland, NLD: Netherlands; (2008) FRA: France; (2010) ITA: Italy, BEL: Belgium; (2011) TUR: Turkey, HUN: Hungary, CZE: Czech Republic; (2012) HRV: Croatia, RUS: Russia; (2013) GRC: Greece and (2015) GEO: Georgia.

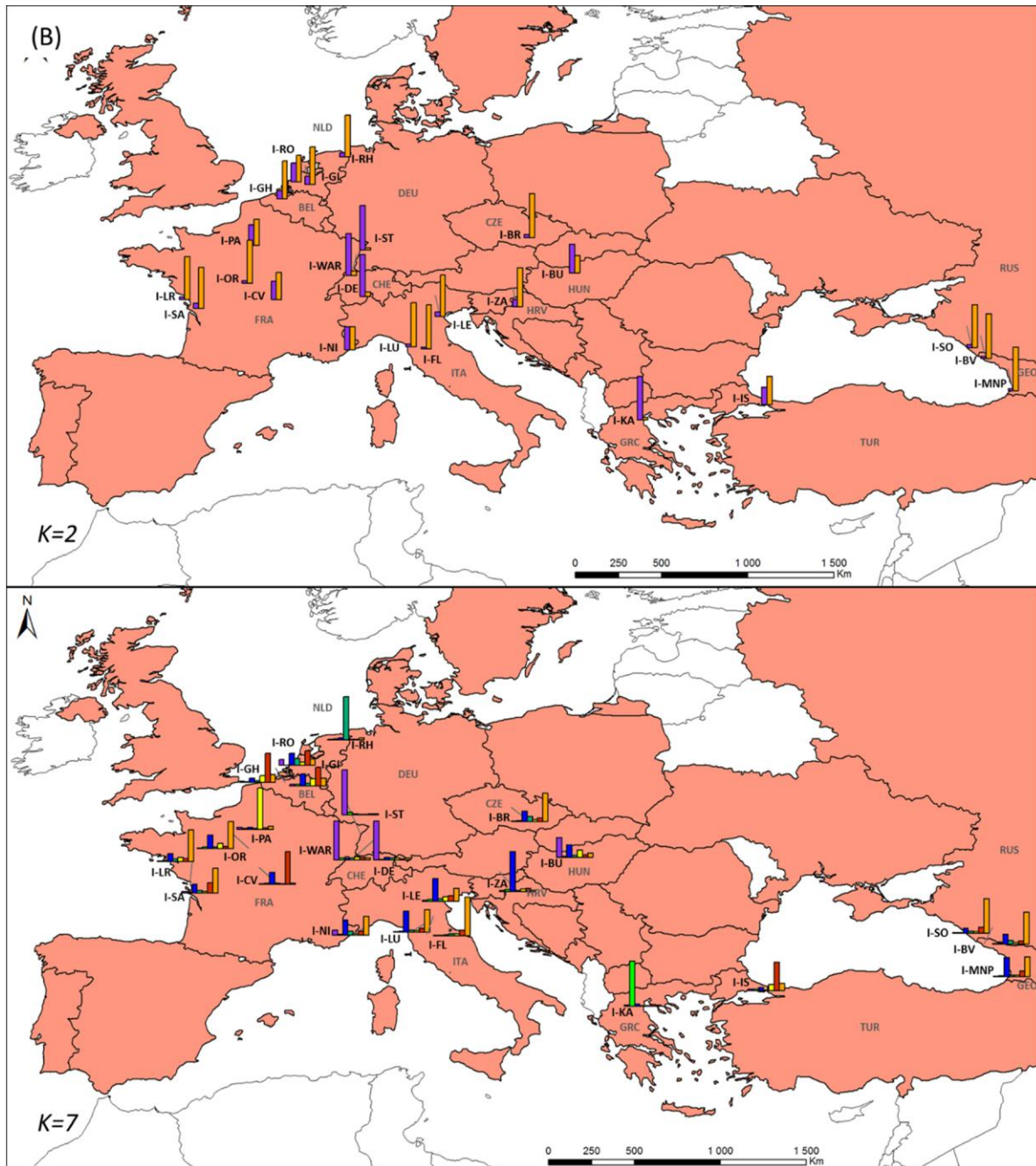


Table S1. Pairwise F_{ST} estimates between the populations of *Cydalima perspectalis* sampled in the native and invaded range.

Pop.	S. Korea			China			Europe and Asia Minor																						MN						
	SE	SHE	BE	TA	XI	HU	NA	FU	LIS	SHA	GU	LIJ	WA		R	ST	DE	GI	RH	LU	LE	GH	IS	BU	BR	ZA	KA	SO	BV	P	NI	PA	LR	SA	CV
N-SE	-																																		
N-SHE	0.06	-																																	
N-BE	0.08	0.02	-																																
N-TA	0.07	0.02	0.01	-																															
N-XI	0.08	0.02	0.02	0.02	-																														
N-HU	0.12	0.03	0.03	0.03	0.04	-																													
N-NA	0.09	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	-																												
N-FU	0.09	0.02	0.02	0.03	0.01	0.05	0.03	-																											
N-LIS	0.14	0.06	0.05	0.05	0.03	0.07	0.03	0.04	-																										
N-SHA	0.10	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.04	-																									
N-GU	0.12	0.08	0.06	0.08	0.08	0.12	0.08	0.06	0.09	0.07	-																								
N-LIJ	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.12	0.07	0.08	0.10	0.07	0.05	-																							
I-WAR	0.17	0.08	0.06	0.07	0.07	0.09	0.06	0.06	0.08	0.06	0.14	0.13	-																						
I-ST	0.21	0.12	0.12	0.13	0.13	0.12	0.12	0.14	0.13	0.12	0.19	0.16	0.11	-																					
I-DE	0.18	0.10	0.08	0.09	0.10	0.12	0.08	0.10	0.11	0.09	0.16	0.16	0.01	0.10	-																				
I-GI	0.18	0.11	0.08	0.11	0.11	0.15	0.08	0.11	0.11	0.10	0.11	0.14	0.11	0.19	0.13	-																			
I-RH	0.34	0.25	0.24	0.27	0.25	0.29	0.23	0.25	0.29	0.25	0.31	0.30	0.21	0.30	0.23	0.16	-																		
I-LU	0.21	0.14	0.12	0.15	0.15	0.19	0.11	0.15	0.16	0.14	0.16	0.18	0.13	0.21	0.14	0.05	0.19	-																	
I-LE	0.17	0.09	0.08	0.12	0.10	0.13	0.07	0.11	0.12	0.10	0.12	0.13	0.11	0.15	0.14	0.03	0.19	0.04	-																
I-GH	0.20	0.16	0.13	0.15	0.16	0.20	0.13	0.17	0.17	0.14	0.17	0.18	0.17	0.23	0.18	0.05	0.23	0.12	0.10	-															
I-IS	0.22	0.17	0.14	0.18	0.17	0.21	0.15	0.18	0.15	0.18	0.16	0.21	0.16	0.20	0.16	0.09	0.27	0.12	0.11	0.16	-														
I-BU	0.14	0.05	0.04	0.05	0.07	0.06	0.03	0.05	0.07	0.03	0.10	0.10	0.07	0.12	0.08	0.06	0.21	0.11	0.06	0.10	0.17	-													
I-BR	0.19	0.15	0.10	0.13	0.15	0.18	0.11	0.14	0.16	0.13	0.15	0.18	0.15	0.21	0.15	0.04	0.19	0.05	0.07	0.08	0.11	0.08	-												
I-ZA	0.22	0.13	0.12	0.15	0.15	0.17	0.11	0.13	0.15	0.13	0.15	0.15	0.13	0.22	0.17	0.08	0.25	0.08	0.07	0.17	0.17	0.09	0.13	-											
I-KA	0.37	0.27	0.26	0.28	0.30	0.32	0.29	0.28	0.28	0.29	0.25	0.28	0.26	0.26	0.24	0.26	0.37	0.31	0.28	0.32	0.25	0.26	0.30	0.29	-										
I-SO	0.21	0.15	0.13	0.15	0.16	0.18	0.10	0.15	0.15	0.14	0.16	0.19	0.16	0.22	0.17	0.04	0.21	0.06	0.07	0.09	0.11	0.10	0.03	0.17	0.33	-									
I-BV	0.17	0.14	0.12	0.14	0.15	0.18	0.11	0.15	0.18	0.13	0.16	0.19	0.18	0.25	0.19	0.06	0.23	0.08	0.08	0.09	0.16	0.10	0.05	0.17	0.38	0.04	-								
I-MNP	0.15	0.11	0.08	0.11	0.11	0.15	0.08	0.11	0.13	0.09	0.12	0.15	0.12	0.20	0.14	0.03	0.20	0.01	0.04	0.06	0.11	0.08	0.01	0.09	0.31	0.05	0.05	-							
I-NI	0.19	0.13	0.09	0.11	0.13	0.14	0.10	0.11	0.14	0.09	0.14	0.15	0.12	0.17	0.14	0.08	0.21	0.12	0.11	0.11	0.15	0.07	0.07	0.15	0.28	0.08	0.13	0.07	-						
I-PA	0.16	0.12	0.11	0.11	0.09	0.16	0.10	0.10	0.10	0.11	0.14	0.15	0.14	0.22	0.14	0.07	0.20	0.13	0.11	0.09	0.15	0.09	0.10	0.16	0.31	0.11	0.10	0.07	0.12	-					
I-LR	0.19	0.17	0.12	0.15	0.16	0.22	0.14	0.17	0.18	0.15	0.17	0.19	0.18	0.23	0.18	0.05	0.25	0.05	0.09	0.08	0.12	0.12	0.02	0.14	0.33	0.07	0.07	0.02	0.10	0.09	-				
I-SA	0.18	0.13	0.10	0.12	0.13	0.17	0.10	0.13	0.13	0.12	0.13	0.16	0.14	0.20	0.14	0.02	0.18	0.05	0.06	0.06	0.11	0.08	0.03	0.12	0.29	0.04	0.05	0.03	0.07	0.07	0.03	-			
I-CV	0.20	0.12	0.12	0.14	0.15	0.17	0.11	0.14	0.14	0.13	0.15	0.15	0.13	0.17	0.15	0.06	0.22	0.07	0.06	0.10	0.12	0.09	0.09	0.11	0.23	0.08	0.13	0.07	0.10	0.14	0.11	0.08	-		
I-OR	0.17	0.13	0.11	0.12	0.13	0.18	0.12	0.14	0.15	0.13	0.14	0.17	0.16	0.22	0.16	0.06	0.22	0.05	0.08	0.08	0.13	0.10	0.03	0.14	0.30	0.08	0.07	0.02	0.10	0.09	0.02	0.04	0.09		

Table S2. Posterior parameter estimation of founding effective population sizes $N_{inf_{iv}}$, introduction time t_i , bottleneck duration DB_i and the admixture rate (ra) for the Budapest population (I-BU).

Prior	mean	median	mode	q5%	q95%
t_{I-WAR}	43.20	43.80	51.00	33.90	51.00
t_{I-ST}	16.20	17.60	21.00	6.93	21.00
t_{I-GI}	37.20	36.90	37.10	31.10	44.80
t_{I-LU}	29.10	28.60	25.30	22.00	38.30
t_{I-BU}	28.90	29.10	34.00	19.20	37.90
t_{I-BV}	14.20	13.40	9.89	6.63	24.50
Db_{I-WAR}	4.68	2.99	0.00	0.00	15.20
Db_{I-ST}	16.20	17.60	21.00	6.93	21.00
Db_{I-GI}	11.30	11.50	11.90	1.79	20.10
Db_{I-LU}	12.00	12.60	21.00	1.97	20.50
Db_{I-BU}	4.69	2.97	0.00	0.00	15.40
Db_{I-BV}	12.60	13.30	21.00	2.14	20.90
$N_{inf_{I-WAR}}$	45.60	45.10	51.50	6.77	87.30
$N_{inf_{I-ST}}$	42.00	41.30	44.10	3.41	84.40
$N_{inf_{I-GI}}$	43.60	41.90	36.10	4.39	86.30
$N_{inf_{I-LU}}$	61.00	66.40	80.90	8.92	95.30
$N_{inf_{I-BU}}$	25.20	19.40	2.00	2.79	70.00
$N_{inf_{I-BV}}$	41.70	38.40	2.00	3.57	89.60
ra	0.50	0.50	0.53	0.20	0.79

Each posterior distribution was estimated using a polychotomous logistic regression based on 10000 simulated dataset closest to our real dataset.

4.4 La pyrale du buis : un nouvel exemple de complexité des routes d'invasion et d'expansion liées aux activités humaines

Le traçage des routes d'invasion de la pyrale du buis avec l'ADN mitochondrial et les marqueurs microsatellites a donc permis de souligner la complexité de son invasion en lien avec les activités humaines. Ces marqueurs présentent chacun des avantages et des inconvénients (Zhang & Hewitt 2003) mais permettent de tracer les routes d'invasion d'une espèce avec une certaine précision lorsqu'ils sont utilisés simultanément (Cheng et al. 2016). Dans notre cas, ils ont permis de cibler la partie Est de la Chine comme étant la source la plus probable des populations envahissantes observées en Europe. C'est également depuis cette zone qu'auraient été importés le frelon asiatique (provinces chinoises du Zhejiang ou du Jiangsu) (Arca et al. 2015) mais aussi la mouche des fruits *Drosophila suzukii* (entre les provinces du Zhejiang et de Laoning) (Fraimout et al. 2017). Dans le cas de l'agrite du frêne, *Agrilus planipennis*, introduit aux Etats Unis durant les années 2000, les populations envahissantes proviendraient de la province chinoise du Hebei et de la ville de Tianjin, situées dans la partie Nord-Est de la Chine (Bray et al. 2011). Cependant, un plus grand nombre d'exemples seraient nécessaires pour affirmer que la zone Est de la Chine est une zone à risque pour le transport d'insectes hors des frontières chinoises.

Les analyses ABC ont également permis d'avancer un effet tête de pont au sein même de l'Europe, un phénomène qui semble courant dans les invasions biologiques d'insectes (Lombaert et al. 2010, Boubou et al. 2012, Fraimout et al. 2017, Lesieur et al. 2018, Correa et al. 2018). Les introductions multiples associées au phénomène tête de pont et au brassage des populations ont certainement favorisé l'accroissement de la vitesse de propagation de l'insecte à travers l'Europe. Ces phénomènes avaient déjà été observés dans les cas de la punaise américaine *Leptoglossus occidentalis* (Lesieur et al. 2018), de la mouche des fruits *Drosophila suzukii* (Fraimout et al. 2017) ou de la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* (Lombaert et al. 2010, Lombaert et al. 2014), trois espèces présentant aussi une invasion fulgurante. Dans tous ces exemples, le rôle des activités humaines a été décisif aussi bien pour l'introduction que pour la dispersion de ces espèces envahissantes.

TRAITS DE VIE FAVORISANT L'INVASION ET L'EXPANSION

Les activités humaines jouent un rôle non négligeable dans l'introduction et la dispersion des espèces envahissantes (Wilson et al. 2009, Estoup & Guillemaud 2010, Essl et al. 2015). Cependant, les traits de vie de ces espèces peuvent également avoir un rôle clé à chaque étape du processus d'invasion (Kolar & Lodge 2001, Blackburn et al. 2011, Brouckhoff & Liebhold 2017, Renault et al. 2018), facilitant ou au contraire empêchant le passage à l'étape suivante. Les invasions biologiques sont étudiées depuis de nombreuses décennies (Elton 1958) et les facteurs impliqués dans le succès d'invasion d'une espèce, notamment sa capacité à envahir de nouveaux milieux, ont souvent été explorés chez les plantes (Van Kleunen et al. 2010), mais un peu moins chez les insectes (Brouckhoff & Liebhold 2017). Cependant, certains traits communs ont été proposés comme pouvant jouer un rôle positif dans le succès de l'invasion d'une espèce, qu'elle soit végétale ou animale : une forte fécondité, le lien avec les activités humaines (Van Kleunen et al. 2010), un régime alimentaire polyphage, un cycle rapide ou encore la capacité à éviter certaines contraintes environnementales (Sakai et al. 2001, Su 2013, Nahrung & Swain 2015). Dans le cas des insectes, la diapause et les capacités de dispersion sont deux processus leur permettant de s'adapter aux événements stochastiques de leur environnement et d'éviter certaines contraintes comme l'absence de nourriture ou des températures peu appropriées à leur développement (Ronce 2007, Pélisson et al. 2013, Nahrung & Swain 2015).

Dans le cas de la pyrale du buis, les activités humaines ont permis son introduction depuis la Chine vers l'Europe et ont également favorisé sa propagation au sein de l'aire envahie. Cependant, pour mieux appréhender leur rôle dans son invasion fulgurante, il est important de distinguer ce qui est du ressort de l'insecte lui-même. En effet, certains traits biologiques ont pu faciliter son introduction tout comme le succès et la rapidité de son invasion. C'est potentiellement le cas de sa forte fécondité, sa reproduction multivoltine, ses capacités à disperser naturellement ou encore sa capacité à passer la contrainte hivernale grâce à la diapause (**Chapitre 2**, Nacambo et al. 2014, Wan et al. 2014).

Au regard de la vitesse d'expansion de *C. perspectalis*, j'ai fait l'hypothèse que les traits de vie des différents stades (adultes et larves) ont été un facteur facilitateur pour la dispersion. Les capacités de vol des papillons pourraient en effet expliquer sa dispersion à l'échelle locale et favoriser le succès de son établissement. De plus, le nombre de générations variant de 2 à 4 dans la zone envahie, il m'est apparu nécessaire de vérifier l'existence d'une plasticité dans la sortie de diapause chez *C. perspectalis*. Cette diapause facultative a probablement pu jouer un rôle important dans l'établissement de l'insecte dans la zone envahie en lui permettant de passer l'hiver dans de nouvelles conditions environnementales pas toujours favorables.

Dans un premier temps, j'ai donc cherché à comprendre la part de la dispersion active de l'insecte dans sa dispersion fulgurante en Europe. Pour tester l'hypothèse présentée dans le **Chapitre 2**, j'ai choisi de mesurer à chaque génération les capacités de vol d'une population de la Région Centre-Val de Loire à l'aide d'un manège de vol. Bien que ne reflétant probablement pas

exactement la dispersion de l'insecte en pleine nature, cette technique permet d'estimer ses capacités réelles en laboratoire et en conditions contrôlées. Cette étude est présentée dans le **Chapitre 5** et fera l'objet d'un article scientifique (*Article IV*). L'article est précédé d'un résumé en français.

Dans un deuxième temps, j'ai cherché à comprendre le rôle de la diapause hivernale facultative dans le succès de l'invasion de la pyrale du buis. En effet, ce mécanisme permet aux insectes de passer la mauvaise saison et de reprendre leur activité quand les conditions sont plus favorables. Pour appréhender l'existence d'une plasticité dans la sortie de diapause des jeunes larves de pyrale du buis, je me suis intéressée aux mécanismes -encore inconnus- qui régulent ce phénomène. J'ai donc choisi de tester l'impact de deux facteurs environnementaux : la photopériode, facteur majeur de l'induction de la diapause chez cette espèce et la température, facteur secondaire de l'induction (Maruyama & Shinkaji 1993, Xiao et al. 2011, Nacambo et al. 2014). Cette étude correspond au travail de stage de Master 2 de Laura Poitou, que j'ai co-encadrée avec un chercheur de l'URZF, Mathieu Laparie, dans le cadre de cette thèse et dont les résultats généraux sont présentés dans le **Chapitre 6**.

Chapitre 5

Capacités naturelles de dispersion des populations envahissantes de la pyrale du buis



5.1 Pourquoi et comment étudier les capacités de vol dans le cas des invasions biologiques

La dispersion est un processus important dans l'évolution d'une espèce (Zera & Denno 1997). Elle va influencer son écologie, l'évolution et la dynamique de ses populations à travers les flux de gènes et la démographie (Bruzzone et al. 2009, Chapman et al. 2011, Fischbein et al. 2018). Elle a un impact direct sur la survie des populations car le vol permet, entre autres, de localiser le partenaire sexuel, d'accéder à la ressource alimentaire et de s'adapter aux changements de l'environnement en colonisant de nouveaux habitats (Menocal et al. 2018, Minter et al. 2018). De ce fait, la dispersion d'une seule espèce va aussi impacter les interactions entre espèces et les communautés d'espèces (Zera & Denno 1997, Ronce 2007). Cela est d'autant plus vrai dans le cas des espèces envahissantes qui peuvent déplacer ou supplanter une ou plusieurs espèces locales et/ou perturber tout un écosystème (Vaes-Petignat & Nentwig 2014) par les dégâts qu'elles occasionnent, ce qui est le cas de *C. perspectalis* (Mitchell et al. 2018). Plus généralement, connaître les capacités de vol d'une espèce permet de mieux comprendre sa dynamique spatiale (Robinet et al. 2012), d'adapter des stratégies de conservation dans le cas d'espèces menacées (Ronce 2007, Torriani et al. 2010) et d'aider à la gestion et à la prévention dans le cas de ravageurs ou d'insectes envahissants (Ávalos et al. 2016, Robinet et al. 2018).

Il existe différentes méthodes directes et indirectes pour étudier la dispersion d'un insecte et les facteurs qui peuvent influencer cette dispersion, comme la morphologie, l'âge, l'environnement ou encore la génétique (Minter et al. 2018). Les méthodes directes se basent sur l'observation de l'espèce dans son milieu naturel. Elles peuvent correspondre à une compilation de données historiques sur l'invasion d'une espèce ou sur le front de colonisation. Il existe également des techniques permettant d'estimer la dispersion comme les méthodes de « capture-marquage-recapture » (cf. 5.2.1) ou les radars (cf. 5.2.2). Les méthodes indirectes permettent l'estimation de la dispersion en dehors du milieu naturel. L'approche génétique peut être utilisée pour estimer les flux de gènes entre populations et déterminer le taux de migrants. Cela nécessite d'avoir un échantillonnage exhaustif et une bonne définition de l'échelle populationnelle mais cela ne permet pas de calculer des distances précises. Les caractéristiques de vol des insectes peuvent être étudiées par des techniques de manège de vol (cf. 5.2.3) qui permettent d'estimer en laboratoire différents paramètres tels que la vitesse ou la distance parcourue.

5.2 Les différentes méthodes pour estimer les capacités de vol

5.2.1 Capture-Marquage-Recapture

La méthode de capture-marquage-recapture est utilisée depuis longtemps pour estimer les déplacements et les capacités de dispersion des espèces (Hopper 1991, Plant & Cunningham 1991, Bloem et al. 1998). Elle permet d'étudier le comportement de dispersion de l'insecte dans

un environnement donné et d'avoir une estimation de la distance parcourue en fonction de différents paramètres biologiques (*e.g.* sexe, accouplement, nutrition) (Bloem et al. 1998, Ávalos et al. 2016). Cependant, les capacités maximales d'une espèce peuvent être difficiles à mesurer (Margaritopoulos et al. 2012) car les capacités estimées dépendent du rayon de capture mis en place, de la densité de pièges et du nombre d'individus recapturés qui est souvent faible (Showers et al. 2001, Ávalos et al. 2016). Il est donc possible de ne pas intercepter des individus très dispersés ou de sous-estimer leur nombre. De plus, la phase de recapture nécessite l'identification des molécules chimiques qui sont attractives pour l'insecte, comme les phéromones sexuelles. Dans le cas de la pyrale du buis, la molécule attractive est connue uniquement pour les mâles (Kawazu et al. 2007). Par conséquent, je n'ai pas retenu cette méthode pour nos expériences.

5.2.2 Les radars

Le développement des nouvelles technologies permet d'obtenir des techniques plus efficaces et précises, comme les radars, pour étudier la dispersion d'un organisme dans son milieu naturel (Chapman et al. 2011). Les mouvements d'un organisme peuvent ainsi être suivis pendant un temps donné en limitant les interactions avec le manipulateur, qui peuvent parasiter sa dispersion. Les radars permettent aussi d'étudier les phénomènes de migrations chez les espèces en fonction de leur environnement (Chapman et al. 2011, Fu et al. 2017). Cependant, le rôle des différents types de comportements, qu'ils soient alimentaires ou reproductifs est difficile à étudier avec cette technique (Minter et al. 2018), notamment quand ils sont mal connus. De plus, ces techniques restent assez coûteuses et pas toujours faciles à mettre en place surtout quand les organismes sont de très petite taille. Des avancées ont été faites sur la taille des récepteurs pour pouvoir adapter la méthode à de nombreux insectes (Chapman et al. 2011) et de nouvelles techniques de radars continuent d'être développées (Stepanian et al. 2016). Cependant, elles restent plutôt utilisables chez des insectes de grande envergure (Minter et al. 2018), ce qui n'est pas le cas de la pyrale du buis.

5.2.3 Le manège de vol

Le manège de vol est une méthode utilisée depuis très longtemps pour estimer les capacités de dispersion des insectes en conditions contrôlées (Ito 1979, Bruzzone et al. 2009, Minter et al. 2018). Le principe est d'attacher un insecte à une tige horizontale en carbone qui est fixée sur un axe à l'aide d'un roulement à bille (Figure 12). Des capteurs de type émetteur-récepteur infra-rouge sont reliés à un ordinateur. Lorsque l'insecte s'envole, il entraîne le bras qui passe devant les capteurs, ce qui enregistre son passage. Chaque passage est ensuite converti en distance. Cela permet d'avoir une estimation assez précise de différents paramètres comme la vitesse, les fréquences de vol ou la distance parcourue pendant un temps donné (Cooter & Armes

1993, Bruzzone et al. 2009). Le manège de vol permet en outre de comparer les performances de vol sous différentes conditions de température, humidité ou lumière en laboratoire (Sarvary et al. 2008, Fu et al. 2017) mais aussi d'estimer l'impact de différents facteurs biologiques sur les capacités de vol des insectes comme le sexe (Hughes & Dorn 2002), l'accouplement (Schumacher et al. 1997), l'âge (Coombs 1997) ou encore la saison (Lesieur 2014). Cependant, cette méthode présente des biais notamment en empêchant certains insectes d'adapter leur type de vol (Jones et al. 2016). Il ne prend en compte ni l'utilisation du vent par les insectes pour voler (Minter et al. 2018), ni l'existence des signaux présents dans la nature qui peuvent influencer leur décollage (Hughes & Dorn 2002). Cela a notamment été démontré pour le capricorne asiatique, *Anoplophora glabripennis*, qui requiert un support pour pouvoir s'envoler (Javal et al. 2017b). De plus, l'absence de contact avec le sol peut plus facilement inciter l'insecte à voler et par conséquent surestimer ses capacités de vol (Bruzzone et al. 2009, Péliisson et al. 2013, Sauvard et al. 2018). Malgré ces inconvénients, j'ai choisi cette technique, couramment utilisée chez les Lépidoptères (Schumacher et al. 1997, Sarvary et al. 2008, Fu et al. 2017), pour toutes les informations pertinentes qu'elle peut apporter sur la dispersion de la pyrale du buis.

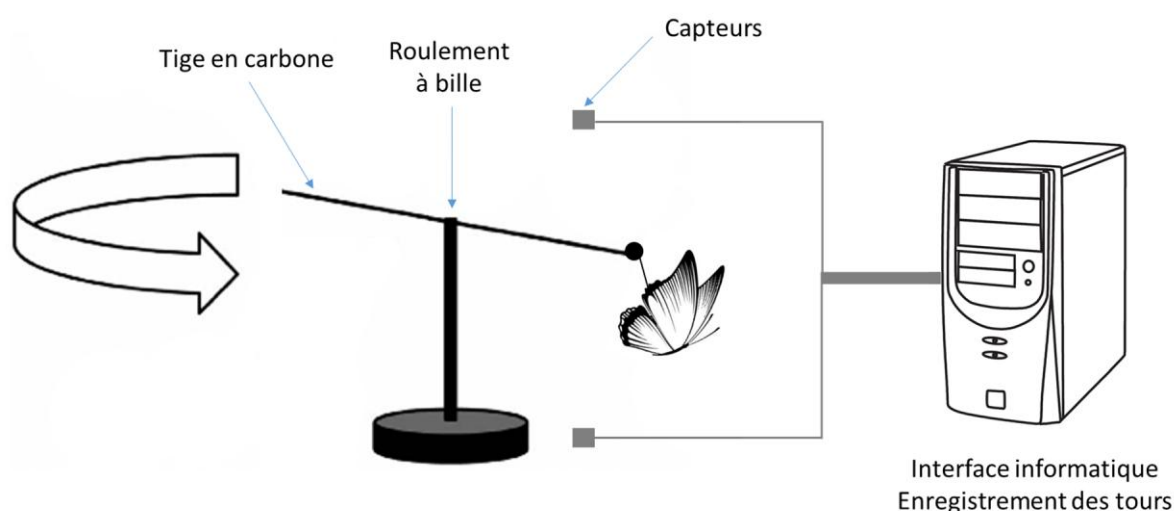


Figure 12. Schéma de fonctionnement d'un manège de vol.

5.3 Estimation des capacités de vol de la pyrale du buis

Contexte

La rapidité de l'invasion de *C. perspectalis*, à l'instar de celle d'autres insectes introduits en Europe après les années 1990 (Roques et al. 2016), interroge sur les mécanismes impliqués dans sa propagation. L'apport de la génétique a permis de souligner le rôle important des activités humaines dans l'introduction et dans la dispersion de la pyrale du buis (Article I et III), ainsi que

cela a été avancé pour d'autres insectes envahissants à la propagation fulgurante (Lombaert et al. 2014, Fraimout et al. 2017, Lesieur et al. 2018). Cependant, connaître les capacités de dispersion propres à *C. perspectalis* s'est avéré nécessaire pour mieux comprendre ce qui relève du rôle de l'Homme dans son expansion. Des premières études avaient permis d'estimer ses capacités de dispersion à 5 à 10 km par an grâce au suivi annuel de l'expansion des premières populations envahissantes allemandes (Van der Straten & Muus 2010, Casteels et al. 2011).

Au vu de ces estimations, j'ai fait l'hypothèse que les capacités de dispersion de l'insecte pouvaient expliquer son expansion à l'échelle locale mais pas à une échelle plus large. Pour tester cette hypothèse, j'ai cherché à estimer ses capacités de vol en laboratoire. J'ai également essayé de voir si certains facteurs biologiques comme le sexe, la possibilité d'accouplement, l'âge ou la génération pouvaient avoir un effet sur sa dispersion.

Approche utilisée

Le manège de vol a déjà été développé à l'URZF et utilisé pour plusieurs insectes envahissants comme le capricorne asiatique *Anoplophora glabripennis* (Javal et al. 2017b), la punaise américaine *Leptoglossus occidentalis* (Lesieur 2014), ou encore le frelon asiatique *Vespa velutina* (Sauvard et al. 2018). Les manèges existants ont donc été adaptés pour mesurer les capacités de vol de la pyrale du buis.

Afin d'estimer les distances maximales pouvant être parcourues par *C. perspectalis* au cours de sa vie, des adultes de chacune des 3 générations (génération diapausante G1 et les deux générations observées en été G2-G3 ; Figure 5, **Chapitre 2**) ont été collectés en région Centre-Val de Loire et testés en manège de vol durant l'année 2017.

Les adultes vivent une quinzaine de jours. Dans la nature, les activités d'alimentation, d'accouplement et de ponte ayant lieu préférentiellement la nuit (Kawazu et al. 2010b), les adultes ont été testés durant la nuit depuis leur émergence jusqu'à la mort. J'ai défini 2 expérimentations sur 5 nuits pour voir l'impact d'une période de vol plus ou moins intense (possibilité d'alimentation et de repos) pour les 2 sexes. Les insectes ont été testés en manège de vol : (i) pendant 2 nuits suivies par une nuit de repos puis de nouveau pendant 2 nuits ou (ii) en continu pendant 5 nuits (Figure 13). A l'issue des 5 nuits, tous les insectes ont eu 2 jours de repos.

L'établissement de nouvelles populations est dépendant des femelles et de leurs capacités à se reproduire. C'est pourquoi j'ai cherché à estimer les conséquences possibles d'un accouplement sur le vol. La première expérimentation de 5 nuits laissait moins d'occasions aux femelles pour pondre. L'effet d'un possible accouplement a donc été testé au sein de la première expérimentation sur une partie des femelles (Figure 13). Les femelles atteignant leur maturité sexuelle au bout de 2 à 3 jours, j'ai sélectionné en majorité des femelles ayant volé 2 nuits avant l'accouplement (72%), et 4 nuits quand cela n'était pas possible. Celles-ci ont été placées au contact de mâles pendant 2 nuits puis testées de nouveau en manège de vol. Pour une simplicité

de lecture, elles seront appelées 'supposées accouplées' et les autres femelles de l'expérience 1 seront appelées 'vierges' par la suite.

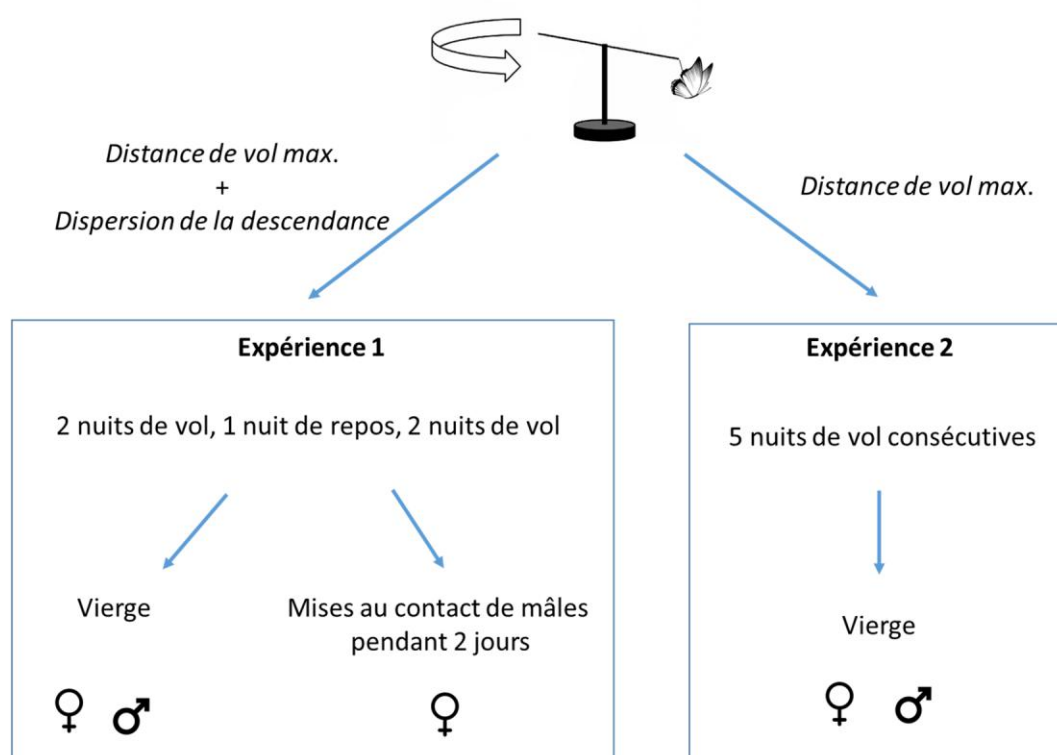


Figure 13. Schéma des protocoles expérimentaux mis en place pour estimer la distance parcourue par les adultes des 2 sexes de *C. perspectalis* et les conséquences de la possibilité d'accouplement.

Résultats majeurs

L'utilisation des manèges de vol a permis d'obtenir une mesure standardisée des capacités maximales de dispersion de la pyrale du buis. Celles-ci sont supérieures aux 5 à 10 km estimés dans la littérature (Van der Straten & Muus 2010, Casteels et al. 2011). Les insectes ont été capables de parcourir en moyenne 4,6 km durant une nuit pour les femelles et 3,9 km pour les mâles, et 20 km pour les femelles et 12 km pour les mâles au cours de leur vie. Cependant, j'ai observé une durée de vie plus courte que celle estimée dans la littérature (environ 15 jours ; Maruyama & Shinkaji 1987, Tabone et al. 2015). Au bout d'une semaine de vol en manège, seulement un quart des insectes étaient encore en vie, ce qui laisse penser que les conditions testées n'étaient pas optimales pour leur survie. Des expérimentations complémentaires sont en cours pour tester l'effet du nombre de nuits de vol sur la survie (e.g. 1 demi nuit, 1 nuit par semaine). Néanmoins, il est probable que le temps nécessaire à l'insecte pour parcourir les distances mesurées ait été sous-estimé. En effet, l'absence de contact avec le sol peut pousser certains insectes à voler plus que ce qu'ils feraient sans être attachés (Minter et al. 2018). Mais il

est possible que dans la nature, l'insecte puisse parcourir ces distances de manière plus étalée au cours de sa vie, en absence de prédation.

Les sexes ne diffèrent pas significativement pour leur capacité de vol bien qu'une tendance à une dispersion plus faible sur toute la durée de vie ait été notée chez les mâles. Cette tendance pourrait être due à la différence de longévité observée entre mâles et femelles, celles-ci ayant été testées en moyenne 4,7 fois alors que les mâles l'ont été seulement 3,2 fois. Les distances maximales enregistrées au cours de la vie des insectes sont élevées (70 km) et 25 % des femelles sont capables de parcourir plus de 30 km pour la génération diapausante (G1) et la première génération d'été (G2) suggérant, malgré les limites de nos expérimentations, qu'une fraction de la population est capable d'effectuer de longs vols.

La comparaison des distances moyennes parcourues par nuit a montré une diminution statistiquement significative des capacités de vol des femelles de la génération diapausante (G1) jusqu'à la deuxième génération d'été (G3). Cette différence significative a également été observée pour les mâles mais uniquement pour la deuxième génération d'été (G3). Des variations de certains traits biologiques de *C. perspectalis* comme la reproduction ou le taux de développement ont aussi été observées entre générations. Il semblerait que la génération diapausante (G1) présente une meilleure fécondité (Wan et al. 2014) et un meilleur développement larvaire (Leuthardt et al. 2013). Cependant, toutes ces observations doivent encore être confirmées pour déterminer le réel effet, bénéfique ou non, de la génération diapausante par rapport aux autres générations.

Enfin, j'ai aussi essayé d'appréhender la possibilité d'accouplement sur le vol. Les résultats suggèrent que les femelles supposées accouplées ont de meilleures capacités de vol que les femelles vierges de l'expérience 1, ce qui a déjà été observé chez quelques Lépidoptères (Elliott & Evenden 2009). Cependant, peu de femelles ont pondu au cours de cette expérimentation (pas plus de 10 œufs alors que l'insecte est capable de pondre jusqu'à 800 œufs; Maruyama & Shinkaji 1987, Wan et al. 2014, Tabone et al. 2015). Il est possible que la méthodologie employée soit responsable de ce biais. En effet, la forte densité de population en Région Centre-Val de Loire m'a permis de collecter les insectes mais augmentait le risque d'avoir des œufs pondus par des individus sauvages sur les branches de buis. Par conséquent, j'ai choisi de plutôt mettre une surface lisse puisque les femelles d'élevage pondaient autant sur le buis que sur les surfaces lisses des cages (A. Bras, pers. obs.). Cependant, des expérimentations complémentaires encore en cours semblent suggérer que l'absence de buis aurait impacté négativement la ponte des femelles. De plus, l'importance à la fois du nombre et de la durée des nuits de vol auxquels les femelles ont été soumises a pu également impacter négativement la ponte (Zera & Denno 1997). En effet, dans le cas de 2 espèces de Lépidoptères, *Ostrinia furnacalis* (Shirai 1998) et *Plutella xylostella* (Shirai 1995), le nombre d'œufs pondus diminuait quand le temps de vol en manège était augmenté.

Article IV

*Flight performance of the highly invasive box tree moth *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae).*

Bras A., Auger-Rozenberg M.-A, Rousselet J., Roques A., Sauvard D.

Ecological Entomology (en préparation)

**Flight performance of the highly invasive box tree moth
Cydalima perspectalis (Lepidoptera: Crambidae)**

¹Audrey Bras, ¹Marie-Anne Auger-Rozenberg, ¹Jérôme Rousselet, ¹Alain Roques, ¹Daniel Sauvard

¹INRA, UR633 Unité de Recherche de Zoologie Forestière, 2163 Avenue de la Pomme de Pin, CS 40001 ARDON 45075 ORLEANS Cedex 2, France

Corresponding author : Audrey Bras, UR633 Unité de Recherche de Zoologie Forestière, 2163 Avenue de la Pomme de Pin, CS 40001 ARDON 45075 ORLEANS Cedex 2, France, +33 2 38 41 80 21, audreyb061992@gmail.com

Abstract

1. The box tree moth, *Cydalima perspectalis*, is a non-native species originating from East Asia. It was first recorded in 2007 in Germany and in less than ten years colonized Europe to Asia Minor. In its introduced area, this multivoltine species causes a lot of damage on *Buxus* plants in urban and forest areas. Its fast expansion could result from human-mediated dispersal as well as insect self-mediated dispersal.

2. To understand the role of self-mediated dispersal, we have assessed flight capability of *C. perspectalis* by using computer-monitored flight mills. We estimated the distance flown per night and during the insect lifetime for both sexes and for the three generations observed in France.

3. Our results show that the insect was able to fly on average 20 km during its lifetime. No effect of sex on flight performance was found. However, adults from the overwintering generation presented the highest flight capacities whereas moth from the third generation had the lowest flight capacities.

4. It is likely that insect self-mediated dispersal can explain local dispersion, whereas the fast expansion into Europe and Asia Minor was probably due to human-mediated dispersal. This study gives a first overview of *C. perspectalis* flight capacities, and will be useful to inform management strategies.

Keywords: *Cydalima perspectalis*, *Buxus*, invasion, insect, flight mill, flight capacities.

Introduction

Biological invasions are recognized as a major component of global change, threatening biodiversity, public health and economy (Sakai et al., 2001; Simberloff et al., 2013). Global trade, travel and tourism lead to both intentional and accidental transport of many species outside their native range (Perrings et al., 2005; Hulme, 2009). In Europe, introduction of non-native species, especially insects, is still increasing without saturation (Seebens et al., 2017). Since twenty years

ago, non-native insect species entering Europe have expanded quickly after establishment, probably due to the recent liberalization of trade and travel which may facilitate dispersal across Europe (Roques et al., 2016). Dispersal is a key factor in invasion processes (Wilson et al., 2009; Blackburn et al., 2011; Renault et al., 2018) and affects the degree of damage that a non-native insect can cause. Human activities provide vectors for dispersion which may accelerate spatial expansion of non-native species after their introduction (Estoup & Guillemaud, 2010; Garnas et al., 2016). Species self-mediated dispersal can also facilitate establishment and expansion phases as individuals search for food, reproductive partners and new habitats (Bowler & Benton, 2005). As a result, it is difficult to distinguish the contributions of non-native species themselves from human-mediated dispersal in the spread process (Essl et al., 2018). Hence, separating self-mediated dispersal from human-mediated dispersal is required to understand and predict both species expansion and distribution (Robinet et al., 2012, 2016) and to improve non-native species management (Robinet et al., 2018).

The box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae), is an Asian native pest of *Buxus* species (Maruyama & Shinkaji, 1991; Kawazu et al., 2010a; Wan et al., 2014). Its native range includes Japan, Korea and China. In Europe, the insect was first recorded in 2007 in Germany (Krüger, 2008). *C. perspectalis* exhibits two adult morphs: a dominant white morph and a less represented melanic morph (Göttig & Herz, 2017). It has from two to four generations per year and overwinters as young larvae in *Buxus* trees (Nacambo et al., 2014; Göttig & Herz, 2017). No efficient natural enemies are known in Europe, leading to population outbreaks. *Buxus* mortality results from repeated attacks by larvae feeding on leaves and bark of trees (Casteels et al., 2011; Nacambo et al., 2014). In several countries, the box tree moth was first recorded in urban areas on ornamental box trees and then moved to natural forests, causing severe defoliation on native *Buxus* species such as *B. sempervirens* and *B. colchica* (Kenis et al., 2013; Gninenko et al., 2014; Mitchell et al., 2018). Thus, this insect represents a threat for *Buxus* trees commonly planted as ornamentals in historical, public and private gardens as well as for natural forest stands in southern Europe and in the Caucasus region (Di Domenico et al., 2012; Kenis et al., 2013; Mitchell et al., 2018).

The box tree moth expansion is representative of the fast spread observed for non-native insects entering Europe after the 1990's (Roques et al., 2016). During the last ten years, it has spread all across Europe until Asia Minor, and it is presently recorded from more than 30 countries (Nacambo et al., 2014; Bras et al., XX). The species was probably introduced in Europe with an infested *Buxus* shipment coming from China (EPPO 2012; Kenis et al., 2013), and internal trade within Europe could account for its fast expansion (EPPO 2012; Bras et al., XX). A survey of its spread in Germany during the first years of observation indicates that natural dispersal should be about 5 to 10 km per year (Van der Straten & Muus, 2010; Casteels et al., 2011). *C. perspectalis* is a nocturnal moth and is normally active all night with a peak of activity two hours after the beginning of dark and a decrease two hours before the end of night (Kawazu et al., 2010b). However, to our knowledge, the flight performance of *C. perspectalis* has never been studied.

In the field, characterization and comparison of flight behavior of wild insects is difficult. Hence, several techniques are used to study insect dispersal such as computerized flight mills, which allow estimation of the flight performance of a tethered insect under controlled conditions in the laboratory (Bruzzone et al., 2009; Minter et al., 2018). This method has several advantages, notably its ability to compare flight performance in different conditions and to assess the influence of factors such as wing color (Davis et al., 2012), age (Coombs, 1997), sex (Hughes & Dorn, 2002) and mating status of adults on flight capacities (Schumacher et al., 1997). Such experimentation has been widely used to assess other Lepidoptera species' flight performance (e.g. Hughes & Dorn, 2002; Shirai, 2006; Yang et al., 2017; Qin et al., 2018) as well as for non-native species (e.g. Sarvary et al., 2008; Hoddle et al., 2015; Lopez et al., 2017; Sauvard et al., 2018). Nevertheless, results need to be considered with caution as insects do not have to support their own weight and do not perceive environmental stimuli. They can also be forced to fly because of lack of tarsal contact with substrate (Sauvard et al., 2018). Despite these shortcomings, flight mills can be useful for defining maximum flight capacities and to acquire precise data on flight activity.

In this study, we aim to assess the flight performance of invasive populations of the box tree moth to (i) characterize its flight capacities and (ii) investigate the effects of sex, age and generation on these flight capacities. For this purpose, we used a computerized flight mill approach for each generation of French populations of *C. perspectalis*. The results will help us to understand the impact of insect active flights on *C. perspectalis* expansion and to develop more efficient strategies to control this species threatening *Buxus* species in Europe (Mitchell et al., 2018).

Materials and methods

Insect collection and rearing

All insect collections were carried out in urban areas during the year 2017 in the French region Centre-Val de Loire where observations of the moth started in 2014. The stage collected was last instar larvae for each generation sampled. Collections were carried out in Saint-Denis-sur-Loire for the overwintering generation (G1), in both Olivet and Lamotte Beuvron for the second generation (G2), and in Lamotte Beuvron for the last generation (G3) (Table 1). Sampled insects were brought back to the laboratory, put in plastic boxes of 29cm x 28cm x 9cm with box tree branches and reared until the end of pupation at 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), with a photoperiod of 16:8 LD and 70% of humidity for each generation. Adult emergences were checked every morning, and emerged moths were taken out of the box. White morphs were the most common morph and were chosen randomly and prepared for flight mill experimentations. We obtained fewer individuals of the melanic morphs, so they were only used in mating. Males and females were separated in order to avoid mating, labelled and kept in screen cages of 30cm x 30cm x 30cm.

Flight mills

The flight mill design matched the design described by Sauvard et al (2018). Briefly, the base of the flight mill was a cast iron support stand into which we screwed a threaded shaft. A hole was drilled into the top of the shaft, and we inserted a 3-mm pin upon which a miniature ball bearing was placed. A carbon-fiber arm was then attached to the ball bearing which both minimizes friction and allows the arm to rotate easily. A small foam block was glued to one end of the arm. Two tiny pins were left in the foam and were used to secure the insect tether to the apparatus. The foam was located such that an insect traveled 2 m per lap. The movement of the carbon-fiber arm was monitored using a computerized system with an infrared emitter and detector connected to a PCI board installed in a computer. Triangular pieces of paper were taped to the center of the arm to trigger the motion detection system. When the arm cut the beam between the emitter and the detector, an electrical signal was sent to the PCI board. An application written in C++ detected and time-stamped these signals and wrote the resulting data into log files. Insect flight activity was thus precisely recorded. The flight mills were kept in the laboratory and placed on shelves. They were located in three rooms. 32 computerized flight mills were available for testing flight capacities of moths from G1 and G2, and 16 flight mills were available to test insect flight capacities for G3. As the box tree moth is nocturnal, lights were switched off during flight tests.

The insects were tethered to the flight mill with a piece of Bristol paper with a small piece of foam glued at one end of the tether with cyanoacrylate glue (Diall®). After emergence, insects were labelled and put in 3°C for one hour. After this time, insects were inactive and bristles on the thorax were removed. The tether was then glued on the top of the thorax using neoprene adhesive gel (Diall®) with the foam part placed above the insect's head. Precautions were taken to avoid putting glue on insect wings. The moths were tethered to the flight mill arm with the pins. The tether position allowed females to lay their eggs. When the tether was loose, it was glued again on insect thorax. The tether was left on the insect thorax until insect death.

Flight performance measurement

The first experiment (A-normal) was as follows: 2 consecutive nights of tests, one night of rest, 2 consecutive nights of tests and 2 consecutive nights of rest. A subset of the tested females (minimum 3 days old) for G1 were placed alone with untested males during the two consecutive nights of rest to allow mating (Table 2). These females were then tested again in flight mills with the same experimental design, and the presence of eggs was checked every day. As no eggs were observed, we supposed that the insects needed competition to favor mating (personal observation). Therefore, three or four females (min. 3 days old) were put together with untested males in a cage during two nights for G2 and G3, tested in flight mills during August and October 2017 respectively. Females were then tested again in flight mills with the same design. After the two nights with males, females were put in separate cages and the presence of eggs inside cages

was checked every evening. For simplification, we called females which had the occasion to mate during two days “supposed mated” and the other females “virgin”. The second experiment (B-intensive) was as follows: five consecutive nights of tests following by 2 nights of rest. The females were labelled Fi.

Whatever the experiment (A or B), both sexes were tested until insect death for each generation. Box tree moth natural dispersal is directly dependent on the flight capacity of the females so we used more females than males in flight mill experiments. No moths with unexpanded or wrinkled wings were used. Insects were changed between flight mill rooms at every test in order to minimize a room effect. The tests were done during the night from the end of the day until the early morning. The flight tests lasted about 16 hours (± 2 hours). No attempt was made to stimulate flight, and the insects were not fed during the flight tests. The flight tests were performed at room temperature. Each insect was weighed before and after flight measurement to estimate mass loss. Then, they were fed every day in the morning with cotton saturated with a 30% honey solution and were given water.

Data analysis

Ruby scripts were developed to analyze the logs recorded by the flight mill system. The log from each flight test was cleaned and divided into different phases. Active phases occurred when moths were moving and were separated by rest phases. Rest phases were defined as no flight for at least 5 seconds and we determined their number by test. For each phase, the scripts computed distance, duration and speed.

All the statistical analyses were performed using R software (version 3.3.3) with a 95% confidence level. We calculated the distance covered during a test and during insect entire life. All the distance flights were estimated with active phases. Data were analyzed using standard ANOVAs. As each moth was tested several times, statistical tests could be biased due to autocorrelation. To deal with this issue, flight test data were summarized per insect before statistical tests, or, if not usable, we used a mixed model ANOVA including the insect identity as a random effect. We used generalized linear mixed models to test the effects of sex, treatment, locality, weight and generation on daily distance flown and total distance flown during insect lifetime. Moreover, to compare daily distance flown with other parameters, we focused on the first two flight tests for each moth because flight capacity changed as box tree moth aged (see below).

Results

For males, no significant difference was found between the two experimental designs A and B, so we will provide here characteristics of flights without experimental distinction. Moreover, no

significant difference was found in G2 between individuals from Lamotte Beuvron and Olivet, and we will consider males and females without distinguishing between sites for this generation. In total, we tested 125 females and 84 males (total 209; Table 2) on computerized flight mills in the laboratory.

Daily flight capacity

In total, 879 flight tests were carried out (G1 = 215, G2 = 499, G3 = 165). Insects were tested on average 4.7 times for females (G1 = 4.3, G2 = 5.1, G3 = 4.1) and 3.2 times for males (G1 = 2.7, G2 = 3.5, G3 = 3.2). Only 25% of the insects were tested more than 5 times. Females were significantly more tested than male for G1 ($P = 0.013$) and for G2 ($P = 0.024$) whereas no difference was observed for G3 ($P = 0.266$). Insect pre-flight weight was variable ranging from 0.05 g to 0.26 g with a mean value of 0.10 g for males and 0.12 g for females. Insect pre-flight weight was significantly different between sexes ($P = 0.011$) as well as between G3 and the two other generations, G1 and G2 ($P < 0.001$). Mass lost during a test and other insect flight parameters are provided in Table 3.

Distance flown during a test was highly variable, ranging from 0 to 45 km, with a mean value of 4.5 km (Figure 1 and 2, Table 4). For both sexes, the longest distance flown was during the first three tests. Mean distance flown during a test as well as the highest distance recorded also decreased between G1, G2 and G3. This pattern was the same for males and females, and no statistical difference was found between sexes on the distance flown during a test. Interestingly, we found a significant difference between all the generations on the distance flown by the female (G2, $P = 0.044$; G3, $P = 0.001$; Figure 3). For males, the effect was significant only for G3 ($P = 0.024$) but a trend was present for G2 ($P = 0.084$).

Females Fi tested during 5 nights per week covered on average a lower distance than supposed mated and virgin females for all the generations (Table 4). For G1, supposed mated and virgin females covered the same average distance whereas for G2 and G3, there was around a 1.5 km difference.

Total distance flown during adult lifetime

Total distance flown by insects during their lifetimes was tremendously variable, with values ranging from 0 to 152.9 km (Table 4). Only one insect did not fly at all during its lifetime. Distances covered during a test and during the entire insect lifetime are provided for each generation and each experimental design in Table 4. Males were flying on average 12.4 km during their entire lifetime. Female were flying on average 20.0 km during their life. The maximum distance covered by males was 68.0 km whereas it was 152.9 km for females. However, only one female from G2 was able to cover this distance, and most maximum distances were around 70 km. No significant

effect of sex or generation was found on total distance covered. Nevertheless, a positive trend was present for the third generation for females ($P = 0.054$) and for males ($P = 0.121$) (Figure 4).

For the first experimental design, we will present here the differences in flight capacities between virgin (128 flight tests) and supposed mated females (113 flight tests) only for the G2, because we did not observed any eggs for the G1, and the number of tests for supposed mated females of the G3 was too low (4 tested females, 22 tests). On average, supposed mated females flew twice as far as virgin females (Table 4). This pattern was statistically significant for total distance flown during the insect lifetime ($P = 0.012$; Figure 5). A similar trend was observed for G1 (results not shown).

Discussion

Working out the speed at which *Cydalima perspectalis* has spread quickly into Europe and Asia Minor is essential to understand how this pest has severely affected so many ornamental and wild *Buxus* trees. This study provides the first estimation of its flight capacities. The results show that the flight capacities are higher than expected and are affected by age, generation and probably mating status. It is a first step in understanding *C. perspectalis* dispersal and its role in the fast invasion of Europe. It will also be useful to improve and adapt current management strategies against this pest.

Cydalima perspectalis flight capacities

Distances flown by the box tree moth during a test are comparable to distances estimated by computerized flight mills for other Lepidoptera species such as the oriental fruit moth *Cydia molesta* (Hughes & Dorn, 2002) and the smaller tea tortrix *Adoxophyes honmai* (Shirai & Kosugi, 2000). Moreover, several studies on flight capacities of non-native species show a variable capacity to disperse, with some presenting low flight capacities, such as the emerald ash borer beetle *Agrilus planipennis* (Tussey et al., 2018), the asian long-horned beetle *Anoplophora glabripennis* (Lopez et al., 2017) or the prickly pear cacti moth *Cactoblastis cactorum* (Sarvary et al., 2008a), and others presenting good flight capacities, such as the gypsy moth *Lymantria dispar* (Yang et al., 2017), the yellow-legged hornet *Vespa velutina* (Sauvard et al., 2018), and the longhorn beetle *Arhopalus rusticus* (Grilli & Fachinetti, 2018). Our results highlight that the flight capacities of *C. perspectalis* are similar to other strong flying non-native species and are higher than expected (Van der Straten & Muus, 2010; Casteels et al., 2011). Overall, we observed a considerable amount of variation in flight capacity, consisting of short and long flying individuals. This pattern was observed for several insects such as the prickly pear cacti moth *C. cactorum* (Sarvary et al., 2008b), several *Curculio* species (Pélisson et al., 2013) and the woodwasp *Sirex noctilio* (Bruzzone et al., 2009). This variable spatial dispersal ability could be due to either genetic

variability or to some form of plasticity allowing the insects to search for food and mates at several distances.

Impact of longevity and fecundity on flight capacities

Computerized flight mill experiments have proved to be efficient tools to estimate flight capacities of an insect (Hughes & Dorn, 2002; Pélişson et al., 2013; Minter et al., 2018). Nevertheless, it may encourage insect flights because the insect species did not have to support their own weight or contact a substrate (Bruzzone et al., 2009; Pélişson et al., 2013; Sauvard et al., 2018). In this study, our first goal was to measure flight distance covered during the *C. perspectalis* lifetime. We found a difference in lifetime distance flown between males and females which was congruent with the observation made by Tabone et al. (2015) in French invasive populations. However, in our experimentations, both sexes were tested during a week, and only a quarter survived more than this time, whereas adults are supposed to live around two weeks (Maruyama & Shinkaji, 1987; Tabone et al., 2015). Our experimentation design was likely too intensive even with a night of break between two night tests, and could explain why half of the insects died after a week. Moreover, even if insects were fed every day and no statistical effect of weight on distance flown was observed, a food deprivation may have impacted their survival.

The longest flights of *C. perspectalis* occurred 1 to 3 days after emergence which corresponds to the pre-oviposition period (Maruyama & Shinkaji, 1987; Tabone et al., 2015). A similar trend was observed for the codling moth *Cydia pomonella* (Schumacher et al., 1997) and for the oriental corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Shirai, 1998). In our experimentation on mated status, we obtained at the end a low number of insects tested. Even so, our results suggest a positive effect of the mating status on flight capacity. A similar pattern was also observed for females of *C. pomonella* (Bloem et al., 2006) whereas it was not found for several other Lepidoptera species (e.g Shirai, 1998, 2006; Hughes & Dorn, 2002; Sarvary et al., 2008a). In our study, the mated status was verified by the presence of eggs in cages, and very few females of the second and third generations laid eggs. The number of eggs was less than ten during their lifetime whereas females usually lay around 800 eggs in French invasive population (Tabone et al., 2015) and around 400 eggs in the native range (Maruyama & Shinkaji, 1987; Wan et al., 2014). This can be explained by the absence of odor stimuli from the host (unpublished results). Moreover, the high number of tests and their duration may also have negatively impacted egg-laying. For example, in the cases of the oriental corn borer, *O. furnacalis* (Shirai, 1998), and the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Shirai, 1995), Shirai found that increasing flight duration had a negative impact on egg production. Therefore, further experimentation will be required to understand the impact of mating status on the flight performance of *C. perspectalis*.

Impact of generations on flight capacities

Adults from the third generation (G3) clearly presented the lowest flight capacities. Females had higher flight capacities than males for all generations. Distance flown by females during their lifetime decreased significantly between G1 and G3. For males, the distance flown by G3 insects during their lifetime corresponded to half of the distances flown by males from G1 and G2. The third generation is present in September until October in France (Guérin et al., 2016) and in the Southern part of Europe (Santi et al., 2015; Matošević et al., 2017). At this time, the temperatures start to be unsuitable for the moth, and young larval instars start to overwinter (Nacambo et al., 2014). This reduction of flight capacities may be a response to the decreased temperatures. This strategy may help to keep a local stable level of the population to pass winter. Another explanation could be a lower quality of larval feeding in late summer, suggested by the low weight of G3 moths, which could also reduce their flight capacities. More generally, plasticity of flight capacities between generations could also be the result of parents' experience. For *C. molesta*, a multivoltine species, low temperatures experienced by adults had a positive impact on offspring flight capacities whereas higher temperatures had negative impacts (Ferrer et al., 2013). This trend may be the same for *C. perspectalis*, which could explain the differences in flight performance between the second generation and the third generation. However, this hypothesis is not suitable to explain the highest flight capacities of the diapausing generation (G1), with only few similar results for other species (e.g. the codling moth, *C. pomonella*; Bloem et al., 2006). Nevertheless, some observations indicate a positive effect of diapause on other life-history traits such as fecundity (Wan et al., 2014) and development rate (Leuthardt & Baur, 2013). Flight performances of *C. perspectalis* for each generation needs to be tested for several years to confirm a possible effect of the generation. A larger sampling of males will be required to see if the third generation is the only one with different flight capacities.

Impact of *Cydalima perspectalis* flight capacities in its fast expansion

In less than ten years, the box tree moth spread into Europe and Asia Minor and is now reported in more than 30 countries (Nacambo et al., 2014; Bras et al., XX). Roques et al. (2016) estimated that its invasion radius was nearly 500 km in five years. Our results highlight that insect flight capacities are higher than estimated (Van der Straten & Muus, 2010; Casteels et al., 2011). Nevertheless, an expansion of 20 to 30 km per generation is still too low to explain its fast expansion into Europe and Asia Minor. Indeed, with an average of 3 generations per year in Europe, the insect should cover 60 km to 90 km per year, which cannot explain the observations in a single year between Romania (Gutue et al., 2014) and Hungary (Sáfián & Horváth, 2011), as well as inside Spain, between Galicia (Pérez-Otero et al., 2015) and Barcelona (David Castellano Franco pers. comm.), or France where the four new observations from 2011 were at least 400 km apart (Brua, 2014). However, flight capacities may explain its fast colonization into countries. Surveys in France in 2012 show a colonization of approximately 100 km, which is congruent with

our findings. Our results suggest that *C. perspectalis* expansion in Croatia between 2012 and 2016 (Matošević et al., 2017) could be explained by insect flight capacities. Only disconnected invasive populations observed between 2012 and 2013 cannot be explained by insect dispersal and may result from human-mediated dispersal.

Our study provides the first findings on *C. perspectalis* flight capacities. Nevertheless, it needs to be improved with a larger sampling covering several years and with populations of different origins. Laboratory findings need to be confirmed by field studies but our results suggest that both insect self-mediated dispersal and human-mediated dispersal played a significant role in its fast expansion in Europe and Asia Minor.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Patrick Pineau, Philippe Lorme and Cyril Kruczkowski for helping in insect collection and Claudine Courtin and Olivier Denux for technical assistance. We thank Kristi Backe for English proofing. This research was funded by the INCA project (INvasion fulgurante de la Pyrale du buis *Cydalima perspectalis* en Région Centre Val de Loire), which was financed by the Centre-Val de Loire regional government in France (project INCA APR IR 2015 – 0009 673).

Contribution of authors

AB, MAAR, JR, AR and DS conceived and designed research. AB performed the sampling. AB and DS conducted experiments and analyzed data. AB, MAAR, AR, and DS wrote the manuscript. All authors approved the manuscript.

References

- Blackburn, T.M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J.T., Duncan, R.P., Jarošík, V., et al. (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 333–339.
- Bloem, S., Carpenter, J.E. & Dorn, S. (2006) Mobility of Mass-Reared Diapaused and Nondiapaused *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): Effect of Mating Status and Treatment with Gamma Radiation. *Journal of Economic Entomology*, 99, 699–706.
- Bowler, D.E. & Benton, T.G. (2005) Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biological Reviews*, 80, 205–225.
- Bras, A., Avtzis, D.N., Kenis, M., Li, H., Véték, G., Bernard, A., Courtin, C., Rousselet, J., Roques, A., Auger-Rozenberg, M.-A. A complex invasion story underlies the fast spread of the invasive box tree moth (*Cydalima perspectalis*) across Europe. *Journal of Pest Science*, (In review)
- Brua, C. (2014) La pyrale du buis: le point sur cette espèce envahissante. *Phytoma*, 675, 16–22.
- Bruzzone, O., Villacide, J., Bernstein, C. & Corley, J. (2009) Flight variability in the woodwasp *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae): an analysis of flight data using wavelets. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 731 – 737.
- Casteels, H., Witters, J., Vandierendonck, S., Van Remoortere, L. & Goossens, F. (2011) First report of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera :

- Crambidae) in Belgium. In Proceedings of the 63rd International Symposium on Crop Protection. Presented at the 63rd International Symposium on Crop Protection, Ghent, pp. 151–155.
- Coombs, M. (1997) Tethered-flight and Age-related Reproductive Performance of *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) and *H. armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Australian Journal of Zoology, 45, 409.
- Davis, A.K., Chi, J., Bradley, C. & Altizer, S. (2012) The Redder the Better: Wing Color Predicts Flight Performance in Monarch Butterflies. PLoS ONE, 7, e41323.
- Di Domenico, F., Lucchese, F. & Magri, D. (2012) Buxus in Europe: Late Quaternary dynamics and modern vulnerability. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 14, 354–362.
- EPPO (2012). EPPO Technical Document No. 1061, EPPO Study on the Risk of Imports of Plants for Planting EPPO Paris.
- Essl, F., Bacher, S., Genovesi, P., Hulme, P.E., Jeschke, J.M., Katsanevakis, S., *et al.* (2018) Which Taxa Are Alien? Criteria, Applications, and Uncertainties. BioScience, 68, 496–509.
- Estoup, A. & Guillemaud, T. (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? Molecular Ecology, 19, 4113–4130.
- Ferrer, A., Dorn, S. & Mazzi, D. (2013) Cross-generational effects of temperature on flight performance, and associated life-history traits in an insect. Journal of Evolutionary Biology, 26, 2321–2330.
- Garnas, J.R., Auger-Rozenberg, M.-A., Roques, A., Bertelsmeier, C., Wingfield, M.J., Saccaggi, D.L., *et al.* (2016) Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. Biological Invasions, 18, 935–952.
- Gninenko, Y.I., Shiryayeva, N.V. & Shurov, V.I. (2014) The box tree moth - a new invasive pest in the Caucasian Forests. Plant Health - Research and Practice, 1, 32–39.
- Göttig, S. & Herz, A. (2017) Observations on the seasonal flight activity of the box tree pyralid *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in the Rhine-Main Region of Hesse. Journal für Kulturpflanzen, 69, 157–165.
- Grilli, M.P. & Fachinetti, R. (2018) The role of host patch characteristics and dispersal capability in distribution and abundance of *Arhopalus rusticus* in central Argentina. Entomologia Experimentalis et Applicata, 166, 183–190.
- Guérin, M., Tabone, E., Martin, J.-C., Lacordaire, A.I., Gutleben, C. & Robert, F. (2016) Vers une stratégie de gestion durable de la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* (Walker 1859). In Annales AFPP. Presented at the Conférence sur l'entretien des jardins, espaces végétalisés et infrastructures, Toulouse.
- Gutue, C., Gutue, M. & Rosca, I. (2014) Crambidae associated with parks and ornamental gardens of Bucharest. Horticulture, LVIII, 323–326.
- Hoddle, M.S., Hoddle, C.D., Faleiro, J.R., El-Shafie, H.A.F., Jeske, D.R. & Sallam, A.A. (2015) How Far Can the Red Palm Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Fly?: Computerized Flight Mill Studies With Field-Captured Weevils. Journal of Economic Entomology, 108, 2599–2609.
- Hughes, J. & Dorn, S. (2002) Sexual differences in the flight performance of the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 103, 171–182.
- Hulme, P.E. (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. Journal of Applied Ecology, 46, 10–18.
- Kawazu, K., Nakamura, S. & Adati, T. (2010a) Rearing of the box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis*, larvae using an artificial diet. Applied Entomology and Zoology, 45, 163–168.
- Kawazu, K., Nakamura, S., Honda, H. & Adati, T. (2010b) Effects of photoregime on the diel rhythmicity of male responses to sex pheromones in *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae). Applied Entomology and Zoology, 45, 169–176.
- Kenis, M., Nacambo, S., Leuthardt, F., Di Domenico, F. & Haye, T. (2013) The box tree moth *Cydalima perspectalis*, in Europe: horticultural pest or environmental disaster? Aliens 33, 38–41.
- Krüger, E.O. (2008) *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) - new for the European fauna (Lepidoptera: Crambidae). Entomologische Zeitschrift mit Insekten-Börse, 118, 81–83.
- Leuthardt, F.L.G. & Baur, B. (2013) Oviposition preference and larval development of the invasive moth *Cydalima perspectalis* on five European box-tree varieties. Journal of Applied Entomology, 137, 437–444.

- Lopez, V.M., Hoddle, M.S., Francese, J.A., Lance, D.R. & Ray, A.M. (2017) Assessing Flight Potential of the Invasive Asian Longhorned Beetle (Coleoptera: Cerambycidae) With Computerized Flight Mills. *Journal of Economic Entomology*, 110, 1070–1077.
- Maruyama, T. & Shinkaji, N. (1987) Studies on the life cycle of the box-tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). I. Seasonal adult emergence and developmental velocity. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 31, 226–232.
- Maruyama, T. & Shinkaji, N. (1991) The life-cycle of the boxtree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). II. Developmental characteristics of larvae. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 35, 221–230.
- Matošević, D., Lukić, I., Bras, A., Lacković, N. & Pernek, M. (2017) Spatial Distribution, Genetic Diversity and Food Choice of Box Tree Moth (*Cydalisma perspectalis*) in Croatia. *South-East European Forestry*, 8, 41–46.
- Minter, M., Pearson, A., Lim, K.S., Wilson, K., Chapman, J.W. & Jones, C.M. (2018) The tethered flight technique as a tool for studying life-history strategies associated with migration in insects: Tethered flight for studying insect movement. *Ecological Entomology*, 43, 397–411.
- Mitchell, R., Chitanava, S., Dbar, R., Kramarets, V., Lehtijärvi, A., Matchutadze, I., *et al.* (2018) Identifying the ecological and societal consequences of a decline in *Buxus* forests in Europe and the Caucasus. *Biological Invasions*.
- Nacambo, S., Leuthardt, F.L.G., Wan, H., Li, H., Haye, T., Baur, B., *et al.* (2014) Development characteristics of the box-tree moth *Cydalisma perspectalis* and its potential distribution in Europe. *Journal of Applied Entomology*, 138, 14–26.
- Pélisson, P.-F., Bernstein, C., François, D., Menu, F. & Venner, S. (2013) Dispersal and dormancy strategies among insect species competing for a pulsed resource: Dispersal-dormancy strategies. *Ecological Entomology*, 38, 470–477.
- Pérez-Otero, R., Mansilla, J.P. & Vidal, M. (2015) *Cydalisma perspectalis* Walker, 1859 (Lepidoptera, Crambidae): una nueva amenaza para *Buxus* spp. en la Península Ibérica. *Archivos Entomoloxicos*, 10, 225–228.
- Perrings, C., Dehnen-Schmutz, K., Touza, J. & Williamson, M. (2005) How to manage biological invasions under globalization. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 212–215.
- Qin, J., Liu, Y., Zhang, L., Cheng, Y., Sappington, T.W. & Jiang, X. (2018) Effects of Moth Age and Rearing Temperature on the Flight Performance of the Loreyi Leafworm, *Mythimna loreyi* (Lepidoptera: Noctuidae), in Tethered and Free Flight. *Journal of Economic Entomology*, 111, 1243–1248.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2017. URL: <https://www.R-project.org/>.
- Renault, D., Laparie, M., McCauley, S.J. & Bonte, D. (2018) Environmental Adaptations, Ecological Filtering, and Dispersal Central to Insect Invasions. *Annual Review of Entomology*, 63, 345–368.
- Robinet, C., Darrouzet, E. & Suppo, C. (2018) Spread modelling: a suitable tool to explore the role of human-mediated dispersal in the range expansion of the yellow-legged hornet in Europe. *International Journal of Pest Management*, 1–10.
- Robinet, C., Imbert, C.-E., Rousselet, J., Sauvard, D., Garcia, J., Goussard, F., *et al.* (2012) Human-mediated long-distance jumps of the pine processionary moth in Europe. *Biological Invasions*, 14, 1557–1569.
- Robinet, C., Suppo, C. & Darrouzet, E. (2016) Rapid spread of the invasive yellow-legged hornet in France: the role of human-mediated dispersal and the effects of control measures. *Journal of Applied Ecology*.
- Roques, A., Auger-Rozenberg, M.-A., Blackburn, T.M., Garnas, J., Pyšek, P., Rabitsch, W., *et al.* (2016) Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biological Invasions*, 18, 907–920.
- Sáfián, S. & Horváth, B. (2011) Box tree moth—*Cydalisma perspectalis* (Walker, 1859), new member in the Lepidoptera fauna of Hungary (Lepidoptera: Crambidae). *Natura Somogyiensis*, 19, 245–246.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 305–332.

- Santi, F., Radeghieri, P., Sigurta, G.I., Maini, S. *et al.* (2015) Sex pheromone traps for detection of the invasive box tree moth in Italy. *Bulletin of insectology*, 68, 158–160.
- Sarvary, M.A., Bloem, K.A., Bloem, S., Carpenter, J.E., Hight, S.D. & Dorn, S. (2008a) Diel Flight Pattern and Flight Performance of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) Measured on a Flight Mill: Influence of Age, Gender, Mating Status, and Body Size. *Journal of Economic Entomology*, 101, 314–324.
- Sarvary, M.A., Hight, S.D., Carpenter, J.E., Bloem, S., Bloem, K.A. & Dorn, S. (2008b) Identification of factors influencing flight performance of field-collected and laboratory-reared, overwintered, and nonoverwintered cactus moths fed with field-collected host plants. *Environmental Entomology*, 37, 1291–1299.
- Sauvard, D., Imbault, V. & Darrouzet, E. (2018) Flight capacities of yellow-legged hornet (*Vespa velutina nigrithorax*, Hymenoptera: Vespidae) workers from an invasive population in Europe. *PLOS ONE*, 13, e0198597.
- Schumacher, P., Weyeneth, A., Weber, D.C. & Dorn, S. (1997) Long flights in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) measured by a flight mill: influence of sex, mated status and age. *Physiological Entomology*, 22, 149–160.
- Seebens, H., Blackburn, T.M., Dyer, E.E., Genovesi, P., Hulme, P.E., Jeschke, J.M., *et al.* (2017) No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nature Communications*, 8, 14435.
- Shirai, Y. (1995) Longevity, flight ability and reproductive performance of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), related to adult body size. *Researches on Population Ecology*, 37, 269–277.
- Shirai, Y. (1998) Laboratory evaluation of flight ability of the Oriental corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bulletin of Entomological Research*, 88, 327.
- Shirai, Y. (2006) Flight activity, reproduction, and adult nutrition of the beet webworm *Spoladea recurvalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Applied Entomology and Zoology*, 41, 405–414.
- Shirai, Y. & Kosugi, Y. (2000) Flight activity of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *Applied Entomology and Zoology*, 35, 459–466.
- Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D.A., Aronson, J., *et al.* (2013) Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 58–66.
- Tabone, E., Enriquez, T., Giorgi, C., Venard, M., Colombel, E., Gaglio, F., *et al.* (2015) Mieux connaître la pyrale du buis *Cydalima perspectalis*. *Phytoma*, 685, 18–20.
- Tussey, D.A., Aukema, B.H., Charvoz, A.M. & Venette, R.C. (2018) Effects of Adult Feeding and Overwintering Conditions on Energy Reserves and Flight Performance of Emerald Ash Borer (Coleoptera: Buprestidae). *Environmental Entomology*, 47, 755–763.
- Van der Straten, M.J. & Muus, T.S. (2010) The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*, 21, 107–111.
- Wan, H., Haye, T., Kenis, M., Nacambo, S., Xu, H., Zhang, F., *et al.* (2014) Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe? *Journal of Applied Entomology*, 138, 14–26.
- Wilson, J.R.U., Dormontt, E.E., Prentis, P.J., Lowe, A.J. & Richardson, D.M. (2009) Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 136–144.
- Yang, F., Luo, Y. & Shi, J. (2017) The influence of geographic population, age, and mating status on the flight activity of the Asian gypsy moth *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidiae) in China. *Applied Entomology and Zoology*, 52, 265–270.

Tables and Figures

Table 1. Description of *Cydalima perspectalis* samples used in flight mill experiments.

Generation	Country	Locality	GPS coordinates	Date of collection	Trial length
G1	France	Saint-Denis-sur-Loire	47°37'N; 1°22'E	05/09/2017	06/12 from 07/08/2017
G2		Lamotte Beuvron	47°36'N; 2°1'E	08/03/2017	08/07 from 09/18/2017
		Olivet	47°51'N; 1°53'E		
G3		Lamotte Beuvron	47°36'N; 2° 1'E	09/20/2017	10/02 from 10/31/2017

Table 2. Number of individuals for both sex of *Cydalima perspectalis* tested in flight mills for each generation and each experimentation.

		G1		G2		G3		Total
		F	M	F	M	F	M	
A-Normal	Supposed mated	8	-	16	-	4	-	28
	Virgin	19	9	31	15	14	9	97
B-Intensive		17	6	30	15	11	5	84
Total		44	15	77	30	29	14	209

G1: first generation; G2: second generation; G3: third generation

Table 3. Average flight parameters measured for *Cydalima perspectalis* adults during a flight test.

	Number of rests	Total distance flown (m)	Flight duration (s)	Flight velocity (m/s)	Mass lost (mg)
F	86	4608	370	0.675	13.3
M	67	3906	308	0.645	12.3

Table 4. Daily flight distances and total distances flown during insect whole lifetime for each generation and each experimentation for females and for each generation for males.

		G1					G2					G3					Total	
		F _I	F _V	F _{SM}	F	M	F _I	F _V	F _{SM}	F	M	F _I	F _V	F _{SM}	F	M	F	M
Daily flights (km)	Mean	5.70	6.16	6.15	6.07	6.11	3.65	4.19	5.74	4.43	3.64	2.73	3.82	2.17	3.09	2.55	4.61	3.91
	3 rd Qu.	7.96	10.17	6.81	8.02	11.77	5.00	6.05	8.36	6.85	4.42	1.87	2.47	2.62	2.51	2.83	6.77	5.52
	Max.	29.55	44.31	38.31	44.31	45.00	29.23	31.92	34.67	34.67	36.11	17.06	28.51	15.25	28.51	12.80	44.31	45.00
Tot. Flight distance (km)	Mean	23.12	17.44	36.45	23.37	16.77	17.37	15.83	39.45	21.34	12.39	11.40	12.56	10.31	11.81	7.65	20.02	12.38
	3 rd Qu.	35.84	25.18	47.80	35.54	21.40	26.38	21.97	55.94	29.85	18.10	14.19	9.47	13.68	11.53	11.61	30.34	19.15
	Max.	62.33	64.28	72.08	72.08	67.99	83.36	103.88	152.91	152.91	61.54	53.30	68.38	33.80	68.38	34.21	152.91	67.99

Information provided in the table includes distances value for: Females without distinction on experimentation design (F); Males without distinction on experimentation design (M); Females which flown 5 nights per week (F_I); Virgin females which flown 4 nights per week (F_V); and Supposed mated females which flown 4 nights per week (F_{SM}).

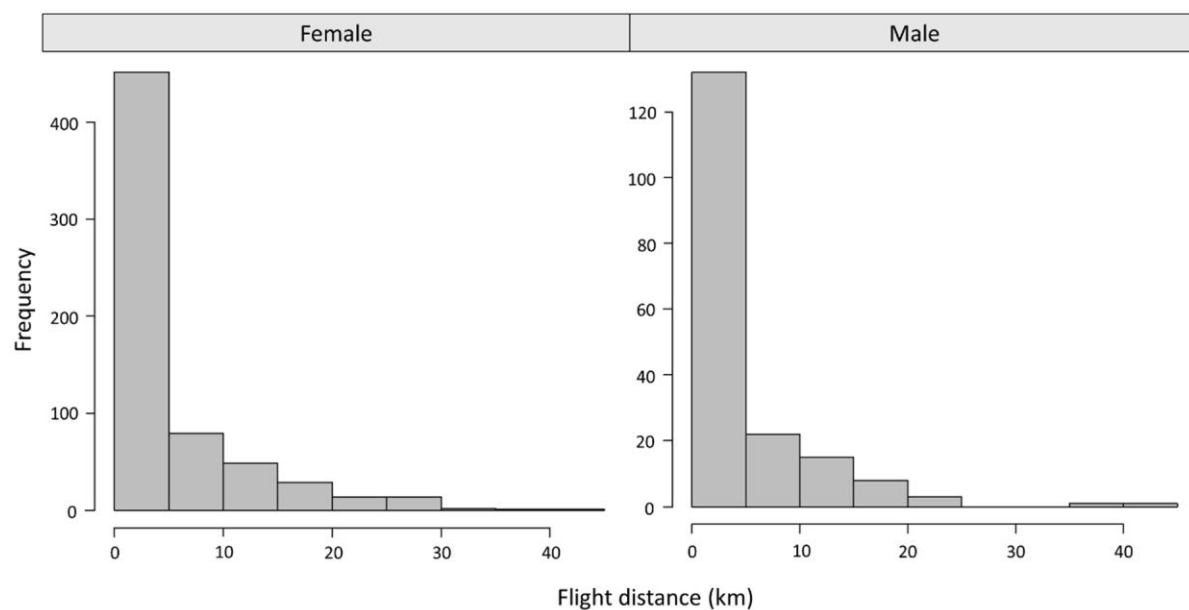


Figure 1. Distribution of distances flown during flight tests for females and males. No distinction between experiments and generations was done as no difference was observed.

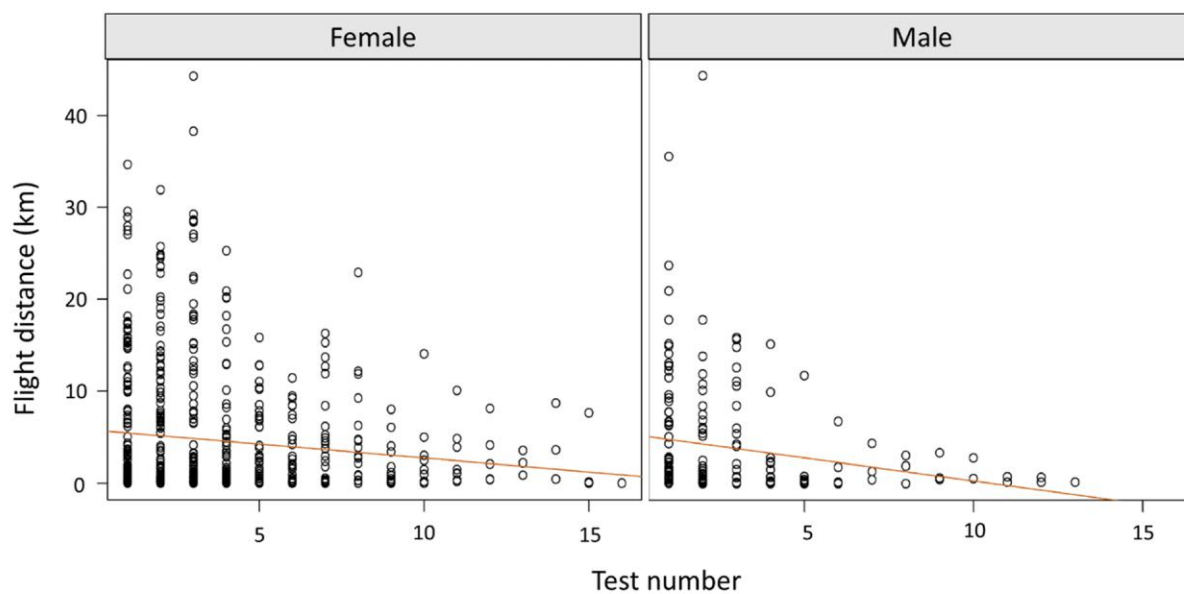


Figure 2. Distances flown per flight test according to age (in number of tests executed by insects) for females and males. The brown line corresponds to the mean distances flown per test.

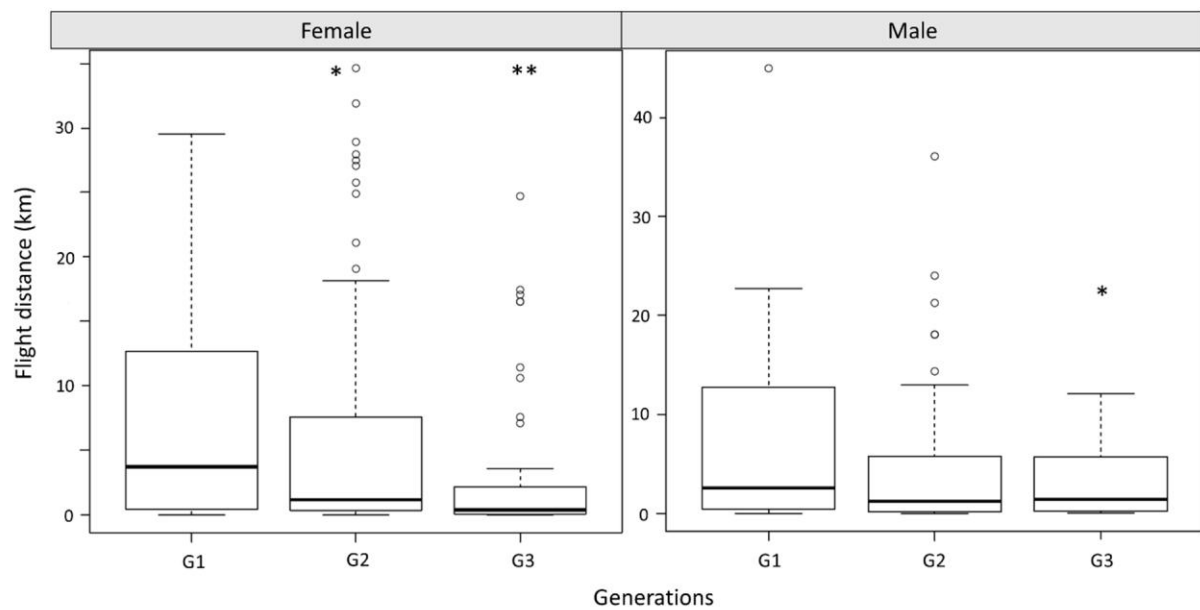


Figure 3. Distances covered by each generation of *Cydalima perspectalis* females and males during a test. Comparisons were carried out for the two first flight tests. ANOVA significant test is represented by *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

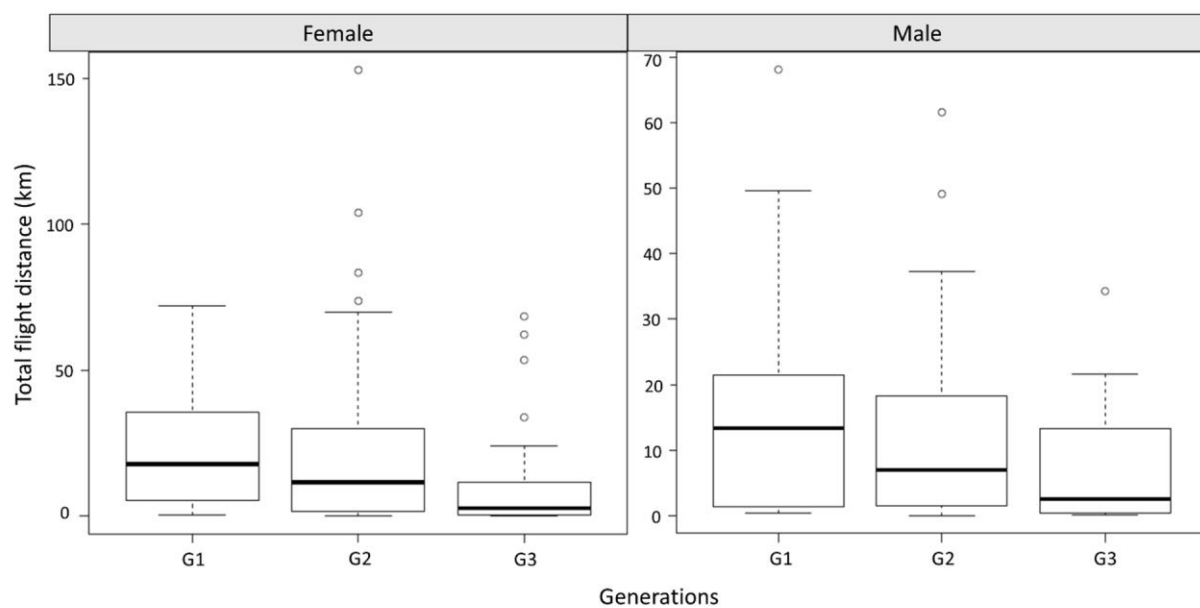


Figure 4. Distances covered by each generation of *Cydalima perspectalis* females and males during their entire life.

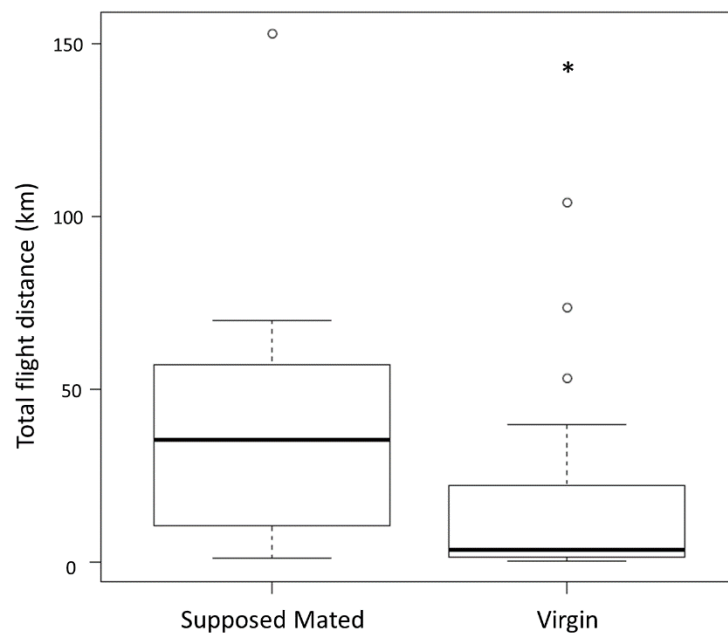


Figure 5. Total distances covered by *Cydalima perspectalis* females of G2 during their lifetime under varying mating status. ANOVA significant test is represented by *: $P < 0.05$.

5.4 Des capacités de vol faibles comparées à la vitesse d'expansion en Europe

Comprendre les processus de dispersion d'une espèce n'est pas chose aisée car de nombreux facteurs biologiques et abiotiques rentrent en compte (Ronce 2007, Renault et al. 2018). Les capacités de vol de la pyrale du buis étaient encore jusque-là peu connues. Leur mesure sur les populations envahissantes de la région Centre-Val de Loire à l'aide du manège de vol a permis d'avoir une meilleure estimation des capacités de vol de l'insecte même si l'interprétation des résultats doit être faite avec prudence. L'insecte n'étant pas en condition naturelle, plusieurs facteurs environnementaux ne sont pas pris en compte. Par conséquent, les capacités mesurées ne sont pas forcément représentatives de la dispersion réelle de l'insecte (Bruzzone et al. 2009, Ribak et al. 2017). Cependant, j'ai pu estimer les distances maximales que l'insecte était capable de parcourir et ces résultats apportent des premiers éléments de discussion pour mieux comprendre le rôle de sa dispersion naturelle dans son expansion en Europe. En effet, les capacités ici estimées pourraient expliquer en partie la dispersion observée à l'échelle régionale et la dispersion rapide au sein de certains pays comme la France (Brúa 2014), la Croatie (Matošević et al. 2017), l'Italie (Bella 2013) ou la Slovaquie (Bakay & Kollár 2018). Cependant, la vitesse de son invasion sur l'ensemble de l'Europe (31 pays envahis en 10 ans), comme le signalement simultané des premières populations envahissantes dans différents pays ou dans des sites éloignés d'un même pays, suggèrent que l'insecte ne s'est probablement pas propagé uniquement par ses propres moyens, ce qui est corroboré par les résultats génétiques des **Chapitres 3 et 4**. Des études complémentaires sur les capacités de vol de l'insecte, notamment en milieu naturel et sur d'autres populations envahissantes mais aussi natives, seraient nécessaires pour mieux appréhender la dispersion de *C. perspectalis*. Néanmoins, le commerce d'ornement semble avoir de toute façon joué un rôle important dans sa dispersion à l'échelle européenne, voire nationale.

Chapitre 6

La diapause, un trait de vie pouvant faciliter le transport et l'établissement



6.1 La diapause dans les invasions, un trait biologique favorisant l'introduction et l'établissement ?

La diapause est une forme de résistance générique exprimée chez de nombreux arthropodes en réponse aux prédicteurs indirects d'un stress environnemental comme l'absence de nourriture ou l'apparition de conditions climatiques défavorables (Danks 1987, Hodek & Hodková 1988, Košťál 2006). A l'inverse de la dispersion, l'insecte reste dans son milieu naturel, souvent proche de son hôte. Il entre dans une dormance programmée (arrêt de la morphogenèse et ralentissement des processus métaboliques) induite de manière indirecte par des stimuli environnementaux en attendant des signaux attestant d'un retour à des conditions environnementales plus favorables (Denlinger 2002, Dhillon & Hasan 2018). Le rôle de la diapause dans les invasions biologiques est pour le moment encore peu documenté dans la littérature (Renault et al. 2018). Pourtant, ce processus biologique semble pouvoir jouer un rôle dans la survie d'un organisme exposé de manière prolongée à des conditions défavorables, pouvant être différentes de celles auxquelles il est soumis dans son aire d'origine (Nahrung & Swain 2015). En effet, la diapause est déclenchée de manière indirecte par des stimuli environnementaux et non en réponse immédiate aux facteurs de stress eux-mêmes (Danks 1987, Hodek & Hodková 1988, Košťál 2006). C'est pourquoi, la concordance entre ces signaux et le stress détermine son efficacité (Dhillon et al. 2016). Dans le cas des phénomènes d'invasion, rien ne garantit que les nouveaux stress subis par une espèce, durant un transport accidentel ou durant son établissement dans l'environnement receveur, vont avoir lieu en même temps que les signaux environnementaux classiquement déclencheurs de la diapause.

Au cours de l'invasion de certaines espèces, la diapause a pu favoriser leur transport et/ou leur établissement (Nahrung & Swain 2015). Ce stade étant souvent caché et inactif, il est facilement transportable de manière involontaire (Nahrung & Swain 2015, Renault et al. 2018). La processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa*, en est un exemple. Comme ses chenilles se nymphosent dans le sol en hiver et entrent en diapause nymphale jusqu'au printemps, il est vraisemblable que ce soit la plantation de jeunes plants de pins transportés avec leur motte de terre contenant des nymphes diapausantes qui soit à l'origine de son introduction dans le nord de la France (Robinet et al. 2012). Le frelon asiatique, *Vespa velutina*, est un autre exemple. A l'automne, les reines cherchent des abris où réaliser leur diapause. Bien souvent, elles se mettent dans des marchandises de fabrication humaine et sont par conséquent plus facilement transportables non intentionnellement (Arca et al. 2015). Chez la pyrale du buis, les jeunes chenilles tissent au début de l'automne un cocon entre les feuilles de buis pour se préparer à la diapause hivernale (Xiao et al. 2011, Nacambo et al. 2014) et resteront dans ce cocon jusqu'à la fin de la diapause. Ce stade les rend donc difficilement détectables (Salisbury et al. 2012) et non sensibles aux traitements du feuillage, car ne s'alimentant pas pendant plusieurs mois. Le commerce et le transport de pieds de buis a donc pu faciliter l'introduction de l'insecte sous sa forme diapausante. Dans ces deux derniers exemples, la diapause a également pu faciliter

l'établissement des insectes en leur permettant de passer la contrainte hivernale comme cela a été avancé pour le moustique tigre *Aedes albopictus*. En effet, la diapause lui aurait permis de passer les hivers d'Amérique du Nord plus longs et froids que ceux auxquels il est soumis en Asie, son aire d'origine (Armbruster 2016).

6.2 Diapause au stade larvaire

6.2.1 Un trait caractéristique des Crambidae présents en Chine ?

Chez les Lépidoptères, le stade qui entre en diapause est souvent le stade nymphal (Danks 1987) alors que la diapause au stade larvaire est observée chez de nombreux autres insectes. Cependant, parmi les espèces de la famille des Crambidae présentes en Asie, on observe des espèces multivoltines chez lesquelles la diapause au stade larvaire semble courante. Le terme diapause correspond dans ce cas à une diapause dite facultative qui est réalisée par une seule des générations annuelles de l'insecte. Chez ces espèces, elle est induite au stade larvaire par la photopériode avec un effet secondaire de la température (Chen et al. 2011, Ding et al. 2013, Huang et al. 2013, Xu et al. 2014b, Yang et al. 2014, Dhillon et al. 2016). Un certain nombre de pyrales originaires d'Asie réalisent ainsi une diapause hivernale, comme la pyrale du riz, *Chilo suppressalis* (Chen et al. 2011, Ding et al. 2013), la pyrale tachée de la tige du sorgho, *Chilo partellus* (Dhillon et al. 2016, Dhillon & Hasan 2017), les pyrales du maïs, *Ostrinia furnacalis*, (Huang et al. 2013, Yang et al. 2014, Park et al. 2017) et *Ostrinia scapulalis* (Win and Ishikawa 2015), la pyrale de la pêche, *Conogethes punctiferalis* (Xu et al. 2014b) ou encore la pyrale de la betterave, *Loxostege sticticalis* (Jiang et al. 2010). La pyrale du buis, *C. perspectalis*, fait également partie de ces exemples puisque les chenilles présentes aux mois de septembre-octobre entrent en diapause avant la fin de leur développement larvaire sous l'effet de la diminution de la photopériode (Maruyama & Shinkaji 1993, Xiao et al. 2011, Nacambo et al. 2014, Wan et al. 2014).

6.2.2 Etat des connaissances du fonctionnement de la diapause chez la pyrale du buis

La diapause chez *C. perspectalis* est observée à la fois dans la zone native (Maruyama & Shinkaji 1993, Wan et al. 2014) et dans la zone envahie (Nacambo et al. 2014, Santi et al. 2015, Matošević et al. 2017). Son fonctionnement a été principalement étudié sur des populations natives dans leur aire d'origine. Les études de Maruyama & Shinkaji (1993) et de Xiao et al. (2011) ont montré que la photopériode était le facteur environnemental majeur dans l'induction de la diapause chez des populations du Japon et de la Chine. Ils ont identifié que la photopériode-seuil pouvait varier légèrement en fonction de la température et de la latitude, allant de 14h20 à 13h50

pour le Japon et de 13h40 à 12h50 pour la Chine. D'après leurs résultats, les trois premiers stades larvaires sont sensibles à la photopériode. De plus, la synthèse des données de la littérature asiatique faite par Wan et al. (2014) rapporte que l'insecte présenterait différents stades capables de diapause, allant des jeunes stades larvaires L2 au dernier stade larvaire.

Dans la zone envahie, le suivi de populations de *C. perspectalis* aux Pays-Bas suggère que l'insecte est capable de résister à des températures hivernales d'environ -10°C (Van der Straten & Muus 2010). De plus, l'étude de la diapause sur des populations envahissantes suisses a mis en évidence que le stade diapausant majoritaire était le stade larvaire L3 mais ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres études à ce jour (Nacambo et al. 2014). Nacambo et al. (2014) ont aussi mis en évidence que les jeunes chenilles en diapause avaient besoin d'être soumises à une période de froid de 2°C d'a minima 1 mois et demi pour que la moitié des chenilles sorties de diapause soient capables de finir leur développement.

La diapause chez *C. perspectalis* ayant été principalement étudiée sur des populations natives dans leur aire d'origine, la régulation de son expression et son rôle dans le succès invasif sous le climat tempéré européen restent par conséquent mal connus. L'attention a été portée sur les facteurs stimulant l'entrée en diapause, mais les facteurs régulant le retour à une phase d'activité ont jusqu'à maintenant été peu étudiés, que ce soit dans sa zone native ou dans sa zone envahie. La diapause a pu permettre à l'insecte d'éviter la contrainte hivernale du climat européen. La variabilité de sortie de diapause observée favoriserait quant à elle le nombre de générations observées par an et donc le nombre d'individus pouvant coloniser de nouveaux milieux. C'est pourquoi, mieux connaître les facteurs impliqués dans la levée est important pour appréhender le rôle de ce processus dans le succès de l'invasion de la pyrale du buis mais aussi pour prédire la reprise d'activité et adapter les stratégies de lutte.

6.3 Facteurs impliqués dans la levée de diapause de la pyrale du buis

Dans le cadre de son stage de master 2, Laura Poitou (2018) a étudié le rôle de deux facteurs pouvant être impliqués dans la levée de diapause : la température et la photopériode. Leur influence relative a été testée en laboratoire en exposant des individus diapausants à des traitements croisés. Pour cela, des chenilles diapausantes (1440 cocons contenant chacun une chenille) ont été collectées en milieu urbain dans la région orléanaise au début de la période de diapause. Elles ont ensuite été soumises au laboratoire à une période de froid contrôlée, en étant placées sous une température de 5°C et de photopériode hivernale de 8 heures de jour et 16 de nuit (8:16 L:D) pendant 3 mois et demi, temps correspondant à l'optimum de survie estimé par

Nacambo et al. (2014). Des lots de chenilles ont ensuite été exposés à des traitements croisés de températures (5, 10, 15 et 20°C) et de photopériodes (8:16, 10:14, 12:12, 14:10 et 16:10 L:D). Les sorties de chenilles ont été suivies quotidiennement pendant 5 semaines avant d'être toutes transférées dans des conditions classiques d'élevage (20°C, 16:8 LD) afin de tester leur capacité à sortir de diapause et poursuivre leur développement. En parallèle, le taux de diapause a été suivi sur différents sites envahis autour de la région orléanaise afin de confronter les observations.

Ayant co-dirigé toutes les étapes du travail de L. Poitou (mise en place des protocoles, réalisation des expérimentations, analyse et discussion des résultats), je présente ci-dessous les résultats majeurs obtenus, qui donneront lieu à un article scientifique.

L'analyse des chenilles diapausantes collectées a révélé la présence de trois stades larvaires différents (L3, L4 et L5), qui semblaient donc être capables d'entrer en diapause à l'automne. Un fort taux de survie a été observé à la fin des conditions hivernales appliquées (97% de survie). Les expérimentations croisées de température et photopériode ont été réalisées sur les stades larvaires largement échantillonnés (L3 et L4). Les chenilles étaient considérées sorties de diapause lorsqu'elles étaient observées hors de leur cocon. On a noté un effet secondaire du stade sur la sortie de diapause, les chenilles de stade L4 semblant sortir de diapause légèrement plus vite que celles de stade L3. Cependant, les résultats observés pour les deux stades étaient similaires quelle que soit la condition photopériode-température testée, par conséquent les résultats présentés dans cette partie ne concerneront que le stade L4 mieux représenté dans l'échantillonnage que le stade L3.

Les résultats ont mis en avant un effet important de la température sur la sortie de diapause alors que la photopériode et le stade larvaire ont eu une incidence plus secondaire. L'analyse de l'impact de la température au sein de chaque condition de photopériode et pour chaque stade a révélé une chute plus ou moins brutale du taux de diapause dès les premiers jours de l'expérimentation. La diminution était forte et rapide aux températures élevées, mais lente et plus continue aux températures basses. Ainsi les températures élevées ont positivement affecté la sortie de diapause de *C. perspectalis* (Figure 14). Le temps d'exposition conduisant à 50% de diapause ($T_{50\%}$), calculé pour synthétiser l'évolution temporelle du taux de diapause, était significativement influencé par la température, ce qui n'était pas le cas pour les stades larvaires et la photopériode.

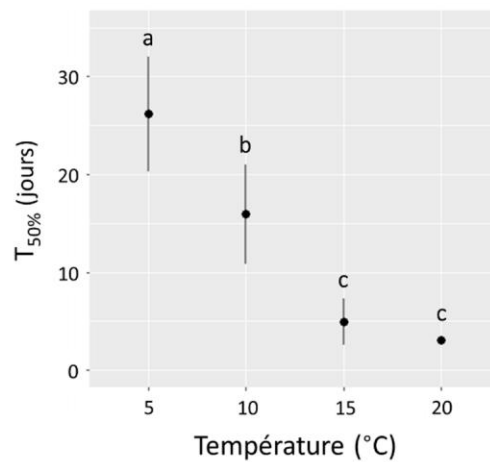


Figure 14. Temps d'exposition conduisant à 50% de diapause ($T_{50\%}$) pour des chenilles de stade L4 en fonction de la température, d'après Poitou (2018). Toutes les photopériodes sont groupées. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types. Les lettres indiquent des différences significatives après un test *post hoc* de Tukey au seuil $\alpha = 0.05$.

Ce sont aux températures les plus froides (5°C et 10°C) que l'effet de la photopériode semble le plus marqué (Figure 15) mais le $T_{50\%}$ est erratique et donc difficilement interprétable. Compte tenu du protocole expérimental et des résultats, l'effet photopériode est difficile à distinguer du bruit de fond. De plus, aucune structuration claire de la dynamique des réveils n'a pu être identifiée sous l'effet du facteur photopériode mais aussi du facteur stade larvaire.

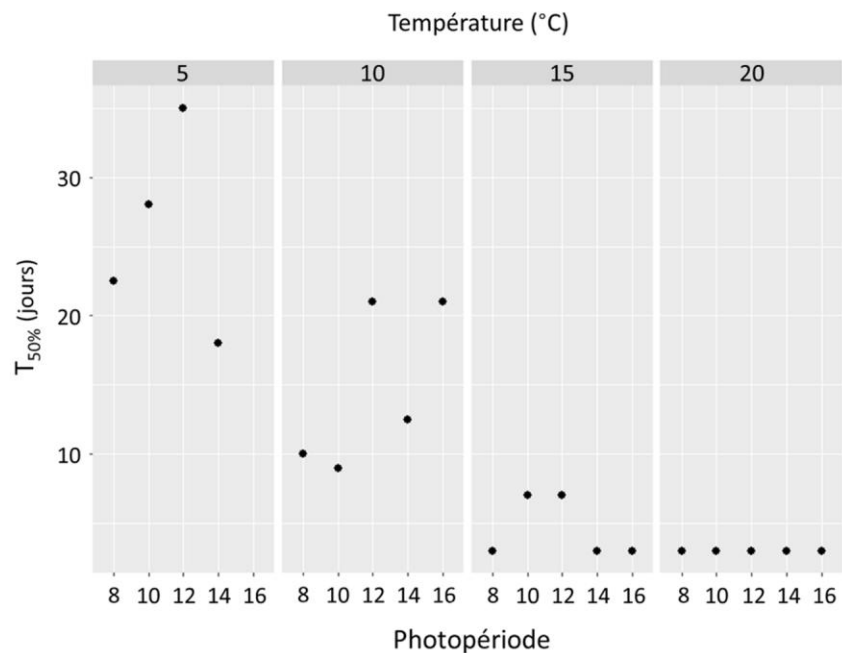


Figure 15. Temps d'exposition conduisant à 50% de diapause ($T_{50\%}$) pour des chenilles de stade L4 en fonction de la température et de la photopériode donnée en heure de jour, d'après Poitou (2018).

Les suivis de terrain ont montré une chute brutale du taux de diapause concordant avec une augmentation ponctuelle de la température au-dessus de 10°C (Figure 16). Le taux de diapause a continué à diminuer jusqu'à atteindre 0% fin avril, en parallèle d'une augmentation progressive de la température moyenne journalière. La mesure de la capsule céphalique sur un sous-échantillon de chenilles à chaque relevé a montré qu'aucun changement de stade larvaire n'a eu lieu avant le 12 avril. A partir de cette date, les températures ont durablement dépassé 10°C et des stades larvaires plus avancés ont été échantillonnés dans tous les sites. Ces observations étaient concordantes avec celles obtenues en laboratoire, la reprise de développement chez les individus de laboratoire n'ayant été observée que chez les chenilles testées à 20°C.

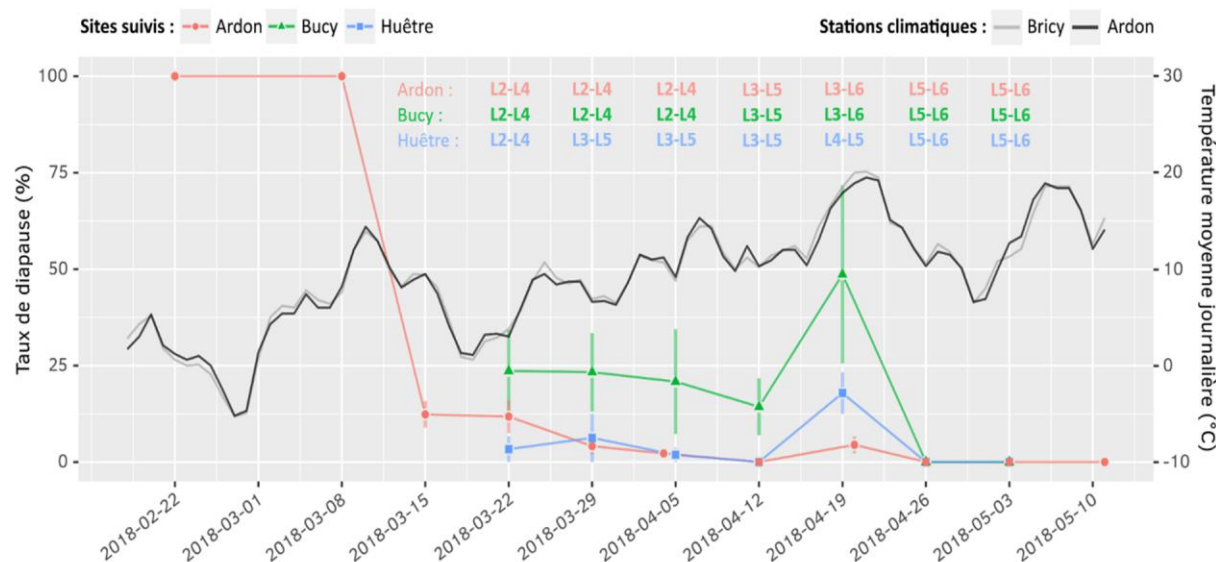


Figure 16. Évolution temporelle du taux de diapause en fonction du site et de la température moyenne journalière enregistrée par deux stations météorologiques (proches des sites de suivis), d'après Poitou (2018). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types. Pour chaque relevé, les stades larvaires ont été identifiés par mesure de la capsule céphalique sur un sous-échantillon de 30 chenilles actives par site et figurent pour chaque relevé. Sources des données climatiques : Météo France (Bricy) et INRA (Ardon).

Les résultats suggèrent un effet majeur de l'augmentation de la température, influençant positivement le taux et la dynamique de réveil alors que la photopériode n'aurait qu'une incidence marginale. Un effet de la température sur la levée de diapause a aussi été observé chez d'autres espèces de Crambidae asiatiques telles que la pyrale du maïs, *Diatraea grandiosella*, (Chippendale & Reddy 1973), la pyrale du maïs asiatique *Ostrinia furnacalis* (Yang et al. 2014) et la pyrale de la betterave *Loxostege sticticalis* (Jiang et al. 2010). De même, chez la pyrale du riz, *Chilo suppressalis*, le suivi de phénologie a suggéré que l'insecte sort de diapause sous l'effet principal

de la température (Xiao et al. 2010). Malgré le manque d'informations concernant la biologie de *C. perspectalis* dans son aire d'origine, les résultats obtenus semblent en accord avec ces exemples. De plus, les observations de terrain vont également dans ce sens puisque la reprise d'activité a été observée à la mi-mars en 2018 mais a déjà été observée au cours du mois d'avril d'autres années pour des sites voisins (A. Bras, pers. obs.).

Il est difficile de caractériser un seuil thermique précis de réveil en raison de la diminution du taux de diapause dans toutes les conditions testées. Cependant, une rupture semble apparaître entre les conditions les plus chaudes et la température de 10°C testée. De la même façon, le réveil des chenilles dans les sites envahis semble s'être opéré passé ce seuil. Cependant, le réveil observé mi-mars ne s'est pas accompagné de changements de stades larvaires avant trois semaines. Durant les expérimentations en laboratoire, les larves sorties de leur cocon ne se sont pas alimentées (absence de signes d'alimentation sur le feuillage qui leur était fourni), et sont restées immobiles après leur réveil pour les conditions de température égale ou inférieure à 15°C. Une reprise d'activité a uniquement été observée pour la température la plus élevée. Dans l'étude de Göttig (2017), des chenilles provenant de populations envahissantes allemandes et élevées à 15°C n'ont également pas fini leur développement, ce qui est concordant avec nos résultats.

Si l'ouverture du cocon par les chenilles indique sans ambiguïté que les larves ne sont plus en diapause, ces observations suggèrent que les températures qui conditionnent le réveil ne permettent pas nécessairement une reprise immédiate du développement. Le décalage observé entre le réveil et la reprise effective de l'alimentation et de la croissance soulève la question de l'état dans lequel se trouvent les larves au moment d'ouvrir le cocon.

Si on découpe le processus de diapause en phases physiologiques, on observe une sous-étape de maintenance de la diapause, qui précède la levée, durant laquelle l'arrêt du développement est verrouillé en dépit du retour à des conditions externes favorables (Danks, 1987). Durant cette dernière phase dite de post-diapause, les individus sont bloqués dans un état de quiescence si les conditions environnementales qui ont mis un terme à la phase de maintenance, et ont donc déclenché la levée de diapause, ne satisfont pas les seuils permettant de reprendre la morphogénèse. Dès que le ou les facteurs environnementaux limitants dépassent les seuils physiologiques, le développement reprend immédiatement (Košťál 2006). Dans le cas de *C. perspectalis*, la diapause a été estimée par la présence des chenilles dans leur cocon, caractéristique de cette phase, et a été considérée comme finie lorsque la chenille en est sortie. Cependant, il est possible que la phase de maintenance ait été finie avant la sortie du cocon et ce qui a été mesuré ici corresponde à une phase de quiescence (Danks 1987, Košťál 2006). Cela pourrait expliquer la réponse rapide des chenilles au stimulus thermique qui a été appliqué lors des expérimentations. De plus, cette espèce semble avoir besoin d'une période de froid minimale pour pouvoir lever la diapause. Le transfert hebdomadaire de chenilles diapausantes collectées en conditions naturelles, durant la période de mi-septembre et mi-mars, à des conditions d'élevage

en laboratoire a en effet montré que la majorité d'entre elles n'étaient pas capables de finir leur développement avant la fin du mois de novembre (Nacambo et al. 2014).

La période de froid perçue par les larves durant l'hiver pourrait donc être un autre paramètre candidat, comme cela a été proposé pour *Chilo suppressalis* (Kfir 1993) et par Košťál (2006) dans sa description des différentes étapes de la diapause. Lors de nos expérimentations, nous avons simulé un hiver plus doux (5°C) que celui appliqué par Nacambo et al. (2014) dans leur première expérimentation (2°C). Nous avons toutefois observé jusqu'à 100% de réveils dès le mois de février aux températures les plus élevées. Cela suggère que la dose minimale de froid potentiellement requise chez cette espèce serait bien inférieure à celle que l'insecte pourrait subir durant un hiver typique à des latitudes européennes. Si la dose de froid est un prérequis à la sortie de diapause chez cette espèce et agit comme un interrupteur autorisant ou non le réveil lorsque les températures augmentent transitoirement, alors cette barrière semble être levée bien avant la fin effective de l'hiver dans les zones envahies (Nacambo et al. 2014). Les chenilles semblent ainsi prêtes à sortir de leur cocon rapidement dès le retour des premières conditions favorables mais capables d'attendre de nouveau jusqu'à reprendre leur croissance à mesure que les températures propices au développement se stabilisent.

L'apparent lien direct entre la reprise du développement et la disparition effective de la contrainte à laquelle la diapause permet de résister, et non en réponse à un prédicteur indirect, pourrait faciliter la bonne synchronisation des chenilles diapausantes de *C. perspectalis* sous des hivers d'intensité et de durée diverses. Les résultats suggèrent que la phase de maintenance de la diapause, qui verrouille l'arrêt de la morphogénèse indépendamment du stress, arrive probablement à son terme avant la disparition effective de la contrainte froide en zone envahie, permettant la reprise de développement dès le retour de conditions favorables. Des études supplémentaires devront cependant confirmer cette hypothèse, notamment en testant l'existence d'une transition vers une phase de post-diapause et en appréhendant les paramètres de sa régulation.

6.4 Une meilleure connaissance de ce phénomène dans le cas de la pyrale du buis

6.4.1 Compréhension d'un trait biologique pouvant favoriser les invasions biologiques

Le couplage entre les prédicteurs environnementaux régulant la diapause et l'intensité de la contrainte hivernale en Europe n'est pas nécessairement identique à celui rencontré dans la zone native où l'espèce a évolué. La répartition supposée de la pyrale du buis dans sa zone

d'origine inclut à la fois les zones subtropicales du Sud de la Chine et du Japon et celles tempérées du Nord de l'Asie (Chine, Corée et Japon). C'est pourquoi, l'identification des facteurs déclenchant la reprise d'activité chez *C. perspectalis* a permis d'obtenir de premières pistes pour mieux comprendre l'adéquation entre la diapause exprimée dans les populations envahissantes et la contrainte saisonnière à laquelle elles font face en Europe (Poitou 2018). En effet, la reprise du développement directement liée à la levée du stress principal et non en réponse à un signal photopériodique potentiellement moins concordant en dehors de l'aire native, contribue à expliquer l'adéquation de cette diapause avec de nouveaux climats. Le processus de diapause aurait ainsi pu faciliter son établissement comme suggéré par Nacambo et al. (2014) et comme cela a pu l'être pour le moustique tigre *Aedes albopictus* en Amérique du Nord (Armbruster 2016), ou comme cela est proposé par Nahrung & Swain (2015) dans leur étude sur les traits d'insectes envahissants et natifs en Australie.

Cette forme de plasticité aboutissant à une reprise d'activité en fonction de l'apparition de températures plus favorables a également pu permettre à *C. perspectalis* de réaliser une à plusieurs générations supplémentaires en Europe en fonction des températures estivales et de la latitude (Gninenko et al. 2014, Nacambo et al. 2014, Göttig 2017), favorisant ainsi son invasion et sa dispersion. Cette plasticité de sortie en fonction des températures a été observée pour quelques espèces de Crambidae présentes en Asie qui sont également envahissantes dans certains pays du monde. C'est notamment le cas de la pyrale du riz, *Chilo suppressalis*, qui a récemment envahi une partie de la Transcaucasie en Russie (Poltavsky & Artokhin 2015). Les études de Xiao et al. (2010) ont montré que les larves reprenaient rapidement leur développement quand elles étaient mises à des températures chaudes. Les mêmes observations ont été faites pour la pyrale tachée de la tige du sorgho, *Chilo partellus* (Kfir 1993), présente en Afrique (Ofomata et al. 1999) et récemment observée en Turquie (Bayram & Tonga 2016). Plus généralement, ces exemples suggèrent que la diapause chez certaines espèces de Crambidae (dont un grand nombre sont des ravageurs de culture) pourrait avoir un effet facilitateur si elles sont introduites en dehors de leur aire de répartition naturelle.

6.4.2 Des pistes pour adapter la lutte contre un ravageur vorace

Une meilleure connaissance de la diapause chez *C. perspectalis*, et notamment des facteurs impliqués dans sa reprise d'activité, pourrait permettre d'adapter les stratégies de lutte actuelles afin de mieux maîtriser les populations envahissantes de la pyrale du buis. Comme développé dans le **Chapitre 2**, elle a peu d'ennemis naturels en Europe (Nacambo et al. 2014, Göttig 2017) et le nombre de générations implique de traiter régulièrement durant sa période d'activité (Guérin et al. 2016). La pérennité des populations dépend directement de la survie hivernale et donc de la régulation de cette diapause. Il semblerait que la génération diapausante présente des caractéristiques de développement (dispersion, taux de croissance, fécondité) qui soient meilleures que les générations non diapausantes (Leuthardt et al. 2013, Wan et al. 2014).

Par conséquent, mieux contrôler cette génération semble important pour contenir les niveaux de populations de *C. perspectalis*.

Les résultats obtenus par Poitou (2018) (cf 6.3) suggèrent que trois stades larvaires seraient sensibles à l'induction de la photopériode à l'automne et capables d'entrer en diapause. De plus, ces résultats suggèrent que la sortie de diapause des chenilles est possible dès le retour à des températures favorables mais que la reprise de développement reprendrait à partir d'un certain seuil thermique dont l'estimation est peu précise (se trouvant entre 15° et 20°C) (Göttig 2017, Poitou 2018). Ces informations pourront être utiles pour prédire la phénologie de *C. perspectalis* en France et mieux comprendre sa démographie. De plus, les méthodes de lutte actuelles sont principalement basées sur l'ingestion par l'insecte de molécules toxiques pulvérisées (Cartier & Cornillon 2016, Guérin et al. 2016). Par conséquent, les résultats obtenus sur la levée de diapause indiquent que ces traitements ne seraient efficaces qu'à partir de la reprise du développement des chenilles et non de leur sortie de diapause. L'utilisation de ces informations couplée à un modèle phénologique pourrait permettre de cibler les périodes optimales pour lutter contre ce ravageur. Cependant, il est nécessaire de mieux comprendre les facteurs impliqués dans le changement d'état de diapause à celui de post-diapause, ainsi que les températures-seuils pour la reprise du développement afin de mieux anticiper et prédire le retour à la phase active et les premiers dégâts de défoliation.

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Chapitre 7

**Le rôle de l'Homme apparaît
déterminant dans l'invasion et la
propagation fulgurante de la pyrale
du buis**



Les invasions d'insectes demeurent en constante augmentation (Roques 2010b, Roques et al. 2016, Seebens et al. 2017) malgré une prise de conscience de leurs conséquences sur les écosystèmes, l'économie et la société (Kenis et al. 2009, Bacon et al. 2014, Liebhold et al. 2017, Meurisse et al. 2018). Le secteur des plantes d'ornement, est depuis quelques décennies la voie majeure d'introduction involontaire en Europe d'un grand nombre de ces insectes (Dehnen-Schmutz et al. 2007, Roques 2010a, Eschen et al. 2017, Kenis et al. 2018). Depuis les années 1990, on observe des espèces capables de se propager en quelques années après leur introduction au sein d'une ou plusieurs nouvelle(s) aire(s) géographique(s) (Lombaert et al. 2014, Shang et al. 2015, Wang et al. 2017, Fraimout et al. 2017, Campos et al. 2017, Lesieur et al. 2018, Dittrich-Schröder et al. 2018, Martinez-Sañudo et al. 2018). Les facteurs sous-tendant ce phénomène demandent à être mieux compris, en particulier pour discerner les processus évolutifs impliqués et pour adapter des stratégies de lutte afin d'éviter l'introduction et la propagation d'autres espèces possédant les mêmes caractéristiques. Le rôle de l'Homme et de ses activités comme vecteur d'introduction d'espèces au sein d'un continent est aujourd'hui bien connu (Sakai et al. 2001, Hulme 2009, Blackburn et al. 2011, Simberloff et al. 2013). Cependant, même s'il est aussi supposé être impliqué dans la dispersion de ces organismes (Roques et al. 2016), le rôle des activités humaines dans la propagation d'insectes envahissants est moins facile à appréhender (Drew et al. 2010, Pautasso & Jeger 2014, Essl et al. 2018).

Dans ce contexte, cette thèse a apporté des éléments de réponse pour comprendre ce rôle des activités humaines dans l'introduction mais également dans la dispersion de la pyrale du buis, *C. perspectalis*. Cette espèce, récemment introduite en Europe et en Asie Mineure avec le commerce de plantes d'ornement, présente une invasion fulgurante. Les approches génétique et écologique utilisées durant cette thèse ont permis de pointer la partie côtière de la Chine comme source probable des populations envahissantes et de mettre en avant l'existence de scénarios d'invasion complexes. Les résultats ont également permis de souligner le rôle important des activités humaines dans sa dispersion à l'échelle de l'Europe et de l'Asie Mineure, et de commencer à dissocier les conséquences de ces transports accidentels intra-continentaux et des traits biologiques de l'insecte dans son invasion fulgurante. Ces résultats avancent de nouvelles pistes sur les facteurs impliqués dans son invasion. De plus, ils constituent un nouvel exemple pour mieux comprendre ce phénomène récent.

7.1 Préadaptation de populations à l'invasion ?

7.1.1 Un effet vraisemblable du changement de compartiment dans la zone d'origine dans le succès d'invasion

Les toutes premières observations de l'insecte en Europe ont été faites dans les milieux urbains (Krüger 2008, Van der Straten & Muus 2010, Casteels et al. 2011, Salisbury et al. 2012, Brua 2014), où *C. perspectalis* s'est très vite établi (probablement en l'espace de 2 ans) (Krüger 2008) et s'est propagé par la suite dans les zones avoisinantes (Leuthardt et al. 2010). Cela suggère soit une adaptation très rapide au nouvel environnement, soit l'existence d'une préadaptation des populations introduites. Les données mitochondriales ont montré que la diversité génétique observée au sein des populations de la zone envahie correspondait à celle présente au moins dans les milieux urbains en Chine, aucun échantillon n'ayant pu être obtenu des forêts naturelles de buis en Asie. Il est ainsi probable que ce soit des populations provenant de milieux anthropiques qui aient été introduites depuis la Chine. Le changement de compartiment de l'insecte, passant du milieu forestier au milieu urbain en Asie (Maruyama & Shinkaji 1993, Li 1994, Zhou et al. 2005, Kawazu et al. 2007, Wang 2008, Kim & Park 2013), a ainsi pu favoriser l'adaptation de certaines populations à des milieux perturbés, voire sélectionner certains individus plus résilients, menant à des populations plus aptes à devenir envahissantes. Ce phénomène de préadaptation dans la zone d'origine est désigné sous le terme de « *Anthropogenically induced adaptation to invade (AIAI)* ». Il suggère que la perturbation de l'environnement par les activités humaines pourrait favoriser l'évolution d'une espèce ou de certaines de ses populations, et faciliter ensuite l'invasion dans d'autres environnements anthropiques (Hufbauer et al. 2012). Le suivi d'espèces s'attaquant à des buis sentinelles plantés dans une zone de pépinières proche de la région de Beijing et dans une zone semi-forestière près de Fuyang (Zhejiang) a souligné la capacité de *C. perspectalis* à coloniser rapidement un nouveau milieu au sein même de sa zone d'origine, puisqu'on a pu observer 100% de défoliation à Pékin et 48% à Fuyang (Kenis et al. 2018). Les différences de défoliations entre les sites pourraient s'expliquer par le type de milieux environnants chaque site (milieu urbain à Pékin et milieu forestier à Fuyang). Il est possible que les individus de milieu urbain, où la plante hôte n'est naturellement pas présente, aient une meilleure capacité à coloniser de nouveaux milieux car ils ont dû s'adapter aux perturbations humaines à l'inverse de ceux présents dans les forêts de buis naturelles proche du site de Fuyang (Fang et al. 2011). Une telle préadaptation liée au changement de compartiment dans la zone d'origine a été mise en évidence chez la fourmi de feu *Wasmannia auropunctata*, introduite en Israël, à Hawaï et à Tahiti (Rey et al. 2012, Foucaud et al. 2013). Des études ont en effet montré que les fourmis présentes dans les milieux anthropiques avaient une meilleure tolérance au froid que celles présentes en milieu forestier, ce qui aurait ensuite favorisé leur invasion en Israël. De même, des individus d'Agrile du frêne *Agrilus planipennis*, ont été observés sur différentes espèces américaines de *Fraxinus* plantées comme ornement dans les villes chinoises, bien avant son introduction en Amérique du Nord (Orlova-Bienkowskaja & Volkovitsh 2018). Cela sous-entend une possible

préadaptation de certains individus à un nouvel hôte ayant pu favoriser son invasion par la suite. Néanmoins, cette théorie de AIAI est récente et requiert d'étudier en premier lieu les populations issues des zones sources probables, puis de comparer leurs traits biologiques avec ceux de populations envahissantes pour démontrer les effets de la préadaptation dans le processus d'invasion, que ce soit dans la zone d'origine de l'insecte ou dans sa zone d'introduction. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ainsi que les données historiques documentant l'invasion, incitent donc à tester cette hypothèse chez la pyrale du buis.

7.1.2 *Admixture* dans certaines populations urbaines en Chine

Les données génétiques obtenues et la structure génétique observée dans la zone d'origine sous-entendent que les populations collectées dans la partie côtière de la Chine sont génétiquement différentes de celles obtenues de Corée du Sud et de la partie Sud-Ouest de la Chine. Les analyses mitochondriales et microsatellites suggèrent l'existence d'un phénomène d'*admixture* entre 2 populations dans cette zone, dont une, *a minima* n'aurait probablement pas été échantillonnée dans notre étude. La partie côtière de la Chine est la plus peuplée du pays avec à la fois des provinces commerciales importantes (e.g. Beijing, Shanghai, Zhejiang) (Figure 17), 3 des 6 provinces productrices de buis (Guangdong, Zhejiang et Jiangsu), mais aussi la présence de ports où transitent un grand nombre de marchandises (e.g. Shanghai, Hong Kong, Canton province du Guangdong) (Roques 2010a, Lu et al. 2018).

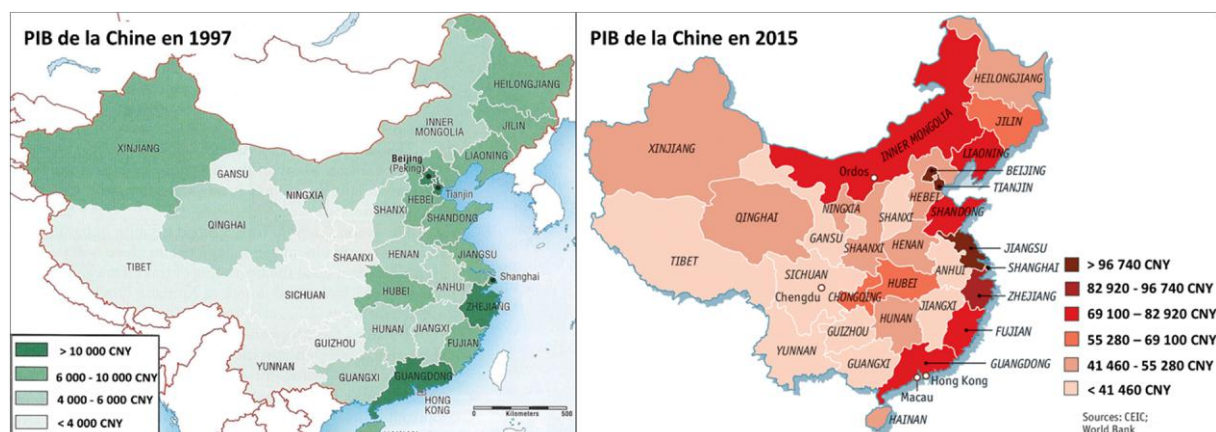


Figure 17. Produit Intérieur Brut (PIB) en Yuan (CNY) donné pour chaque province chinoise pour les années 1997 et 2015. En 2015, 1 dollar correspondait à 6,61 Yuan.

(source des cartes : 1997, <http://shaneleavy.blogspot.com/2010/12/coastlines-climate-and-coin.html>; 2015, <https://cdn.static-economist.com>).

Les activités humaines au sein de la zone côtière ont ainsi pu favoriser le brassage génétique entre différentes populations natives par le biais du commerce de buis au sein même de la Chine, ce qui aurait généré des populations « anthropiques » de *C. perspectalis*.

génétiqement composites. Le mélange génétique au sein des populations envahissantes est souvent avancé comme favorisant leur adaptation et l'apparition d'hétérosis, c'est-à-dire l'augmentation des capacités des descendants par rapport à leurs parents (Verhoeven et al. 2010, Rius & Darling 2014). Un tel phénomène a déjà été observé chez d'autres insectes où la combinaison de 2 populations natives a donné lieu par la suite à une population envahissante (e.g. Lombaert et al. 2014, van Boheemen et al. 2017). On peut ainsi imaginer que si ce phénomène s'est produit au sein des populations natives de pyrales du buis, cela a pu permettre à l'insecte non seulement de coloniser plus facilement certains milieux urbains, mais aussi de favoriser le développement de certaines capacités (e.g. dispersion, reproduction), le rendant plus apte à l'invasion (Figure 18).

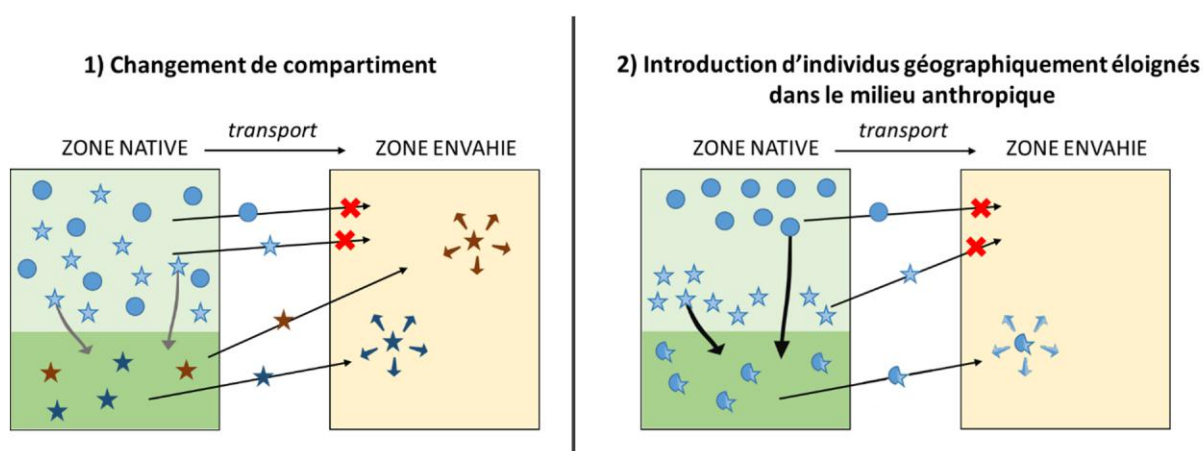


Figure 18. Schéma montrant les préadaptations d'une espèce dans sa zone native en fonction des activités humaines. 1) L'espèce colonise par elle-même le milieu anthropique résultant d'une adaptation locale de certains individus (théorie AIAI). 2) Certains individus géographiquement éloignés sont introduits volontairement ou involontairement dans le milieu anthropique et remis en contact, se traduisant par de l'*admixture* au sein des populations anthropiques. La couleur verte représente le milieu anthropique, les flèches grises représentent la colonisation de ce milieu par l'espèce, et les flèches noires correspondent au transport et à l'introduction d'individus par l'Homme.

L'association possible d'une préadaptation au milieu anthropique chinois et la présence d'*admixture* au sein des populations natives nord côtière a pu favoriser l'invasion de la pyrale du buis en Europe (Figure 18). L'étude de la structuration génétique des populations natives du milieu forestier comparée à celle des populations présentes en milieu urbain permettrait dans un premier temps de mieux estimer le changement de compartiment et ses conséquences sur l'insecte. Dans un deuxième temps, la comparaison des traits biologiques entre populations forestières natives, populations « anthropisées » de milieux urbains asiatiques et populations envahissantes permettrait de tester si ces populations présentent des caractéristiques adaptatives différentes.

7.2 Les routes d'invasion dans le cas d'invasions fulgurantes

7.2.1 Conjonction d'introductions multiples, de phénomène tête de pont et d'*admixture*

Le traçage des voies d'invasion de nombreux organismes au cours de cette dernière décennie a mis en évidence que les phénomènes impliqués sont souvent plus complexes qu'attendus (Lombaert et al. 2014, Cristescu 2015, Garnas et al. 2016). L'identification de ces routes est facilitée par le développement de nouvelles méthodes d'analyses comme l'ABC qui permettent de mettre en évidence les différents phénomènes génétiques pouvant être impliqués dans les processus d'invasion (Estoup & Guillemaud 2010). La pyrale du buis est un nouvel exemple impliquant trois phénomènes différents : des introductions multiples depuis la Chine, un phénomène tête de pont au sein même de l'Europe et un probable phénomène d'*admixture* parmi certaines populations envahissantes. Il semble évident que l'Homme a joué un rôle prépondérant dans la mise en place concomitante de ces trois phénomènes au travers du commerce des plantes d'ornement, comme cela a déjà été observé chez d'autres d'insectes envahissants présentant une invasion fulgurante (Lombaert et al. 2014, Fraimout et al. 2017, Lesieur et al. 2018). Ces espèces, tout comme *C. perspectalis*, sont souvent liées aux activités humaines, ce qui les rend plus facilement transportables. Même si chacun de ces processus est souvent avancé dans la littérature comme pouvant favoriser à lui seul la dispersion d'une espèce une fois introduite (Rius & Darling 2014), on peut légitimement considérer que l'association des trois phénomènes multiplie les chances de ces insectes de disperser rapidement sur des longues distances. De plus, cette synergie peut être encore favorisée par des transports sur de longues distances *via* les activités humaines. A l'heure actuelle, un seul processus d'invasion fulgurante, celui de l'hyménoptère galligène *Leptocybe invasa*, ne semble pas sous-tendu par des introductions multiples mais seulement par des phénomènes tête de pont et d'*admixture* (Dittrich-Schröder et al. 2018). Le traçage des routes d'invasion à une échelle plus globale d'autres insectes présentant une invasion fulgurante comme le charançon rouge du palmier *Rhynchophorus ferrugineus*, ou le cynips du châtaignier *Dryocosmus kuriphilus*, permettrait de définir si l'observation à la fois d'introductions multiples, de phénomènes tête de pont et d'*admixture* pourrait être caractéristique de ce type d'invasions et/ou de certains ordres d'insectes.

L'invasion de *C. perspectalis* semble désormais se poursuivre hors de l'Europe puisque l'insecte a été observé sur deux nouveaux continents en 2018 : l'Afrique et l'Amérique du Nord. Il a été signalé pour la première fois en Algérie, dans la ville de Constantine au début de l'automne (site iNaturalist), et à Toronto dans l'Ontario au Canada à la fin de l'été (site iNaturalist), sans que l'on sache encore comment il a été introduit, même si c'est probablement avec des pieds de buis infestés. Ces observations sur d'autres continents suggèrent que les activités humaines continuent de jouer un rôle important dans sa dispersion à l'échelle mondiale. Les voies d'invasion de ces nouveaux individus nécessitent d'être étudiées pour déterminer la ou les zones sources, qui peuvent directement être rattachées à la zone d'origine en Chine ou alors correspondre à des

zones déjà envahies, à l’instar de ce qui a été observé pour la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* (Lombaert et al. 2014) ou l’hyménoptère *Sirex noctilio* (Boissin et al. 2012).

7.2.2 Quel rôle joue l’Homme dans la dispersion à courte ou moyenne distance ?

Les données génétiques et l’estimation des capacités maximales de dispersion de *C. perspectalis* ont mis en évidence le rôle majeur de l’Homme dans sa dispersion au sein de la zone envahie. Cependant, il n’est pas toujours aisé de dissocier la part de l’Homme de celle de l’insecte lui-même dans les phénomènes d’expansion sur de faibles distances (Essl et al. 2018, Robinet et al. 2018). La colonisation des buxaies naturelles en France par *C. perspectalis* (e.g. Drôme, Ardèche, Larzac, Pyrénées) pourrait fournir l’occasion de mieux distinguer les deux phénomènes. En effet, la colonisation du milieu urbain peut résulter à la fois de l’introduction de l’insecte directement par l’Homme et de la colonisation par des adultes depuis une zone source proche. A l’inverse, les individus présents dans les buxaies naturelles n’ont vraisemblablement pas été introduits par l’Homme et proviennent d’une colonisation par des adultes dispersants. On peut donc imaginer que le suivi de la colonisation de buxaies naturelles, puis l’assignation des individus colonisateurs aux zones urbaines avoisinantes pourraient permettre d’obtenir des informations complémentaires sur ses capacités de dispersion en milieu naturel. Ces informations pourront ensuite être confrontées aux estimations des capacités de vol pour mieux comprendre sa dispersion à l’échelle locale. Le génotypage (en cours, mais encore non achevé) d’individus provenant des buxaies de l’Ardèche, du Larzac et des Pyrénées pourrait permettre une telle assignation à des populations urbaines sources. En parallèle, les capacités de vol maximales estimées et les données génétiques acquises au cours de cette thèse pourraient être associées à des données d’occurrence au sein d’un même pays et des données sur la distribution des réseaux de ventes de plantes d’ornement afin d’alimenter un modèle d’expansion, permettant de prédire la dispersion de l’insecte avec et sans l’aide de l’Homme. Un tel modèle utilisé pour le frelon asiatique *Vespa velutina*, a permis de montrer le rôle majeur de l’insecte lui-même dans sa dispersion à l’échelle de la France (Robinet et al. 2016) mais a aussi révélé un rôle combiné de l’insecte et des activités humaines dans la propagation à l’échelle de l’Europe (Robinet et al. 2018), comme c’est très probablement le cas pour la pyrale du buis.

7.3 Des traits biologiques amenant de nouvelles questions

7.3.1 Une plasticité au stade larvaire et à la sortie diapause

La plasticité de la diapause observée chez *C. perspectalis* a sûrement joué un rôle crucial dans son établissement dans la zone envahie permettant un passage efficace de la mauvaise saison. Même si les observations dans le cadre du stage de Laura Poitou (2018) ont été faites sur

une seule population collectée en zone envahie, elles apportent de premières pistes sur le rôle joué par la diapause dans la rapidité de l'invasion. L'observation d'un troisième stade larvaire (L4) entrant en diapause, en plus des deux déjà avancés dans la littérature (L2 et L3) (Gninenko et al. 2014, Nacambo et al. 2014), suggère que les pontes réalisées tardivement en automne n'aboutissent pas nécessairement à une mortalité importante. En effet, il est possible que les chenilles de premiers stades présentes durant le mois d'octobre soient encore capables d'entrer en diapause quand les conditions climatiques restent favorables. Cette plasticité augmenterait les chances de survie des individus soumis aux conditions hivernales. Cependant, cette hypothèse nécessite d'être testée expérimentalement. En Chine, les stades diapausants varient en fonction de la latitude, allant du 2^e stade larvaire au Nord du pays au dernier stade larvaire au Sud, même si on n'observe généralement qu'un ou deux stades diapausants au sein d'une même province (Wan et al. 2014). On peut ainsi se demander si la présence d'au moins 3 stades larvaires diapausants dans la zone envahie pourrait résulter (i) de l'introduction de populations chinoises provenant de plusieurs provinces côtières où des stades larvaires différents entrent en diapause, ou (ii) d'une adaptation de l'insecte aux conditions hivernales lors de son introduction en Europe. Néanmoins, les observations d'au moins un stade diapausant en Suisse (Nacambo et al. 2014) et 2 stades diapausants en Russie suggèrent qu'il peut y avoir des variations au sein des populations envahissantes en Europe.

La présence de plusieurs générations par an chez les insectes est un trait biologique pouvant accélérer la dispersion d'une espèce au sein de l'aire envahie (Fahrner & Aukema 2018). La mise en évidence d'une plasticité de sortie de diapause dépendante de la température suggère que la diapause a également pu jouer un rôle dans l'expansion, en plus de celui postulé ci-dessus pour l'établissement. En effet, la sortie de diapause et une reprise d'activité en fonction de la température permettraient à l'insecte d'adapter son cycle en fonction des zones géographiques présentant des climats différents dans la zone envahie, mais aussi en fonction des conditions climatiques variables entre années au sein d'une même zone géographique. Néanmoins, bien que l'insecte ait été observé récemment dans la région de Toronto au Canada, on peut s'interroger sur ses capacités à résister à des conditions hivernales plus drastiques. En effet, si la diapause permet à l'insecte de passer l'hiver dans de nombreuses régions d'Europe, les températures hivernales observées dans la majeure partie du Canada ne semblent pas favorables à son établissement.

7.3.2 Une différence de succès entre générations

Nos résultats de vol ont mis en avant une probable différence de capacité de dispersion entre générations pour une même année (statistiquement supportée au cours d'une nuit et présentant une tendance au cours de la vie de l'insecte). La génération diapausante apparaîtrait alors comme la plus dispersante et donc la mieux adaptée à coloniser de nouveaux milieux. Comme mentionnée dans le **Chapitre 2**, cette différence entre générations a déjà été soulignée dans la littérature pour deux autres traits biologiques : la fécondité (Wan et al. 2014) et le taux de

développement (Leuthardt & Baur 2013). Différents facteurs biologiques comme l'environnement dans lequel les chenilles ou les adultes se sont développés peuvent affecter les capacités biologiques des individus de la génération suivante. La mesure des capacités de vol maximales étant un des objectifs de cette thèse, les conditions environnementales de développement subies par les individus n'ont pas été mesurées. De plus, nos observations ont été faites sur une année et sur des sites proches, et nécessitent d'être répétées dans le temps tout en contrôlant plus de paramètres biologiques (*e.g.* conditions de développement de la chenille) pour mieux comprendre cette différence entre générations. De même, les données de la littérature concernant l'effet de la diapause sur la fécondité et le taux de développement correspondent uniquement à des observations. Des tests expérimentaux apparaissent indispensables pour valider si il existe vraiment un effet positif de la diapause sur ces traits biologiques. A l'heure actuelle, l'impact de la diapause sur le développement post-diapause et sur la reproduction des insectes est encore peu connu (Dhillon & Hasan 2018). De même, si le multivoltinisme est un critère favorable à l'expansion au cours du processus d'invasion (Fahrner & Aukema 2018), il est nécessaire de déterminer la réalité et les causes possibles de ces différences de capacité entre générations pour mieux comprendre le rôle de chaque génération dans la dispersion de l'insecte. Cela permettrait de cibler la ou les génération(s) critique(s) de manière à adapter les stratégies de contrôle pour limiter l'expansion de l'insecte et ses dégâts associés.

Conclusion

Cette thèse a validé les hypothèses formulées sur le rôle et les conséquences des activités humaines dans le transport inter- et intra-continentale de la pyrale du buis *Cydalima perspectalis*, un insecte d'origine asiatique ayant envahi de manière fulgurante l'Europe et l'Asie Mineure. Les données génétiques ont montré que l'invasion de la pyrale du buis était un nouvel exemple de route d'invasion et d'expansion complexe. L'existence de trois processus génétiques différents, probablement due au commerce ornemental, a favorisé son introduction mais aussi sa dispersion fulgurante. L'étude de certains traits biologiques, comme la dispersion ou le passage de l'hiver, a permis de mieux comprendre le succès de son invasion et apporte de nouvelles connaissances sur sa biologie. Les résultats ont également ouvert de nouvelles pistes concernant une possible préadaptation des populations envahissantes, qui pourrait être liée à une colonisation primaire de milieux urbanisés dans la zone d'origine, et ses conséquences dans le succès de l'invasion. Dans un contexte où l'insecte continue sa progression sur tous les continents, et où les zones urbaines vont continuer à s'accroître (Alberti et al. 2017), l'étude de ces zones dans les processus d'invasion, à la fois comme environnement d'introduction primaire d'une majorité d'espèces, mais également comme milieu favorisant des caractères propices à l'invasion, est une piste à explorer.

Bibliographie

- Alberti M, Correa C, Marzluff JM, Hendry AP, Palkovacs EP, Gotanda KM, Hunt VM, Apgar TM, Zhou Y (2017) Global urban signatures of phenotypic change in animal and plant populations. *Proc Natl Acad Sci* 114:8951–8956
- Allendorf FW, Lundquist LL (2003) Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conserv Biol* 17:24–30
- Aoki K, Murakami N, Kato M (2010) Phylogeography of a specialist leaf-mining weevil, *Rhynchaenus dorsoplanatus* (Coleoptera: Curculionidae), associated with *Castanopsis* species. *Ann Entomol Soc Am* 103:379–388
- Arca M, Mougél F, Guillemaud T, Dupas S, Rome Q, Perrard A, Muller F, Fossoud A, Capdevielle-Dulac C, Torres-Leguizamon M, et al. (2015) Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, in Europe. *Biol Invasions* 17:2357–2371
- Armbruster PA (2016) Photoperiodic diapause and the establishment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. *J Med Entomol* 53:1013–1023
- Assefa Y, Mitchell A, Conlong DE (2006) Phylogeography of *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Ann Société Entomol Fr* 42:331–337
- Auger-Rozenberg MA, Boivin T, Magnoux E, Courtin C, Roques A, Kerdelhué C (2012) Inferences on population history of a seed chalcid wasp: invasion success despite a severe founder effect from an unexpected source population. *Mol Ecol* 21:6086–6103
- Ávalos JA, Balasch S, Soto A (2016) Flight behaviour and dispersal of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) adults using mark-release-recapture method. *Bull Entomol Res* 106:606–614
- Avisé JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *J Biogeogr* 36:3–15
- Avisé JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst*:489–522
- Avtzis DN, Matosevic D (2013) Taking Europe by storm: a first insight in the introduction and expansion of *Dryocosmus kuriphilus* in central Europe by mtDNA. *Sumar List* 137:387–394
- Bacon SJ, Aebi A, Calanca P, Bacher S (2014) Quarantine arthropod invasions in Europe: the role of climate, hosts and propagule pressure. *Divers Distrib* 20:84–94
- Bakay L, Kollár J (2018) The spread rate of *Cydalima perspectalis* (Walker 1859) in Slovakia (2013–2015). In: Rovná K, Kollár J (eds) *Plants and Landscape in Urban Areas*. Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovakia, p 51–54
- Bayram A, Tonga A (2016) First report of *Chilo partellus* in Turkey, a new invasive maize pest for Europe. *J Appl Entomol* 140:236–240
- Beaumont MA (2010) Approximate Bayesian computation in evolution and ecology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 41:379–406
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics* 162:2025–2035
- Bella S (2013) The box tree moth *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) continues to spread in southern Europe: new records for Italy (Lepidoptera Pyraloidea Crambidae). *Redia* 96:51–55
- Benazzo A, Ghirotto S, Vilaça ST, Hoban S (2015) Using ABC and microsatellite data to detect multiple introductions of invasive species from a single source. *Heredity* 115:262–272

- Bertorelle G, Benazzo A, Mona S (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Mol Ecol* 19:2609–2625
- Beshkov S, Abadjiev S, Dimitrov D (2015) *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae: Spilomelinae) – New invasive pest moth in Bulgaria. *Entomol Rec J Var* 127:18–22
- Blackburn TM, Essl F, Evans T, Hulme PE, Jeschke JM, Kühn I, Kumschick S, Marková Z, Mrugała A, Nentwig W, *et al.* (2014) A unified classification of alien species based on the magnitude of their environmental impacts. *PLoS Biol* 12:e1001850
- Blackburn TM, Pyšek P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jarošík V, Wilson JR, Richardson DM (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends Ecol Evol* 26:333–339
- Blaik T, Hebda G, Masłowski J (2016) *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) – inwazyjny gatunek motyla w faunie Polski (Lepidoptera: Crambidae). *Przyr Sudet* 19:121–124
- Bloem S, Bloem KA, Knight AL (1998) Assessing the quality of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) by using field release-recapture tests. *J Econ Entomol* 91:1122–1130
- Bock DG, Caseys C, Cousens RD, Hahn MA, Heredia SM, Hübner S, Turner KG, Whitney KD, Rieseberg LH (2015) What we still don't know about invasion genetics. *Mol Ecol* 24:2277–2297
- Boheemen LA van, Lombaert E, Nurkowski KA, Gauffre B, Rieseberg LH, Hodgins KA (2017) Multiple introductions, admixture and bridgehead invasion characterize the introduction history of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe and Australia. *Mol Ecol* 26: 5421–5434
- Boissin E, Hurley B, Wingfield MJ, Vasaitis R, Stenlid J, Davis C, Groot P de, Ahumada R, Carnegie A, Goldarazena A, *et al.* (2012) Retracing the routes of introduction of invasive species: the case of the *Sirex noctilio* woodwasp. *Mol Ecol* 21:5728–5744
- Borer M, Alvarez N, Buerki S, Margraf N, Rahier M, Naisbit RE (2010) The phylogeography of an alpine leaf beetle: Divergence within *Oreina elongata* spans several ice ages. *Mol Phylogenet Evol* 57:703–709
- Boubou A, Migeon A, Roderick GK, Auger P, Cornuet JM, Magalhães S, Navajas M (2012) Test of colonisation scenarios reveals complex invasion history of the red tomato spider mite *Tetranychus evansi*. *PLoS ONE* 7:e35601
- Bradshaw CJA, Leroy B, Bellard C, Roiz D, Albert C, Fournier A, Barbet-Massin M, Salles JM, Simard F, Courchamp F (2016) Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nat Commun* 7:12986
- Bras A (2015) Invasion fulgurante de la pyrale du buis en Europe : Caractérisation de la diversité génétique de *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) et approche phylogéographique. Université d'Orléans, Orléans
- Bras A, Auger-Rozenberg MA, Pineau P, Lorme P, Roques A, Laparie M, Rousselet J (2017) Effet de micro-injections d'emamectine benzoate dans l'arbre hôte sur la survie des premiers stades larvaires de la pyrale du buis. In: *Annales AFPP*. Lille
- Bray AM, Bauer LS, Poland TM, Haack RA, Cognato AI, Smith JJ (2011) Genetic analysis of emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Fairmaire) populations in Asia and North America. *Biol Invasions* 13:2869–2887
- Brockerhoff EG, Liebhold AM (2017) Ecology of forest insect invasions. *Biol Invasions* 19:3141–3159
- Brower AV (1994) Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci* 91:6491–6495

- Brower AVZ, DeSalle R (1998) Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Mol Biol* 7:73–82
- Brua C (2014) La pyrale du buis: le point sur cette espèce envahissante. *Phytoma* 675:16–22
- Bruzzone O, Villacide J, Bernstein C, Corley J (2009) Flight variability in the woodwasp *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae): an analysis of flight data using wavelets. *J Exp Biol* 212:731 – 737
- Cadic A, Widehem C (2006) L'horticulture ornementale française. Structure, acteurs et marchés. INRA Editions, Paris (France) 2-7380-1207-8
- Campos MR, Biondi A, Adiga A, Guedes RNC, Desneux N (2017) From the Western Palaearctic region to beyond: *Tuta absoluta* 10 years after invading Europe. *J Pest Sci* 90:787–796
- Carter ME, Smith MT, Harrison RG (2009) Patterns of genetic variation among populations of the Asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) in China and Korea. *Ann Entomol Soc Am* 102:895–905
- Carter M, Smith M, Harrison R (2010) Genetic analyses of the Asian longhorned beetle (Coleoptera, Cerambycidae, *Anoplophora glabripennis*), in North America, Europe and Asia. *Biol Invasions* 12:1165–1182
- Cartier A, Cornillon M (2016) Quatre produits de biocontrôle testés contre la pyrale du buis. *Phytoma*:14–17
- Casteels H, Witters J, Vandierendonck S, Van Remoortere L, Goossens F (2011) First report of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in Belgium. In: Proceedings of the 63rd International Symposium on Crop Protection. Ghent, p 151–155
- Cesari M, Maistrello L, Ganzerli F, Dioli P, Rebecchi L, Guidetti R (2014) A pest alien invasion in progress: potential pathways of origin of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* populations in Italy. *J Pest Sci* 88:1–7
- Cesari M, Maistrello L, Piemontese L, Bonini R, Dioli P, Lee W, Park CG, Partsinevelos GK, Rebecchi L, Guidetti R (2018) Genetic diversity of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* in the invaded territories of Europe and its patterns of diffusion in Italy. *Biol Invasions* 20:1073-1092
- Chapman JW, Drake VA, Reynolds DR (2011) Recent Insights from Radar Studies of Insect Flight. *Annu Rev Entomol* 56:337–356
- Chapple DG, Miller KA, Kraus F, Thompson MB (2013) Divergent introduction histories among invasive populations of the delicate skink (*Lampropholis delicata*): has the importance of genetic admixture in the success of biological invasions been overemphasized? *Divers Distrib* 19:134-146
- Chen H, Gao Z, Zhou J, Chen H (2005) Bionomics of the box-tree pyralis, *Diaphania perspectalis*. *Jiangxi Plant Prot* 28:1–4
- Cheng D, Liang G, Xu Y (2016) Meta-analysis reveals asymmetric reduction in the genetic diversity of introduced populations of exotic insects. *Biol Invasions* 18:1163–1175
- Chen F, Han Y, Hu Q, Hou M (2011) Diapause induction and photoperiodic clock in *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). *Entomol Sci* 14:283–290
- Chippendale GM, Reddy AS (1973) Temperature and photoperiodic regulation of diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *J Insect Physiol* 19:1397–1408
- Chu A (2012) Study on the Occurrence and Control of *Diaphania perspectalis* (Walker) in Jiaodong Area. *J Agric Catastrophology* 3
- Ciosi M, Miller NJ, Kim KS, Giordano R, Estoup A, Guillemaud T (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Mol Ecol* 17:3614–3627

- Colunga-Garcia M, Magarey RA, Haack RA, Gage SH, Qi J (2010) Enhancing early detection of exotic pests in agricultural and forest ecosystems using an urban-gradient framework. *Ecol Appl* 20:303–310
- Coombs M (1997) Tethered-flight and age-related reproductive performance of *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) and *H. armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Aust J Zool* 45:409
- Cooter RJ, Armes NJ (1993) Tethered Flight Technique for Monitoring the Flight Performance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Entomol* 22:339–345
- Corin SE, Lester PJ, Abbott KL, Ritchie PA (2007) Inferring historical introduction pathways with mitochondrial DNA: the case of introduced Argentine ants (*Linepithema humile*) into New Zealand. *Divers Distrib* 13:510–518
- Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, Dehne-Garcia A, Gautier M, Leblois R, Marin JM, Estoup A (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics* 30:1187–1189
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* 24:2713–2719
- Correa MCG, Palero F, Malausa T, Crochard D, Zaviezo T, Lombaert E (2018) European bridgehead effect in the worldwide invasion of the obscure mealybug. *Biol Invasions*
- Cristescu ME (2015) Genetic reconstructions of invasion history. *Mol Ecol* 24:2212–2225
- Csilléry K, Blum MG, Gaggiotti OE, François O (2010) Approximate Bayesian computation (ABC) in practice. *Trends Ecol Evol* 25:410–418
- Danks HV (1987) Insect dormancy: an ecological perspective. Biological Survey of Canada (Terrestrial Artropods), Ottawa
- Dehnen-Schmutz K, Boivin T, Essl F, Groom QJ, Harrison L, Touza JM, Bayliss H (2018) Alien futures: What is on the horizon for biological invasions? *Divers Distrib*
- Dehnen-Schmutz K, Holdenrieder O, Jeger MJ, Pautasso M (2010) Structural change in the international horticultural industry: Some implications for plant health. *Sci Hortic* 125:1–15
- Dehnen-Schmutz K, Touza J, Perrings C, Williamson M (2007) The horticultural trade and ornamental plant invasions in Britain. *Conserv Biol* 21:224–231
- Denlinger DL (2002) Regulation of Diapause. *Annu Rev Entomol* 47:93–122
- Dhillon MK, Hasan F (2017) Temperature-dependent development of diapausing larvae of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Crambidae). *J Therm Biol* 69:213–220
- Dhillon MK, Hasan F (2018) Consequences of diapause on post-diapause development, reproductive physiology and population growth of *Chilo partellus* (Swinhoe). *Physiol Entomol* 43:196–206
- Dhillon MK, Hasan F, Tanwar AK, Bhadauriya AS (2016) Effects of thermo-photoperiod on induction and termination of hibernation in *Chilo partellus* (Swinhoe). *Bull Entomol Res* 107:294–302
- Di Domenico F, Lucchese F, Magri D (2012) *Buxus* in Europe: Late Quaternary dynamics and modern vulnerability. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 14:354–362
- Ding N, Dalin P, Zhu QH, Ma WH, Zhu F, Wang XP (2013) A comparison of the larval overwintering biology of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), in rice and water-oat fields. *Appl Entomol Zool* 48:147–153
- Dittrich-Schröder G, Hoareau TB, Hurley BP, Wingfield MJ, Lawson S, Nahrung HF, Slippers B (2018) Population genetic analyses of complex global insect invasions in managed landscapes: a *Leptocybe invasa* (Hymenoptera) case study. *Biol Invasions:-*

- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol Ecol* 17:431–449
- Downie DA (2002) Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Mol Ecol* 11:2013–2026
- Drew J, Anderson N, Andow D (2010) Conundrums of a complex vector for invasive species control: a detailed examination of the horticultural industry. *Biol Invasions* 12:2837–2851
- Elliott CG, Evenden ML (2009) Factors influencing flight potential of *Choristoneura conflictana*. *Physiol Entomol* 34:71–78
- Elton CS (1958) *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Methuen
- EPPO (2012). EPPO Technical Document No. 1061, EPPO Study on the Risk of Imports of Plants for Planting EPPO Paris.
- Eschen R, Douma JC, Grégoire JC, Mayer F, Rigaux L, Potting RPJ (2017) A risk categorisation and analysis of the geographic and temporal dynamics of the European import of plants for planting. *Biol Invasions* 19:3243–3257
- Eschen R, Grégoire JC, Hengeveld GM, Hoop BM de, Rigaux L, Potting RPJ (2015a) Trade patterns of the tree nursery industry in Europe and changes following findings of citrus longhorn beetle, *Anoplophora chinensis* Forster. *NeoBiota* 26:1–20
- Eschen R, Rigaux L, Sukovata L, Vettraino AM, Marzano M, Grégoire JC (2015b) Phytosanitary inspection of woody plants for planting at European Union entry points: a practical enquiry. *Biol Invasions* 17:2403–2413
- Eschen R, Roques A, Santini A (2014) Taxonomic dissimilarity in patterns of interception and establishment of alien arthropods, nematodes and pathogens affecting woody plants in Europe. *Divers Distrib* 21:36–45
- Essl F, Bacher S, Blackburn TM, Booy O, Brundu G, Brunel S, Cardoso AC, Eschen R, Gallardo B, Galil B, et al. (2015) Crossing frontiers in tackling pathways of biological invasions. *BioScience* 65:769–782
- Essl F, Bacher S, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Katsanevakis S, Kowarik I, Kühn I, Pyšek P, Rabitsch W, et al. (2018) Which taxa are alien? Criteria, applications, and uncertainties. *BioScience* 68:496–509
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Mol Ecol* 19:4113–4130
- Estoup A, Lombaert E, Marin J-M, Guillemaud T, Pudlo P, Robert CP, Cornuet JM (2012) Estimation of demo-genetic model probabilities with approximate Bayesian computation using linear discriminant analysis on summary statistics. *Mol Ecol Resour* 12:846–855
- Estoup A, Ravigné V, Hufbauer R, Vitalis R, Gautier M, Facon B (2016) Is there a genetic paradox of biological invasion? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 47:51–72
- Excoffier L, Heckel G (2006) Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat Rev Genet* 7:745–758
- Facon B, Pointier JP, Jarne P, Sarda V, David P (2008) High genetic variance in life-history strategies within invasive populations by way of multiple introductions. *Curr Biol* 18:363–367
- Fahrner S, Aukema BH (2018) Correlates of spread rates for introduced insects. *Glob Ecol Biogeogr* 27:734–743
- Fang J, Wang Z, Tang Z (Eds) (2011) *Atlas of woody plants in China: distribution and climate*. Springer ; Higher Education Press, Heidelberg ; New York : Beijing

- Feldtrauer JF, Feltrauer JJ, Brua C (2009) Premiers signalements en France de la Pyrale du Buis *Diaphania perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante s'attaquant aux Buis. Bull Soc ent Mulhouse 65:55–58
- Fischbein D, Villacide JM, De La Vega G, Corley JC (2018) Sex, life history and morphology drive individual variation in flight performance of an insect parasitoid: Variation in flight performance of a parasitoid wasp. Ecol Entomol 43:60–68
- Floerl O, Inglis GJ (2005) Starting the invasion pathway: the interaction between source populations and human transport vectors. Biol Invasions 7:589–606
- Floerl O, Inglis GJ, Dey K, Smith A (2009) The importance of transport hubs in stepping-stone invasions. J Appl Ecol 46:37–45
- Foucaud J, Rey O, Robert S, Crespin L, Orivel J, Facon B, Loiseau A, Jourdan H, Kenne M, Masse PSM, et al. (2013) Thermotolerance adaptation to human-modified habitats occurs in the native range of the invasive ant *Wasmannia auropunctata* before long-distance dispersal. Evol Appl 6:721–734
- Fraimout A, Debat V, Fellous S, Hufbauer RA, Foucaud J, Pudlo P, Marin JM, Price DK, Cattell J, Chen X, et al. (2017) Deciphering the routes of invasion of *Drosophila suzukii* by means of ABC random forest. Mol Biol Evol 34:980 – 996
- Fu XW, Chang H, He LM, Zhao SY, Wu KM (2017) Flight performance of *Macdunnoughia crassignia* (Lepidoptera: Noctuidae). Bull Entomol Res 107:715–723
- Garipey TD, Bruin A, Haye T, Milonas P, Véték G (2015) Occurrence and genetic diversity of new populations of *Halyomorpha halys* in Europe. J Pest Sci 88:451–460
- Garipey TD, Haye T, Fraser H, Zhang J (2014) Occurrence, genetic diversity, and potential pathways of entry of *Halyomorpha halys* in newly invaded areas of Canada and Switzerland. J Pest Sci 87:17–28
- Garnas JR, Auger-Rozenberg MA, Roques A, Bertelsmeier C, Wingfield MJ, Saccaggi DL, Roy HE, Slippers B (2016) Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. Biol Invasions 18:935–952
- Ghorpade BR, Patil SP (1989) Bionomics of *Glyphodes laticostalis* Guenee as one of the most important pests of forest plantations in the Konkan region of Maharashtra State (India). Indian J For 12:241–242
- Gilbert M, Guichard S, Freise J, Grégoire JC, Heitland W, Straw N, Tilbury C, Augustin S (2005) Forecasting *Cameraria ohridella* invasion dynamics in recently invaded countries: from validation to prediction. J Appl Ecol 42:805–813
- Gninenko YI, Shiryayeva NV, Shurov VI (2014) The box tree moth - a new invasive pest in the Caucasian Forests. Plant Health - Res Pract 1:32–39
- Göttig S (2017) Development of eco-friendly methods for monitoring and regulating the box tree pyralid, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive pest in ornamentals. PhD Thesis, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt
- Göttig S, Herz A (2016) Are egg parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) promising biological control agents for regulating the invasive Box tree pyralid, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae)? Biocontrol Sci Technol 26:1471–1488
- Göttig S, Herz A (2017) Observations on the seasonal flight activity of the box tree pyralid *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in the Rhine-Main Region of Hesse. J Kult 69:157–165
- Göttig S, Herz A (2018) Susceptibility of the Box tree pyralid *Cydalima perspectalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) to potential biological control agents Neem (NeemAzal®-T/S) and entomopathogenic nematodes (Nemastar®) assessed in laboratory bioassays and field trials. J Plant Dis Prot
- Guérin M, Tabone E, Martin JC, Lacordaire AI, Gutleben C, Robert F (2016) Vers une stratégie de gestion durable de la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* (Walker 1859). In: Annales AFPP. Toulouse

- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11:591-611
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, Cornuet JM, Estoup A (2010) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity* 104:88-99
- Guillemaud T, Blin A, Le Goff I, Desneux N, Reyes M, Tabone E, Tsagkarakou A, Niño L, Lombaert E (2015) The tomato borer, *Tuta absoluta*, invading the Mediterranean Basin, originates from a single introduction from Central Chile. *Sci Rep* 5: 8371
- Guillemaud T, Ciosi M, Lombaert E, Estoup A (2011) Biological invasions in agricultural settings: Insights from evolutionary biology and population genetics. *Trail Domest Migr Invasions Agric Job Georges Pelletier Jean-Claude Pernollet* 334:237-246
- Gwiazdowski RA, Van Driesche RG, Desnoyers A, Lyon S, Wu S, Kamata N, Normark BB (2006) Possible geographic origin of beech scale, *Cryptococcus fagisuga* (Hemiptera: Eriococcidae), an invasive pest in North America. *Biol Control* 39:9-18
- Haack RA, Hérard F, Sun J, Turgeon JJ (2010) Managing invasive populations of Asian longhorned beetle and citrus longhorned beetle: A worldwide perspective. *Annu Rev Entomol* 55:521-546
- Haran J (2015) Dispersion des espèces impliquées dans une association phorétique vecteur-pathogène nouvellement formée : Le cas de *Monochamus galloprovincialis*, vecteur natif d'un nématode invasif en Europe (*Bursaphelenchus xylophilus*). Université d'Orléans, Orléans
- Haran J, Koutroumpa F, Magnoux E, Roques A, Roux G (2015) Ghost mtDNA haplotypes generated by fortuitous NUMTs can deeply disturb infra-specific genetic diversity and phylogeographic pattern. *J Zool Syst Evol Res* 53:109-115
- Hellers M, Christian S (2016) Eine neue invasive Art in Luxemburg: der Buchsbaumzünsler *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859). *Bull Société Nat Luxemb* 118:131-134
- Hizal E, Kose M, Yesil C, Kaynar D (2012) The new pest *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera : Crambidae) in Turkey. *J Anim Vet Adv* 11:400-403
- Hodek I, Hodková M (1988) Multiple role of temperature during insect diapause: a review. *Entomol Exp Appl* 49:153-165
- Hodkinson ID, Casson D (1991) A lesser predilection for bugs: Hemiptera (Insecta) diversity in tropical rain forests. *Biol J Linn Soc* 43:101-109
- Hopper K (1991) Ecological applications of elemental labeling - Analysis of dispersal, density, mortality, and feeding. *Southwest Entomol* 14:71-83
- Hrnčić S, Radonjić S, Perović T (2017) The impact of alien horticultural pests on urban landscape in the southern part of Montenegro. *Acta Zool Bulg* 9:191-202
- Huang LL, Chen C, Xiao L, Xia QW, Hu LT, Xue F (2013) Geographical variation and inheritance of the photoperiodic response controlling larval diapause in two distinct voltine ecotypes of the Asian cornborer *Ostrinia furnacalis*. *Physiol Entomol* 38:126-132
- Huang Y, Ji K, Jiang Z, Tang G (2008) Genetic structure of *Buxus sinica* var. *parvifolia*, a rare and endangered plant. *Sci Hortic* 116:324-329
- Hufbauer RA, Facon B, Ravigné V, Turgeon J, Foucaud J, Lee CE, Rey O, Estoup A (2012) Anthropogenically induced adaptation to invade (AIAI): contemporary adaptation to human-altered habitats within the native range can promote invasions: Anthropogenically induced adaptation to invade. *Evol Appl* 5:89-101
- Hughes J, Dorn S (2002) Sexual differences in the flight performance of the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. *Entomol Exp Appl* 103:171-182

- Hui C, Richardson DM, Visser V (2017) Ranking of invasive spread through urban green areas in the world's 100 most populous cities. *Biol Invasions* 19:3527–3539
- Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *J Appl Ecol* 46:10–18
- Hulme PE (2015) Invasion pathways at a crossroad: policy and research challenges for managing alien species introductions. *J Appl Ecol* 52:1418–1424
- Hulme PE, Bacher S, Kenis M, Klotz S, Kühn I, Minchin D, Nentwig W, Olenin S, Panov V, Pergl J, *et al.* (2008) Grasping at the routes of biological invasions: a framework for integrating pathways into policy. *J Appl Ecol* 45:403–414
- Hulme PE, Brundu G, Carboni M, Dehnen-Schmutz K, Dullinger S, Early R, Essl F, González-Moreno P, Groom QJ, Kueffer C, *et al.* (2017) Integrating invasive species policies across ornamental horticulture supply-chains to prevent plant invasions. *J Appl Ecol*
- Humair F, Humair L, Kuhn F, Kueffer C (2015) E-commerce trade in invasive plants: E-commerce Scanning for Invaders. *Conserv Biol* 29:1658–1665
- Hundsdoerfer AK, Mende MB, Kitching IJ, Cordellier M (2011) Taxonomy, phylogeography and climate relations of the Western Palaearctic spurge hawkmoth (Lepidoptera, Sphingidae, Macroglossinae). *Zool Scr* 40:403–417
- Ito K (1979) Seasonal change of flight ability of *Cletus punctiger* (Heteroptera: Coreidae). *Appl Ent Zool* 15:36 – 44
- Javal M, Roques A, Haran J, Hérard F, Keena M, Roux G (2017a) Complex invasion history of the Asian long-horned beetle: fifteen years after first detection in Europe. *J Pest Sci*
- Javal M, Roux G, Roques A, Sauvard D (2017b) Asian long-horned beetle dispersal potential estimated in computer-linked flight mills. *J Appl Entomol* 142:282–286
- Jiang XF, Huang SH, Luo LZ, Liu Y, Zhang L (2010) Diapause termination, post-diapause development and reproduction in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Insect Physiol* 56:1325–1331
- Jones M (2014) Buis et autres topiaires: soins, taille et utilisations, Ulmer. E. Ulmer, Paris
- Jones HBC, Lim KS, Bell JR, Hill JK, Chapman JW (2016) Quantifying interspecific variation in dispersal ability of noctuid moths using an advanced tethered flight technique. *Ecol Evol* 6:181–190
- Kaluza P, Kolzsch A, Gastner MT, Blasius B (2010) The complex network of global cargo ship movements. *J R Soc Interface* 7:1093–1103
- Kawazu K, Honda H, Nakamura S, Adati T (2007) Identification of Sex Pheromone Components of the Box Tree Pyralid, *Glyphodes perspectalis*. *J Chem Ecol* 33:1978–1985
- Kawazu K, Nakamura S, Adati T (2010a) Rearing of the box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis*, larvae using an artificial diet. *Appl Entomol Zool* 45:163–168
- Kawazu K, Nakamura S, Honda H, Adati T (2010b) Effects of photoregime on the diel rhythmicity of male responses to sex pheromones in *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Appl Entomol Zool* 45:169–176
- Kenis M, Auger-Rozenberg MA, Roques A, Timms L, Péré C, Cock MJW, Settele J, Augustin S, Lopez-Vaamonde C (2009) Ecological effects of invasive alien insects. In: Langor DW, Sweeney J (eds) *Ecological Impacts of Non-Native Invertebrates and Fungi on Terrestrial Ecosystems*. Springer Netherlands, Dordrecht, p 21–45
- Kenis M, Li H, Fan J, Courtial B, Auger-Rozenberg MA, Yart A, Eschen R, Roques A (2018) Sentinel nurseries to assess the phytosanitary risks from insect pests on importations of live plants. *Sci Rep* 8:11217

- Kenis M, Nacambo S, Leuthardt F, Di Domenico F, Haye T (2013) The box tree moth *Cydalima perspectalis*, in Europe : horticultural pest or environmental disaster ? *Aliens* 33:38–41
- Kenis M, Rabitsch W, Auger-Rozenberg MA, Roques A (2007) How can alien species inventories and interception data help us prevent insect invasions? *Bull Entomol Res* 97:489–502
- Kfir R (1993) Diapause termination in the spotted stem borer, *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) in the laboratory. *Ann appl Biol* 123:1 – 7
- Kim J, Park IK (2013) Female sex pheromone components of the box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis*, in Korea: Field test and development of film-type lure. *J Asia-Pac Entomol* 16:473–477
- Kirichenko N, Augustin S, Kenis M (2018) Invasive leafminers on woody plants: a global review of pathways, impact, and management. *J Pest Sci*
- Kirichenko N, Triberti P, Ohshima I, Haran J, Byun BK, Li H, Augustin S, Roques A, Lopez-Vaamonde C (2017) From east to west across the Palearctic: Phylogeography of the invasive lime leaf miner *Phyllonorycter issikii* (Lepidoptera: Gracillariidae) and discovery of a putative new cryptic species in East Asia. *PLOS ONE* 12:e0171104
- Knowles LL (2009) Statistical phylogeography. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:593–612
- Kohler E, Brückner P (1989) The genus *Buxus* (Buxaceae): Aspects of its differentiation in space and time. *Plant Syst Evol* 162:267–283
- Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol Evol* 16:199–204
- Kolbe JJ, Lavin BR, Burke RL, Rugiero L, Capula M, Luiselli L (2013) The desire for variety: Italian wall lizard (*Podarcis siculus*) populations introduced to the United States via the pet trade are derived from multiple native-range sources. *Biol Invasions* 15:775–783
- Koren T, Crne M (2012) The first record of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859)(Lepidoptera, Crambidae) in Croatia. *Nat Croat* 21:507
- Korkmaz EM, Lunt DH, Çıplak B, Değerli N, Başbüyük HH (2014) The contribution of Anatolia to European phylogeography: the centre of origin of the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *J Biogeogr* 41:1793–1805
- Košťál V (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *J Insect Physiol* 52:113–127
- Krüger EO (2008) *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) - new for the European fauna (Lepidoptera: Crambidae). *Entomol Z Mit Insekten-Börse* 118:81–83
- Lawson L-J, Estoup A, Evans DM, Thomas CE, Lombaert E, Facon B, Aebi A, Roy HE (2011) Ecological genetics of invasive alien species. *BioControl* 56:409–428
- LeBlanc N, Salgado-Salazar C, Crouch JA (2018) Boxwood blight: an ongoing threat to ornamental and native boxwood. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:4371–4380
- Lenda M, Skórka P, Knops JMH, Morón D, Sutherland WJ, Kuszewska K, Woyciechowski M (2014) Effect of the internet commerce on dispersal modes of invasive alien species. *PLoS ONE* 9:e99786
- Lesieur V (2014) Invasion de la punaise américaine *Leptoglossus occidentalis* en Europe: une contribution à la compréhension des invasions fulgurantes. Université d'Orléans, Orléans
- Lesieur V, Lombaert E, Guillemaud T, Courtial B, Strong W, Roques A, Auger-Rozenberg MA (2018) The rapid spread of *Leptoglossus occidentalis* in Europe: a bridgehead invasion. *J Pest Sci*:1–12
- Leuthardt FLG (2013) Distribution, Life History, Food Choice and Chemical Ecology of the Invasive Box-Tree Pyralid *Cydalima perspectalis*. Université de Basel, Basel
- Leuthardt FLG, Baur B (2013) Oviposition preference and larval development of the invasive moth *Cydalima perspectalis* on five European box-tree varieties. *J Appl Entomol* 137:437–444

- Leuthardt F, Billen W, Baur B (2010) Ausbreitung des Buchsbaumzünslers *Diaphania perspectalis* (Lepidoptera, Pyralidae) in der Region Basel—eine für die Schweiz neue Schädlingsart. *Entomo Helvetica* 3:51–57
- Leuthardt FLG, Glauser G, Baur B (2013) Composition of alkaloids in different box tree varieties and their uptake by the box tree moth *Cydalima perspectalis*. *Chemoecology* 23:203–212
- Li J (1994) Observation on *Diaphania perspectalis* (Walker). *J Hebei For Coll* 9:229–231
- Liebholt AM, Brockerhoff EG, Garrett LJ, Parke JL, Britton KO (2012) Live plant imports: the major pathway for forest insect and pathogen invasions of the US. *Front Ecol Environ* 10:135–143
- Liebholt AM, Brockerhoff EG, Kalisz S, Nuñez MA, Wardle DA, Wingfield MJ (2017) Biological invasions in forest ecosystems. *Biol Invasions* 19:3437–3458
- Liebholt AM, Yamanaka T, Roques A, Augustin S, Chown SL, Brockerhoff EG, Pyšek P (2018) Plant diversity drives global patterns of insect invasions. *Sci Rep* 8
- Lippens C, Estoup A, Hima MK, Loiseau A, Tatard C, Dalecky A, Bâ K, Kane M, Diallo M, Sow A, *et al.* (2017) Genetic structure and invasion history of the house mouse (*Mus musculus domesticus*) in Senegal, West Africa: a legacy of colonial and contemporary times. *Heredity* 119:64–75
- Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends Ecol Evol* 20:223–228
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet JM, Malausa T, Facon B, Estoup A (2010) Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. *PLoS ONE* 5:e9743
- Lombaert E, Guillemaud T, Deleury E (2018) Biases of STRUCTURE software when exploring introduction routes of invasive species. *Heredity*:1
- Lombaert E, Guillemaud T, Lundgren J, Koch R, Facon B, Grez A, Loomans A, Malausa T, Nedved O, Rhule E, *et al.* (2014) Complementarity of statistical treatments to reconstruct worldwide routes of invasion: the case of the Asian ladybird. *Mol Ecol* 23:5979–5997
- Lopez-Vaamonde C, Agassiz D, Augustin S, De Prins J, De Prins W, De Prins W, Gomboc S, Ivinskis P, Karsholt O, Koutroumpas A, *et al.* (2010) Lepidoptera. Chapter 11. *BioRisk* 4:603–668
- Lu J, Li S, Wu Y, Jiang L (2018) Are Hong Kong and Taiwan stepping-stones for invasive species to the mainland of China? *Ecol Evol*
- Mally R, Nuss M (2010) Phylogeny and nomenclature of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), which was recently introduced into Europe (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae: Spilomelinae). *Eur J Entomol* 107:393–400
- Margaritopoulos JT, Voudouris CC, Olivares J, Sauphanor B, Mamuris Z, Tsitsipis JA, Franck P (2012) Dispersal ability in codling moth: mark-release-recapture experiments and kinship analysis. *Agric For Entomol* 14:399–407
- Marozas V, Cekstere G, Laivins M, Straigyte L (2015) Comparison of neophyte communities of *Robinia pseudoacacia* L. and *Acer negundo* L. in the eastern Baltic Sea region cities of Riga and Kaunas. *Urban For Urban Green* 14:826–834
- Martin J-C, Brinquin A-S, Morel E, Tabone E, Guerin M (2015) Vers un outil de biocontrôle innovant et performant contre la pyrale du buis. *Phytoma*:41–44
- Martinez M, Germain JF, Streito JC (2014) Actualités entomologiques : nouveaux insectes ravageurs introduits en France métropolitaine (Période juillet 2005 à juin 2014). In: Montpellier, p15
- Martinez-Sañudo I, Mazzon L, Simonato M, Avtzis D, Pujade-Villar J, Faccoli M (2018) Tracking the origin and dispersal of the Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera, Cynipidae) in Europe with molecular markers. *Bull Entomol Res*:1–9

- Maruyama T (1993) Life cycle of the box-tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). IV. Effect of various host plants on larval growth and food utilization. Jpn J Appl Entomol Zool 37:117–122
- Maruyama T, Shinkaji N (1987) Studies on the life cycle of the box-tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). I. Seasonal adult emergence and developmental velocity. Jpn J Appl Entomol Zool 31:226–232
- Maruyama T, Shinkaji N (1991) The life-cycle of the box-tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). II. Developmental characteristics of larvae. Jpn J Appl Entomol Zool 35:221–230
- Maruyama T, Shinkaji N (1993) The life-cycle of the box-tree pyralid, *Glyphodes-Perspectalis* (walker) (Lepidoptera, Pyralidae) .III. Photoperiodic induction of larval diapause. Jpn J Appl Entomol Zool 37:45–51
- Matošević D (2013) Box tree moth (*Cydalima perspectalis*, Lepidoptera; Crambidae), new invasive insect pest in Croatia. South-East Eur For 4:89–94
- Matošević D, Lukić I, Bras A, Lacković N, Pernek M (2017) Spatial distribution, genetic diversity and food choice of box tree moth (*Cydalima perspectalis*) in Croatia. South-East Eur For 8:41–46
- Matsiakh I, Kramarets V, Mamadashvili G (2018) Box tree moth *Cydalima perspectalis* as a threat to the native populations of *Buxus colchica* in Republic of Georgia. J Entomol Res Soc 20:29–42
- Mc Neely JA, Mooney HA, Neville LE, Schei PJ, Waage JK (2001) A global strategy on invasive Alien Species. IUCN in collaboration with GISP, Gland, Switzerland, and Cambridge, UK, 55p.
- Meirmans PG (2015) Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. Mol Ecol 24:3223–3231
- Mendoza R, Luna S, Aguilera C (2015) Risk assessment of the ornamental fish trade in Mexico: analysis of freshwater species and effectiveness of the FISK (Fish Invasiveness Screening Kit). Biol Invasions 17:3491–3502
- Menocal O, Kendra PE, Montgomery WS, Crane JH, Carrillo D (2018) Vertical distribution and daily flight periodicity of ambrosia beetles (Coleoptera: Curculionidae) in Florida avocado orchards affected by laurel wilt. J Econ Entomol 111:1190–1196
- Meurisse N, Rassati D, Hurley BP, Brockerhoff EG, Haack RA (2018) Common pathways by which non-native forest insects move internationally and domestically. J Pest Sci
- Minter M, Pearson A, Lim KS, Wilson K, Chapman JW, Jones CM (2018) The tethered flight technique as a tool for studying life-history strategies associated with migration in insects. Ecol Entomol 43:397–411
- Mitchell R, Chitanava S, Dbar R, Kramarets V, Lehtijärvi A, Matchutadze I, Mamadashvili G, Matsiakh I, Nacambo S, Papazova-Anakieva I, et al. (2018) Identifying the ecological and societal consequences of a decline in *Buxus* forests in Europe and the Caucasus. Biol Invasions
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011) How many species are there on Earth and in the Ocean? PLoS Biol 9:e1001127
- Nacambo S (2012) Parasitisme, développement, modèle climatique et impact de *Cydalima perspectalis* en Europe.
- Nacambo S, Leuthardt FLG, Wan H, Li H, Haye T, Baur B, Weiss RM, Kenis M (2014) Development characteristics of the box-tree moth *Cydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. J Appl Entomol 138:14–26
- Nagy A, Szarukán I, Csabai J, Molnár A, Molnár BP, Kárpáti Z, Szanyi S, Tóth M (2017) Distribution of the box tree moth (*Cydalima perspectalis* Walker 1859) in the north-eastern part of the Carpathian Basin with a new Ukrainian record and Hungarian data. Eppo Bull 47:279–282

- Nahrung HF, Swain AJ (2015) Strangers in a strange land: do life history traits differ for alien and native colonisers of novel environments? *Biol Invasions* 17:699–709
- Nentwig W, Bacher S, Kumschick S, Pyšek P, Vilà M (2017) More than “100 worst” alien species in Europe. *Biol Invasions* 20:1611–1621
- Nieukerken E van, Wagner D, Baldessari M, Mazzon L, Angeli G, Girolami V, Duso C, Doorenweerd C (2012) *Antispila oinophylla* new species (Lepidoptera, Heliozelidae), a new North American grapevine leafminer invading Italian vineyards: taxonomy, DNA barcodes and life cycle. *ZooKeys* 170:29–77
- Niinemets Ü, Peñuelas J (2008) Gardening and urban landscaping: significant players in global change. *Trends Plant Sci* 13:60–65
- Nuss M (2018) Global Information System on Pyraloidea.
- Ofomata VC, Overholt WA, Egwuatu RI (1999) Diapause termination of *Chilo partellus* (Swinhoe) and *Chilo orichalcociliellus* Strand (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Sci Applic* 19:187–191
- Orlova-Bienkowskaja MJ, Ukrainsky AS, Brown PMJ (2015) *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Asia: a re-examination of the native range and invasion to southeastern Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Biol Invasions* 17:1941–1948
- Orlova-Bienkowskaja MJ, Volkovitsh MG (2018) Are native ranges of the most destructive invasive pests well known? A case study of the native range of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Biol Invasions* 20:1275–1286
- Ostojić I, Zovko M, Petrović D, Elez D (2015) New records of box tree moth *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) in Bosnia and Herzegovina. *Works Fac Agric Food Sci Univ Sarajevo* 60:139–143
- Park IK (2008) Ecological characteristic of *Glyphodes perspectalis*. *Korean J Appl Entomol* 47:299–301
- Patoka J, Bláha M, Kalous L, Vrabec V, Buřič M, Kouba A (2016) Potential pest transfer mediated by international ornamental plant trade. *Sci Rep* 6:25896
- Pautasso M, Jeger MJ (2014) Network epidemiology and plant trade networks. *AoB PLANTS* 6:1–14
- Pélisson PF, Bernstein C, François D, Menu F, Venner S (2013) Dispersal and dormancy strategies among insect species competing for a pulsed resource: Dispersal-dormancy strategies. *Ecol Entomol* 38:470–477
- Peng Y, Li Y, Tian Z, Zhang Q, Zhao Y, Li L, Peng R (1994) Studies on the bionomics of *Diaphania perspectalis* (Walker) and its integrated management in urban ecotope. *J Southwest Agric Univ* 16:448–452
- Pérez-Otero R, Mansilla JP, Vidal M (2015) *Cydalima perspectalis* Walker, 1859 (Lepidoptera, Crambidae): una nueva amenaza para *Buxus* spp. en la Península Ibérica. *Arq Entomoloxicos* 10:225–228
- Pergl J, Pyšek P, Bacher S, Essl F, Genovesi P, Harrower CA, Hulme PE, Jeschke JE, Kenis M, Kühn I, et al. (2017) Troubling travellers: are ecologically harmful alien species associated with particular introduction pathways? *NeoBiota* 32:1–20
- Perrings C, Dehnen-Schmutz K, Touza J, Williamson M (2005) How to manage biological invasions under globalization. *Trends Ecol Evol* 20:212–215
- Petrić D, Bellini R, Scholte EJ, Rakotoarivony LM, Schaffner F (2014) Monitoring population and environmental parameters of invasive mosquito species in Europe. *Parasit Vectors* 7:187
- Pimentel D, McNair S, Janecka J, Wightman J, Simmonds C, O’Connell C, Wong E, Russel L, Zern J, Aquino T, Tsomondo T (2001) Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agric Ecosyst Environ* 84:1–20

- Plantamp C (2016) Implication de la niche écologique et des indices environnementaux liés à la localisation de la ressource dans le succès invasif du ravageur *Drosophila suzukii* : des pistes pour le développement du piégeage massif. Université de Lyon, Lyon
- Plant RE, Cunningham RT (1991) Analyses of the dispersal of sterile mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) released from a point source. *Environ Entomol* 20:1493–1503
- Poitou L (2018) Rôles de la température et de la photopériode sur la levée de la diapause hivernale chez une espèce dont l'invasion est fulgurante en Europe, la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera, Crambidae). Université de Bordeaux, Bordeaux
- Poltavsky AN, Artokhin KS (2015) Invasions by *Chilo* Zincken, 1817 to the south of European Russia (Lepidoptera: Crambidae). *SHILAP-Rev Lepidopterol* 43:461–465
- Prentis PJ, Wilson JR, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ (2008) Adaptive evolution in invasive species. *Trends Plant Sci* 13:288–294
- Proklov VV, Karayeva SZ (2013) New and interesting Lepidoptera records from Chechen Republic (Russia). *Кавказский Энтомологический Бюллетень* 9:281–282
- Pudlo P, Marin JM, Estoup A, Cornuet JM, Gautier M, Robert CP (2016) Reliable ABC model choice via random forests. *Bioinformatics*:btv684
- Putman AI, Carbone I (2014) Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecol Evol*: 4399–4428
- Pysek P, Jarosik V, Hulme PE, Kuhn I, Wild J, Arianoutsou M, Bacher S, Chiron F, Didziulis V, Essl F, *et al.* (2010) Disentangling the role of environmental and human pressures on biological invasions across Europe. *Proc Natl Acad Sci* 107:12157–12162
- Regier JC, Mitter C, Solis MA, Hayden JE, Landry B, Nuss M, Simonsen TJ, Yen SH, Zwick A, Cummings MP (2012) A molecular phylogeny for the pyraloid moths (Lepidoptera: Pyraloidea) and its implications for higher-level classification. *Syst Entomol* 37:635–656
- Renault D, Laparie M, McCauley SJ, Bonte D (2018) Environmental adaptations, ecological filtering, and dispersal central to insect invasions. *Annu Rev Entomol* 63:345–368
- Rey O, Estoup A, Vonshak M, Loiseau A, Blanchet S, Calcaterra L, Chifflet L, Rossi JP, Kergoat GJ, Foucaud J, *et al.* (2012) Where do adaptive shifts occur during invasion? A multidisciplinary approach to unravelling cold adaptation in a tropical ant species invading the Mediterranean area. *Ecol Lett* 15:1266–1275
- Ribak G, Barkan S, Soroker V (2017) The aerodynamics of flight in an insect flight-mill. *PLOS ONE* 12:e0186441
- Ricciardi A, Blackburn TM, Carlton JT, Dick JTA, Hulme PE, Iacarella JC, Jeschke JM, Liebhold AM, Lockwood JL, MacIsaac HJ, *et al.* (2017) Invasion science: A horizon scan of emerging challenges and opportunities. *Trends Ecol Evol* 32:464–474
- Rijal DP, Alm T, Jahodová Š, Stenøien HK, Alsos IG (2015) Reconstructing the invasion history of *Heracleum persicum* (Apiaceae) into Europe. *Mol Ecol* 24:5522–5543
- Rius M, Darling JA (2014) How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? *Trends Ecol Evol* 29:233–242
- Robinet C, Darrouzet E, Suppo C (2018) Spread modelling: a suitable tool to explore the role of human-mediated dispersal in the range expansion of the yellow-legged hornet in Europe. *Int J Pest Manag*:1–10
- Robinet C, Imbert CE, Rousselet J, Sauvard D, Garcia J, Goussard F, Roques A (2012) Human-mediated long-distance jumps of the pine processionary moth in Europe. *Biol Invasions* 14:1557–1569

- Robinet C, Suppo C, Darrouzet E (2016) Rapid spread of the invasive yellow-legged hornet in France: the role of human-mediated dispersal and the effects of control measures. *J Appl Ecol* 54:205–215
- Roderick GK (1996) Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu Rev Entomol* 41:325–352
- Rodriguez LF (2006) Can invasive species facilitate native species? Evidence of how, when, and why these impacts occur. *Biol Invasions* 8:927–939
- Roe AD, Sperling FAH (2007) Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Mol Phylogenet Evol* 44:325–345
- Ronce O (2007) How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annu Rev Ecol Syst* 38:231–253
- Roques A (2010a) Alien forest insects in a warmer world and a globalised economy: impacts of changes in trade, tourism and climate on forest biosecurity. *N Z J For Sci*:77–94
- Roques A (2010b) Taxonomy, time and geographic patterns. Chapter 2. *BioRisk* 4:11–26
- Roques A, Auger-Rozenberg MA, Blackburn TM, Garnas J, Pyšek P, Rabitsch W, Richardson DM, Wingfield MJ, Liebhold AM, Duncan RP (2016) Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biol Invasions* 18:907–920
- Roques A, Rabitsch W, Rasplus JY, Lopez-Vaamonde C, Nentwig W, Kenis M (2009) Alien terrestrial invertebrates of Europe. In: *Handbook of Alien Species in Europe*. Springer Netherlands, Dordrecht, p 63–79
- Rossi JP, Garcia J, Roques A, Rousselet J (2015) Trees outside forests in agricultural landscapes: spatial distribution and impact on habitat connectivity for forest organisms. *Landsc Ecol* 31:243–254
- Rossi JP, Rousselet J (2016) The spatial distribution of trees outside forests in a large open-field region and its potential impact on habitat connectivity for forest insects. *Turk J For Türkiye Orman Derg* 17:62
- Sáfián S, Horváth B (2011) Box tree moth—*Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), new member in the Lepidoptera fauna of Hungary (Lepidoptera: Crambidae). *Nat Somogyiensis* 19:245–246
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annu Rev Ecol Syst*:305–332
- Salisbury A, Korycinska A, Halstead AJ (2012) The first occurrence of larvae of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in private gardens in the UK. *Br J Entomol Nat Hist* 25:1
- Salvesen PH, Kanz B, Moe D (2009) Historical cultivars of *Buxus sempervirens* L. revealed in a preserved 17 th Century Garden by biometry and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). *Eur J Hortic Sci*:130–136
- Santana Q, Coetzee M, Steenkamp E, Mlonyeni O, Hammond G, Wingfield M, Wingfield B (2009) Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *BioTechniques* 46:217–223
- Santini A, Liebhold A, Migliorini D, Woodward S (2018) Tracing the role of human civilization in the globalization of plant pathogens. *ISME J* 12:647–652
- Santi F, Radeghieri P, Sigurta GI, Maini S, *et al.* (2015) Sex pheromone traps for detection of the invasive box tree moth in Italy. *Bull Insectology* 68:158–160
- Sarvary MA, Bloem KA, Bloem S, Carpenter JE, Hight SD, Dorn S (2008) Diel flight pattern and flight performance of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) measured on a flight mill: Influence of age, gender, mating status, and body size. *J Econ Entomol* 101:314–324

- Sauvard D, Imbault V, Darrouzet E (2018) Flight capacities of yellow-legged hornet (*Vespa velutina nigrithorax*, Hymenoptera: Vespidae) workers from an invasive population in Europe. PLOS ONE 13:e0198597
- Schumacher P, Weyeneth A, Weber DC, Dorn S (1997) Long flights in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) measured by a flight mill: influence of sex, mated status and age. Physiol Entomol 22:149–160
- Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Pagad S, Pyšek P, Kleunen M van, Winter M, *et al.* (2018) Global rise in emerging alien species results from increased accessibility of new source pools. Proc Natl Acad Sci 115:E2264–E2273
- Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Pagad S, Pyšek P, Winter M, Arianoutsou M, *et al.* (2017) No saturation in the accumulation of alien species worldwide. Nat Commun 8:14435
- Seebens H, Essl F, Dawson W, Fuentes N, Moser D, Pergl J, Pyšek P, Kleunen M van, Weber E, Winter M, Blasius B (2015) Global trade will accelerate plant invasions in emerging economies under climate change. Glob Change Biol 21:4128–4140
- Seljak G (2012) Six new alien phytophagous insect species recorded in Slovenia in 2011. Acta Entomol Slov 20:31–44
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecol Lett 9:615–629
- Senan S, Kizhakayil D, Sasikumar B, Sheeja TE (2014) Methods for development of microsatellite markers: an overview. Not Sci Biol 6:1
- Shang X, Yao Y, Huai W, Zhao W (2015) Population genetic differentiation of the black locust gall midge *Obolodiplosis robiniae* (Haldeman) (Diptera: Cecidomyiidae): a North American pest invading Asia. Bull Entomol Res 105:736–742
- She D, Feng F (2006) Bionomics and control of *Diaphania perspectalis* (Walker). J Zhejiang Forest Sci Tech 26:47–51
- Shi H, Hu K (2007) Occurrence regulation and control techniques of *Diaphania perspectalis*. Hubei Agric Sci 46:76–78
- Shirai Y (1995) Longevity, flight ability and reproductive performance of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), related to adult body size. Res Popul Ecol 37:269–277
- Shirai Y (1998) Laboratory evaluation of flight ability of the Oriental corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Bull Entomol Res 88:327
- Showers WB, Hellmich RL, Derrick-Robinson ME, Hendrix WH (2001) Aggregation and dispersal behavior of marked and released European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) adults. Environ Entomol 30:700–710
- Simberloff D, Martin JL, Genovesi P, Maris V, Wardle DA, Aronson J, Courchamp F, Galil B, García-Berthou E, Pascal M, *et al.* (2013) Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. Trends Ecol Evol 28:58–66
- Simonato M, Mendel Z, Kerdelhué C, Rousselet J, Magnoux E, Salvato P, Roques A, Battisti A, Zane L (2007) Phylogeography of the pine processionary moth *Thaumetopoea wilkinsoni* in the Near East. Mol Ecol 16:2273–2283
- Sinama M, Dubut V, Costedoat C, Gilles A, Junker M, Malausa T, Martin JF, Neve G, Pech N, Schmitt T, *et al.* (2011) Challenges of microsatellite development in Lepidoptera: *Euphydryas aurinia* (Nymphalidae) as a case study. Eur J Entomol 108:261–266

- Smith RM, Baker RHA, Malumphy CP, Hockland S, Hammon RP, Ostojá-Starzewski JC, Collins DW (2007) Recent non-native invertebrate plant pest establishments in Great Britain: origins, pathways, and trends. *Agric For Entomol* 9:307–326
- Solorzano CD, Szalanski AL, Kence M, McKern JA, Austin JW, Kence A, *et al.* (2009) Phylogeography and population genetics of honey bees (*Apis mellifera*) from Turkey based on COI-COI sequence data. *Sociobiology* 53:237
- Stepanian PM, Horton KG, Melnikov VM, Zrnić DS, Gauthreaux SA (2016) Dual-polarization radar products for biological applications. *Ecosphere* 7:e01539
- Strachinis I, Kazilas C, Karamaouna F, Papanikolaou NE, Partsinevelos GK, Milonas PG (2015) First record of *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) in Greece. *Hell Plant Prot J* 8:66–72
- Strecker AL, Campbell PM, Olden JD (2011) The aquarium trade as an invasion pathway in the Pacific Northwest. *Fisheries* 36:74–85
- Su N-Y (2013) How to become a successful invader ? *Fla Entomol* 96:765–769
- Székely L, Dinca V, Mihai C (2011) *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), a new species for the Romanian fauna (Lepidoptera: Crambidae: Spilomelinae). *Bul Inf Entomol* 22:73–77
- Tabone E, Enriquez T, Giorgi C, Venard M, Colombel E, Gaglio F, Buradino M, Martin JC (2015) Mieux connaître la pyrale du buis *Cydalima perspectalis*. *Phytoma* 685:18–20
- Torriani MVG, Mazzi D, Hein S, Dorn S (2010) Direct and correlated responses to artificial selection on flight activity in the oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Biol J Linn Soc* 100:879–889
- UICN, The World Conservation Union. 2000. Guidelines for the prevention of biodiversity loss due to biological invasion. 15p.
- Vachnadze NS, Vachnadze VY, Jakeli EZ, Tsakadze DM (2009) Alkaloids of *Buxus colchica*, *B. sempervirens*, and *B. balearica* growing in Georgia. *Chem Nat Compd* 45:936–938
- Vaes-Petignat S, Nentwig W (2014) Environmental and economic impact of alien terrestrial arthropods in Europe. *NeoBiota* 22:23–42
- Vajgand D (2016) Contribution to the study of Lepidoptera of Čelarevo (Vojvodina, Serbia). *Acta Entomol Serbica* 21:49–92
- Valade R, Kenis M, Hernandez-Lopez A, Augustin S, Mari Mena N, Magnoux E, Rougerie R, Lakatos F, Roques A, Lopez-Vaamonde C (2009) Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Mol Ecol* 18:3458–3470
- Valentin RE, Nielsen AL, Wiman NG, Lee DH, Fonseca DM (2017) Global invasion network of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*. *Sci Rep* 7
- Valkenburg J van, Brunel S, Brundu G, Ehret P, Follak S, Uludag A (2014) Is terrestrial plant import from East Asia into countries in the EPPO region a potential pathway for new emerging invasive alien plants? *EPPO Bull* 44:195–204
- Van der Straten MJ, Muus TS (2010) The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. *Proc Neth Entomol Soc Meet* 21:107–111
- Van Kleunen M, Dawson W, Schlaepfer D, Jeschke JM, Fischer M (2010) Are invaders different? A conceptual framework of comparative approaches for assessing determinants of invasiveness: Comparisons on determinants of invasiveness. *Ecol Lett* 13: 947-958
- Van Kleunen M, Essl F, Pergl J, Brundu G, Carboni M, Dullinger S, Early R, González-Moreno P, Groom QJ, Hulme PE (2018) The changing role of ornamental horticulture in alien plant invasions. *Biol Rev* 93:1421–1437

- Verhoeven KJF, Macel M, Wolfe LM, Biere A (2010) Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:2–8
- Vettraino AM, Li H-M, Eschen R, Morales-Rodriguez C, Vannini A (2017) The sentinel tree nursery as an early warning system for pathway risk assessment: Fungal pathogens associated with Chinese woody plants commonly shipped to Europe. *PLOS ONE* 12:e0188800–
- Walsh DB, Bolda MP, Goodhue RE, Dreves AJ, Lee J, Bruck DJ, Walton VM, O’Neal SD, Zalom FG (2011) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *J Integr Pest Manag* 2:G1–G7
- Wang Y (2008) The biological character and control of a new pest (*Diaphania perspectalis*) on *Murraya paniculata*. *J Fujian For Sci Technol* 35:161–164
- Wang G, Hou Y, Zhang X, Zhang J, Li J, Chen Z (2017) Strong population genetic structure of an invasive species, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), in southern China. *Ecol Evol* 7:10770–10781
- Wang GH, Zhang X, Hou YM, Tang BZ (2015) Analysis of the population genetic structure of *Rhynchophorus ferrugineus* in Fujian, China, revealed by microsatellite loci and mitochondrial COI sequences. *Entomol Exp Appl* 155:28–38
- Wan H, Haye T, Kenis M, Nacambo S, Xu H, Zhang F, Li H (2014) Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe? *J Appl Entomol* 138:14–26
- Watson G, Davies J, Wood H, Cocks A (2018) A comparison of survivorship and function (grazing and behaviour) of three gastropod species used as clean-up crew for the marine aquarium trade. *PLOS ONE* 13:e0199516
- Williamson M, Fitter A (1996a) The varying success of invaders. *Ecology* 77:1661–1666
- Williamson MH, Fitter A (1996b) The characters of successful invaders. *Biol Conserv* 78:163–170
- Wilson JRU, Dormontt EE, Prentis PJ, Lowe AJ, Richardson DM (2009) Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends Ecol Evol* 24:136–144
- Wu LH, Hill MP, Thomson LJ, Hoffmann AA (2018) Assessing the current and future biological control potential of *Trichogramma ostrinae* on its hosts *Ostrinia furnacalis* and *Ostrinia nubilalis*. *Pest Manag Sci* 74:1513–1523
- Xiao HJ, Mou FC, Zhu XF, Xue FS (2010) Diapause induction, maintenance and termination in the rice stem borer *Chilo suppressalis* (Walker). *J Insect Physiol* 56:1558–1564
- Xiao HJ, Xin HQ, Zhu XF, Xue FS (2011) Photoperiod and temperature of diapause induction in *Diaphania perspectalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Chin J Appl Entomol* 48:116–120
- Xu J, Fonseca DM, Hamilton GC, Hoelmer KA, Nielsen AL (2014a) Tracing the origin of US brown marmorated stink bugs, *Halyomorpha halys*. *Biol Invasions* 16:153–166
- Xu LR, Ni X, Wang ZY, He KL (2014b) Effects of photoperiod and temperature on diapause induction in *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Diapause induction of *Conogethes punctiferalis*. *Insect Sci* 21:556–563
- Yang HZ, Tu XY, Xia QW, He HM, Chen C, Xue FS (2014) Photoperiodism of diapause induction and diapause termination in *Ostrinia furnacalis*. *Entomol Exp Appl* 153:34–46
- Zayed A, Constantin ŞA, Packer L (2007) Successful biological invasion despite a severe genetic load. *PLoS One* 2:e868
- Zera AJ, Denno RF (1997) Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu Rev Entomol* 42:207–230
- Zhang DX (2004) Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends Ecol Evol* 19:507–509

- Zhang DX, Hewitt GM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* 12:563–584
- Zhang X, Hou YM (2014) Invasion history of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) in Fujian, China based on mitochondrial DNA and its implications in development of a control strategy: Invasion history of *S. invicta* in Fujian. *Insect Sci* 21:493–498
- Zhou W, Xia CY, Sun XQ, Zhu B, Liu XP, Liu ZC, Wang Y (2005) Studies on the biological characteristics and control of *Diaphania perspectalis* Walker. *J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci* 23:52–56

Sites internet

- DAISIE, <http://www.europe-aliens.org/>, (dernière visite le 05/10/18)
- DAISIE, 100 of The Worst, <http://www.europe-aliens.org/speciesTheWorst.do> (dernière visite le 04/10/2018)
- Données de PIB par province Chinoise, Trivium China, <https://triviumchina.com/data-viz/40-years-of-growth-ranking-chinas-provinces-by-gdp-per-capita-1978-2017/> (dernière visite le 14/10/18)
- EPPO Global Database , <https://gd.eppo.int/> (dernière visite le 19/10/18)
- FranceAgriMer, Données et Bilan, 2015, BIL. <http://www.franceagrimer.fr/content/download/45371/432316/file/BIL-HORTI%20Com%20Ext%202015.pdf> (dernière visite le 19/10/18)
- iNaturalist, observation de la pyrale du buis en Algérie. <https://www.inaturalist.org/observations/17021677> (dernière visite le 13/10/18)
- iNaturalist, observation de la pyrale du buis au Canada. <https://www.inaturalist.org/blog/18683-an-invasive-moth-is-recorded-in-ontario-canada-for-the-first-time-observation-of-the-week-9-9-18> (dernière visite le 19/10/18)
- IUCN ISSG Global Invasive Species Database, <http://www.iucngisd.org/gisd/> (dernière visite le 05/10/2018)
- Projet SaveBuxus (2014-2017), Plante&Cit . [https://www.plante-et-cite.fr/projet/fiche/19/savebuxus mise au point et evaluat](https://www.plante-et-cite.fr/projet/fiche/19/savebuxus_mise_au_point_et_evalue) (dernière visite le 12/09/18)
- Projet BioPyr (2017), INRA UEFM. https://www6.paca.inra.fr/entomologie_foret_med/Projets/La-Pyrale-du-buis-en-milieu-naturel-projet-BioPyr (dernière visite le 12/09/18)

Annexe 1

Curriculum vitae

Mission d'enseignement

2015-2016 : **Enseignant vacataire**, Université d'Orléans

-Travaux pratiques Licence 1 Biologie Biochimie, Ecologie générale (17,5h)

2016-2017 : **Moniteur**, Université d'Orléans

-Travaux pratiques et dirigés Licence 1 Biologie Biochimie, Ecologie générale (25h)

-Travaux pratiques Licence 2 Biologie Biochimie, Ecologie des populations (16h)

-Travaux pratiques Licence 3 Biologie Biochimie, Biodiversité (23h)

Encadrement

- Co-Encadrement de stage de Alizée Ribas (L3), « Approche phylogéographique de l'invasion fulgurante de la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* en France. », 2016
- Co-Encadrement de stage de Charlotte Mathieu (M1), « Diversité génétique et biologie de la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis*. », 2016
- Co-Encadrement de stage de Alexis Groseiller (L2), appui à l'expérimentation Revive, 2017
- Co-Encadrement de stage de Augustine Jaccard (L3), « Diversité génétique de la pyrale du buis » 2017
- Co-Encadrement de stage de Laura Poitou (M2), « Rôles de la température et de la photopériode sur la levée de la diapause hivernale chez une espèce dont l'invasion est fulgurante en Europe, la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera, Crambidae) », 2018

Production scientifique



Publications

-Dinka Matošević, Ivan Lukić, **Audrey Bras**, Nikola Lacković, Milan Pernek (2017). Spatial Distribution, Genetic Diversity and Food Choice of Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*) in Croatia. South-East European forestry, 8 (1), 41–46.

-**Audrey Bras**, Laure Sauné, Alain Roques, Jérôme Rousselet, Marie-Anne Auger-Rozenberg (2018). Isolation and characterization of 15 microsatellite markers for the highly invasive box tree moth *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae). European Journal of Entomology, 115, 264-267.

 Communications orales

-**Audrey Bras**, Jérôme Rousselet, Alain Roques, Marie-Anne Auger-Rozenberg. L'invasion fulgurante de la pyrale du buis et exploration d'une méthode de lutte alternative. Journée de formation APJRC « le point sur les buis », Mettray, France, 09 septembre 2016

-**Audrey Bras**, Claudine Courtin, Mark Kenis, Alexis Bernard, Alain Roques, Jérôme Rousselet, Marie-Anne Auger-Rozenberg. L'invasion fulgurante de la pyrale du buis en France et en Europe : diversité génétique et approche phylogéographique. 4ème Conférence AFPP sur l'entretien des Jardins, Espaces Végétalisés et Infrastructures, Toulouse, France, 19-20 octobre 2016 (Communication orale avec article dans les actes du colloque)

-**Audrey Bras**, Dimitrios N. Avtzis, Mark Kenis, Gábor Vétek, Alain Roques, Jérôme Rousselet, Marie-Anne Auger-Rozenberg. A phylogeographic approach to trace the invasion pathways of the highly invasive box tree moth, *Cydalima perspectalis*, in Europe. IUFRO Conference Forest Insects and Pathogens in a Changing Environment: Ecology, Monitoring & Genetics, Thessalonique, Grèce, 11-15 septembre 2017

-**Audrey Bras**, Christelle Robinet, Christelle Suppo, Alain Roques, Jérôme Rousselet, Marie-Anne Auger-Rozenberg, Daniel Sauvard. Rapid spread of the invasive box tree moth throughout Europe: assessing its flight performance and growth rate. Studium, Orléans, France, 18-20 octobre 2017

-**Audrey Bras**, Alain Roques, Marie-Anne Auger-Rozenberg. L'invasion fulgurante de la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* en France et en Europe. ADALEP, Montpellier, France, 30-31 octobre 2017

-**Audrey Bras**, Jérôme Rousselet. L'invasion fulgurante de la pyrale du buis, Mardis de la Science, Orléans, France, 12 juin 2018

-Alexis Bernard, **Audrey Bras**, Mathieu Laparie, Laura Poitou, Christelle Robinet, Daniel Sauvard, Christelle Suppo, Marie-Anne Auger-Rozenberg, Alain Roques, Jérôme Rousselet. La Pyrale du Buis: un cas emblématique d'Invasion fulgurante. Douzième rencontre annuelle du GEFF (Groupement des Entomologistes Forestiers Francophones), Houffalize, Belgique, 11-13 septembre 2018

-**Audrey Bras**, Alain Roques, Marie-Anne Auger-Rozenberg. The box tree moth, a new pest in North America: What did we learn from its invasion in Europe? 21ST Ornamental Workshop on Insects and Diseases, Hendersonville, USA, 9-11 octobre 2018

-Daniel Sauvard, **Audrey Bras**, Alexis Bernard, Claudine Courtin, Caroline Viot, Alain Roques, Marie-Anne Auger-Rozenberg. Dynamique d'invasion et flux de population de la pyrale en France. AFPP Colloque Scientifique sur les Bioagresseurs du Buis, Tours, France, 16-17 octobre 2018

 Communications affichées

-**Audrey Bras**, Gábor Véték, Dinka Matošević, Evangelina Chatzidimitriou, Valery Shurov, Stanislav Gomboc, Milka Glavendekic, Stefanie Göttig, Annette Herz, Ivanka Ivanova, Gabrijel Seljak, Katalin Tuba, Alain Roques, Hongmei Li, Marc Kenis, Marie-Anne Auger-Rozenberg. Genetic diversity of the invasive box tree moth, *Cydalima perspectalis*, in its native and invaded areas and preliminary phylogeographic approach. IUFRO Conference Population Dynamics and Integrated Control of Forest Defoliating and other Insects, Sopot, Pologne, 28 septembre - 2 octobre 2015

-**Audrey Bras**, Gábor Véték, Dimitrios N. Avtzis, Mark Kenis, Alain Roques, Jérôme Rousselet, Marie-Anne Auger-Rozenberg. Tracing the invasion pathways of the highly invasive box tree moth, *Cydalima perspectalis*, in Europe: a phylogeographic approach. 9th International Conference on Biological Invasions – Neobiota 2016, Vianden, Luxembourg, 14-16 septembre 2016

-**Audrey Bras**, Alain Roques, Jérôme Rousselet, Marie-Anne Auger-Rozenberg. L'invasion fulgurante de la pyrale du buis en Europe : une approche phylogéographique. Colloque Biotechnocentre, Seillac, France, 13-14 octobre 2016

-**Audrey Bras**, Marie-Anne Auger-Rozenberg, Patrick Pineau, Philippe Lorme, Alain Roques, Mathieu Laparie, Jérôme Rousselet. Effet de micro-injections d'emamectine benzoate dans l'arbre hôte sur la survie des premiers stades larvaires de la pyrale du buis. 6^e Conférence AFPP sur les moyens alternatifs de protection pour une production intégrée, Lille, France, 21-23 mars 2017 (Poster avec article dans les actes du colloque)

Annexe 2

Article

Spatial Distribution, Genetic Diversity and Food Choice of Box Tree Moth (Cydalima perspectalis) in Croatia.

Matošević D., Lukić I., **Bras A.**, Lacković N., Pernek M.

South-East European Forestry, 2017, Vol.8, No.1, 41–46.

Spatial Distribution, Genetic Diversity and Food Choice of Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*) in Croatia

Dinka Matošević^{1*}, Ivan Lukić¹, Audrey Bras², Nikola Lacković¹, Milan Pernek¹

(1) Croatian Forest Research Institute, Cvjetno naselje 41, HR-10450 Jastrebarsko, Croatia; (2) INRA, UR633 Unité de Recherche de Zoologie Forestière, 2163 Avenue de la Pomme de Pin, CS 40001 ARDON45075 ORLEANS Cedex 2, France

* Correspondence: e-mail: dinkam@sumins.hr

Citation: MATOŠEVIĆ D, LUKIĆ I, BRAS A, LACKOVIĆ N, PERNEK M 2017 Spatial Distribution, Genetic Diversity and Food Choice of Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*) in Croatia. *South-east Eur for* 8 (1): early view. DOI: <https://doi.org/10.15177/seefor.17-06>

Received: 11 Mar 2017; **Revised:** 18 Apr 2017; **Accepted:** 19 Apr 2017; **Published online:** 5 May 2017

ABSTRACT

Background and Purpose: Box tree moth (*Cydalima perspectalis*: Lepidoptera, Crambidae) is an invasive species rapidly spreading through Europe and making considerable damage to native and planted European box plants (*Buxus* sp.). It has up to three generations per year and has no natural enemies in Europe which helps it to spread rapidly and to become highly invasive in its new range. The aim of this paper is to show i) spatial distribution, ii) number of generations; iii) food choice, and iv) genetic distribution of box tree moth in Croatia.

Materials and Methods: Occurrence data of box tree moth were obtained by field observation and data obtained from the general public. The number of generations of box tree moth was studied by direct observation of life stages on plants. Food choice test was conducted on *Buxus sempervirens*, *Ilex aquifolium*, *Euonymus japonicus* and *Ligustrum vulgare* used as food plants. Haplotype diversity and distribution of box tree moth was done for 5 localities in Croatia and their comparison to the haplotypes from China, Korea and 10 European countries.

Results: Box tree moth has rapidly spread over the whole territory of Croatia in 4 years and it has three generations per year. The larvae showed a clear preference for *B. sempervirens* leaves and the total consumption was 0.5 g/dry weight of box leaves/larva. Three haplotypes were observed and haplotype HT4 was found in 4 out of 5 sampling sites in Croatia. The haplotypes observed in Croatia were present in China, which indicates Chinese origin of Croatian populations.

Conclusions: Suitable European climate, widely available host plants and lack of natural enemies have enabled box tree moth to become highly invasive, to quickly disperse in its new environment and to make devastating damages to ornamental European box plants and hedges.

Keywords: invasive species, *Buxus sempervirens*, haplotypes, total consumption

INTRODUCTION

Increasing trade between continents has facilitated intentional and unintentional movement of insect species beyond their natural range [1, 2]. Trade in live ornamental plants is one of the main pathways of the introduction of non-native arthropods to Europe and among them insect pests [3, 4]. An increasing number of these alien pests originates from Asia [1].

Box tree moth (*Cydalima perspectalis* Walker, 1859; Lepidoptera, Crambidae) (BTM) is one of the recent introductions of non-native (alien) insect pests to Europe

[5]. It is native to East Asia [6] and in Europe it was first recorded in the Netherlands and Germany in 2007 [5, 7]. It is assumed that it was introduced to Europe with infested European box plants and since then it has rapidly spread to most European countries and the Caucasus region with further trade of infested plants [6, 8].

BTM larvae feed on *Buxus* sp. and cause complete defoliation and plant death [6]. The damage it causes is substantial since European box is widely used as popular ornamental plant in public and private gardens, historical

parks, cemeteries and other horticulturally important plantings [6]. Very valuable are unique natural European box populations in Europe and in the Caucasus [9] which are threatened by damages of this highly invasive species [10].

BTM overwinters in larval stage between European box leaves spun together with silk. Larvae need an obligate diapause of 6-8 weeks [11] and they complete their development in late spring after feeding voraciously and totally defoliating European box plants. Pupae are concealed in a cocoon of white webbing among the leaves and twigs. The females lay eggs on the underside of leaves in flat, barely visible egg clusters. Larval development takes 17 to 87 days, depending on the temperature [12]. In central Europe BTM develops two generations per year [11, 13], while three generations per year are reported from southern Germany [7], northern Italy [14], southwest Hungary [15], in comparison to three to five generations found in native China [11, 16].

BTM feeds only on the leaves of *Buxus* sp. [13], but *Euonymus japonicus* Thunb. and *Ilex purpurea* Hassk are mentioned as host plants in Japanese literature [7, 11]. Invasive species can alter their diet by adjusting to new hosts in the introduced region [13, 17], so there is a concern that BTM larvae could feed on European native species (*Ilex aquifolium* L., *Euonymus latifolius* L., *E. europaeus* L., *E. verrucosus* Scop.) that are growing in various continental and sub-Mediterranean forest communities in Croatia where they form important and biologically diverse understorey layer [18].

Only partial data on the occurrence of BTM in Croatia have been published [19] and since then there have been reports of damages from all over Croatia.

A preliminary genetic study on BTM was carried out by Bras et al. [20] to describe the genetic diversity in the native area (Asia) and in some European countries in the introduction area and to disentangle the invasion pathways of BTM introduction into Europe. They analysed a fragment of the mitochondrial genes COI-COII. For the present study, we used a subset of those data with a focus on Croatia, in order to compare the genetic variation in this country with other European countries and Asia.

Although widely present in Croatia, our knowledge about certain aspects of the biology and ecology of BTM has been limited. Therefore, in our research we focused on the following: i) detailed spatial distribution; ii) number of generations; iii) food choice, and iv) genetic distribution of BTM in Croatia.

MATERIALS AND METHODS

Spatial Distribution of Box Tree Moth

Data about the occurrence of BTM in Croatia were obtained by field observation conducted by the authors of this study and by the data obtained from professional nursery growers, other professionals working with plants and the general public (enquiries via the web portal Štetnici Hr and personal enquiries via phone and e-mail) in the years 2013, 2014, 2015 and 2016. For each location where BTM larvae and damages were found and reported, the name of

the location, geographic coordinates and the year of the first damages were recorded. Whenever possible, photographic material was requested from the general public to minimise false identification.

Spatial distribution map of BTM occurrence was made using ArcMap 10.1 (ESRI, USA).

The Number of Generations of Box Tree Moth

We researched the biology of BTM in 2014 by direct observations of life stages on European box plants. The plants were located in Zagreb (45°49'12.18"N; 15°59'22.97"E) and Jastrebarsko (45°40'14.87"N; 15°38'41.58"E). The plants were checked every week from April until October. We did not measure the dimensions of larvae in different larval stages, but only observed the presence of larvae, pupae and adults. Adults were observed on plants, street and home lights on the locations of observations.

Food Choice Test of Box Tree Moth

Food choice test was conducted in the entomological laboratory of Croatian Forest Research Institute. BTM larvae were collected in April 2015 in Jastrebarsko (45°40'14.81"N, 15°38'47.91"E). We collected the young overwintering larvae and we tried to choose larvae which were approximately the same size but without determination of exact larval stages. *Buxus sempervirens*, *Ilex aquifolium*, *Euonymus japonicus* and *Ligustrum vulgare* L. were chosen as food plants. *Ilex aquifolium* was chosen because it grows naturally in forests and is protected by Croatian law on nature protection. *Euonymus japonicus* belongs to the same genus as the native *E. latifolius*, *E. europaeus*, *E. verrucosus*. *Euonymus japonicus* was easily available for the test and is an ornamental plant very often grown together with European box. *Euonymus latifolius*, *E. europaeus* and *E. verrucosus* were not tested since their leaves were not easy to obtain at the time of the test. We assumed that preliminary test on any member of the genus *Euonymus* could show preference of BTM for this plant genus. *Ligustrum vulgare* was tested because we received lots of reports from the general public about damages from BTM larvae on *L. vulgare* and because both *Buxus* and *Ligustrum* are often planted in the same hedge.

We used 50 larvae for each food plant, each larva kept separately in a petri dish. They were kept under laboratory conditions of 20±1 °C with a relative humidity of 65% and a photoperiod of 16h:8h (L:D). Fresh leaves were collected every week from the same plant and kept on twigs in glass jars with water. Leaves of chosen food plants were weighed in a fresh state on a Sartorius BD ED 100 (ATL 224-I) analytical laboratory balance (limit 0.001 g) and then given to larvae. Fresh leaves were added when the larvae consumed them or when they dried out, usually every day or every other day. All leftover leaf material was collected, oven dried at 70°C for 24 hours and weighed.

Total consumption (T_c) was calculated according to Waldbauer [21] using formula: $T_c = [(L_{wg} * (F_w/D_w)) - L_{wl}]$ where L_{wg} is the weight of fresh leaves given to larvae and L_{wl} is leftover leaf material, both of them in dry weight/gram (dw/g). To obtain the value of L_{wg} in dry weight/gram, a coefficient F_w/D_w (F_w -fresh weight of leaves, D_w -dry weight of leaves) obtained from 10 leaves (similar in shape and size

to the leaves that were given to larvae) was used. To obtain the dry weight of L_{wg} and L_{wf} , they were oven dried at 70°C for 24 hours.

Genetic Distribution

Sampling of material, DNA extractions, PCR amplifications of COI-COII and sequencing were performed following the protocol described in Bras *et al.* [20]. Specimens of BTM were collected in the native area (China and Korea) and in the introduced area (Austria, Belgium, Bulgaria, France, Germany, Hungary, Italy, Serbia, Slovenia and Switzerland) as described in Bras *et al.* [20]. In addition, a total of 18 BTM specimens belonging to 5 localities in Croatia were collected in 2014. Butterflies were collected in Osor and Artatore (Mali Lošinj) and caterpillars were collected on European box plants on three others localities (Zagreb, Vinica, Višnjevac). Haplotype diversity and haplotype distribution were calculated with DNAsp v.5. [22].

RESULTS AND DISCUSSION

Spatial Distribution of Box Tree Moth in Croatia

Data on the occurrence of BTM in Croatia yielded a distribution map (Figure 1) with different layers for each year (2013, 2014, 2015 and 2016). In this graphic depiction it is clearly visible that BTM has in 4 years spread rapidly over whole Croatia. The pest was first recorded in Istria in 2012 [23] and the first outbreak was recorded in the region around Varaždin in 2013 [19] (Figure 1). The pest quickly spread eastwards and southwards in 2014, and by the end of 2016 all the locations we examined showed presence

of the moth. The spread was facilitated by the movement of infested plant material since European box plants with presence of larvae were observed in several garden centres in Croatia (Dinka Matošević, personal observation). During our research we have seen and received numerous reports on damages on valuable European box ornamental hedges and plantings in Croatia (e.g. Trsteno Arboretum and Lokrum Island near Dubrovnik). European box is also a part of traditional folk costume in the region of Novi Vinodolski, while old European box plants are an important part of public and private gardens in this region. In 2014 and 2015 all European box in this region has been defoliated by BTM which caused loss of valuable old plants and concern among local citizens.

The Number of Generations of Box Tree Moth in Croatia

On the basis of field observations we can assume that BTM has three generations per year in Croatia (Table 1). In 2014, we observed overwintering larvae feeding until the end of May and the beginning of June, pupae and then adults emerging during June. Young larvae were observed from 5 July 2014 and moths were observed flying from 1 to 15 August. Young larvae were again found on leaves from 15 August and adults were observed again in October 2014.

CLIMEX model [11] shows 3 generations per year for continental Croatia (Marc Kenis pers. comm.); 3 generations have been observed in northern Italy [14] and southwestern Hungary [24], which is comparable to our results. The average monthly air temperature in continental Croatia was in June 2014 in the category very warm with average daily temperatures above 25°C, in August and September 2014 in the category normal and in October 2014 in the category

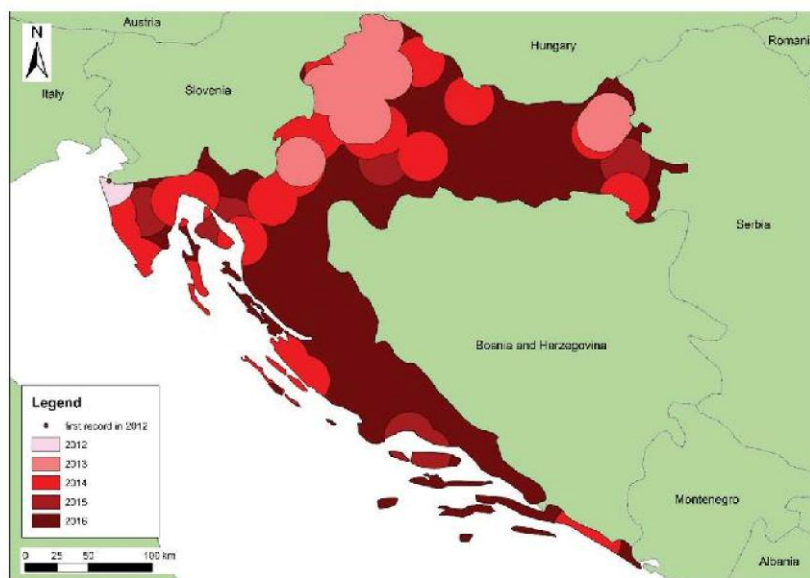


FIGURE 1. The map of yearly spread of box tree moth (*Cydalima perspectalis*) infestations in Croatia. Infestations are visualized with 20 km buffers around confirmed infestation points and coloured according to the year of observation.

very warm [25]. These conditions were favourable for BTM to develop 3 generations per year since larval development takes 23 days at 25°C, and 17 days at 30°C [12] with adults living up to two weeks [6] (Mark Kenis pers. comm.). Very similar occurrence of adults and three generations were recorded in Győr-Bácsa (NW Hungary) in 2014 [24].

Food Choice of Box Tree Moth

BTM larvae showed a clear preference for *B. sempervirens* leaves. The mortality rate of larvae feeding on European box leaves was 5% and the total consumption was 0.5 g/dry weight of box leaves/larva. Larvae successfully pupated and moths emerged.

Larvae did not develop on the other three tested species (*E. japonicus*, *I. aquifolium* and *L. vulgare*). The mortality rate of larvae on these three species was 100% with no feeding or growth recorded.

Our results show that BTM do not feed on *Ilex aquifolium* and *Euonymus japonicus* and therefore we assume that they pose no threat to native and protected *I. aquifolium* growing in Croatian forests. Although we did not make food test on *Euonymus latifolius*, *E. europaeus* and *E. verrucosus* we can also assume that box tree moth is also not able to feed on our native *Euonymus* species.

Genetic Distribution

In the native area, 6 haplotypes were observed in China [20]. Among them, 4 haplotypes were present in the introduced area but were not homogeneously distributed between countries (Figure 2b).

In Croatia, a total of 3 haplotypes were observed (Table 2). The haplotype HT4 was the most abundant. It was found in 4 sampling localities including Višnjevac where it was the only haplotype observed in the 5 sequenced specimens (H = 0) (Figure 2a). We observed one haplotype in Vinica (HT2), which is the first place where a BTM outbreak was observed in Croatia [19].

The haplotypes observed in Croatia were present in China, which indicates Chinese origin of Croatian populations, and which corresponds to the assumptions of Nacambo *et al.* [11] for the origin of the invasive populations of BTM in Europe. Moreover, Bras *et al.* [20] observed a spatial genetic structuration in the introduced area with the presence of two groups: West Europe (HT1 mostly observed) and Southeast Europe (HT4 mostly observed). Our results (HT4: 13 specimens for 18 sequenced) indicate that Croatia belongs to the south-eastern group. In addition, high genetic diversity (3 out of the 4 haplotypes present in Europe) observed in Croatia may suggest a multiple introduction

TABLE 1. Field observations of the development of box tree moth (*Cydalima perspectalis*) in 2014. The presence of larvae on plants is shown in table as circles, and the presence of adults is shown as a butterfly symbol.

Month	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Larvae	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Adult						♂		♂		♂		

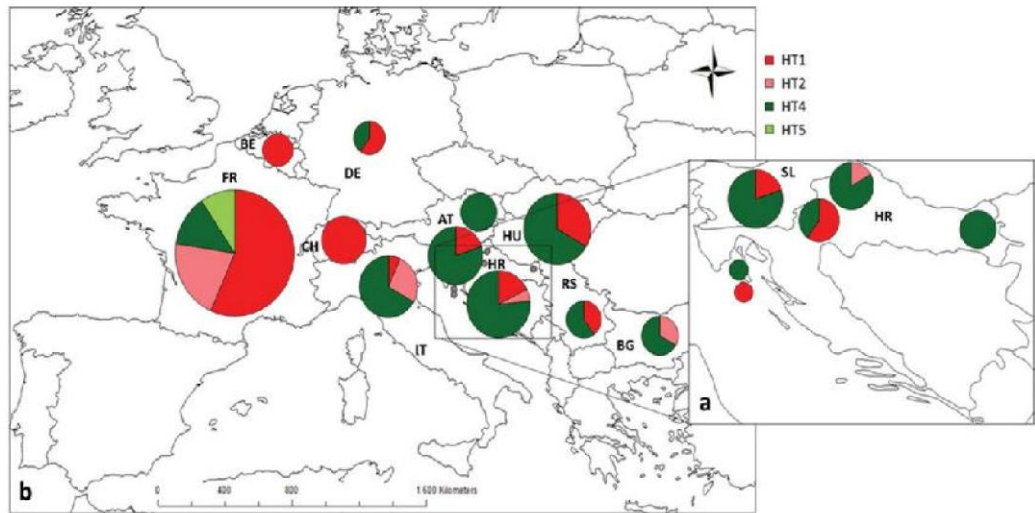


FIGURE 2. Haplotype distribution of box tree moth (*Cydalima perspectalis*) in Europe based on data (a) from the present study on Croatia and (b) Bras *et al.* [20] for other European countries. Circle size is proportional to the number of individuals. FR: France; DE: Germany; BE: Belgium; CH: Switzerland; IT: Italy; AT: Austria; SL: Slovenia; HR: Croatia; HU: Hungary; RS: Serbia; BG: Bulgaria.

TABLE 2. The list of samples of *C. perspectalis* from Croatia and haplotype distribution per population (N = Number of individuals per population, H = Haplotype diversity).

Populations	N	Haplotypes	H
Zagreb	5	HT1 (3); HT4 (2)	0.60 (± 0.18)
Vinica	6	HT4 (5); HT2 (1)	0.33 (± 0.22)
Višnjevac	5	HT4 (5)	0
Osor	1	HT4 (1)	-
Artatore (Mali Lošinj)	1	HT1 (1)	-
Total	18	HT1 (4); HT2 (1); HT4 (13)	0.45 (± 0.12)

event of BTM. Nevertheless, information on the ornamental plant trade in Croatia will help to better understand invasive pathways of BTM.

CONCLUSIONS

BTM is an invasive insect pest that has rapidly spread on the whole territory of Croatia in the period of 4 years causing complete defoliation and death of ornamental European box plants. This rapid dispersal and severe damages are possible by developing three generations per year. BTM shows clear preference for *Buxus sempervirens* only. Croatian haplotypes show a Chinese origin of the species with high probability of multiple introductions by infested plant material. When alien phytophagous insects arrive at a new location, their survival, establishment and

spread depend on various factors such as the availability of preferred host plants and the suitability of the local climate [26]. Suitable European climate, widely available host plants and lack of natural enemies [27] have enabled this insect pest to become highly invasive and quickly disperse in its new environment.

Acknowledgments

We would like to thank Nikola Zorić and Blaženka Ercegovac for their help in field and laboratory work. We would also like to thank Marie-Anne Auger-Rozenberg for her useful comments on genetic distribution. This research has been fully supported by the Croatian Science Foundation (project "Defoliators as Invasive Forest Pests in Changing Climate Conditions" DIFPEST 7616). We would like to acknowledge support for the genetic research from the French Region Centre Val-de-Loire (project INCA APR IR 2015 – 0009 673).

REFERENCES

- ROQUES A 2010 Alien forest insects in a warmer world and a globalised economy: impacts of changes in trade, tourism and climate on forest biosecurity. *New Zeal J For Sci* 40 (suppl.): 77-94
- LIEBHOLD AM, BROCKERHOFF EG, GARRETT LJ, PARKE JL, BRITTON KO 2012 Live plant imports: the major pathway for forest insects and pathogen invasions of the US. *Front Ecol Environ* 10 (3): 135-143. DOI: <https://doi.org/10.1890/110198>
- KENIS M, RABITSCH W, AUGER-ROZENBERG MA, ROQUES A 2007 How can alien species inventories and interception data help us prevent insect invasions? *Bull Entomol Res* 97 (5): 489-502. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007485307005184>
- ROQUES A, RABITSCH W, RASPLUS JY, LOPEZ-VAAMONDE C, NENTWIG W, KENIS M 2009 Alien Terrestrial Invertebrates of Europe. In: Drake JA (ed) *Handbook of Alien Species in Europe*. Springer, Netherlands, pp 63-79. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8280-1_5
- KRÜGER EO 2008 *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) – new for the European fauna (Lepidoptera: Crambidae). *Entomologische Zeitschrift mit Insekten-Börse* 118 (2): 81-83
- CABI 2017 *Cydalis perspectalis* (Box Tree Moth). URL: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/118433> (2 February 2017)
- VAN DER STRATEN MJ, MUUS TST 2010 The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. In: Bruin J (ed) *Proceedings of the Netherlands Entomological Society*, 18 December 2009, Volume 21, 107-111
- GNINENKO YI, SHIRYAEVA NV, SHUROV VI 2014 The box tree moth—a new invasive pest in the Caucasian forests. *Plant Health - Research and Practice* 1 (7): 32-39
- DOMENICO FDI, LUCCHESI F, MAGRI D 2012 *Buxus* in Europe: late quaternary dynamics and modern vulnerability. *Perspect Plant Ecol* 14 (5): 354-362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.07.001>
- KENIS M, NACAMBO S, LEUTHARDT FLG, DOMENICO FDI, HAYE T 2013 The box tree moth, *Cydalis perspectalis*, in Europe: horticultural pest or environmental disaster? *Aliens* 33: 38-41.
- NACAMBO S, LEUTHARDT FLG, WAN H, LI H, HAYE T, BAUR B, WEISS RM, KENIS M 2014 Development characteristics of the box-tree moth *Cydalis perspectalis* and its potential distribution in Europe. *J Appl Entomol* 138 (1-2): 14-26. DOI: <https://doi.org/10.1111/jen.12078>

12. MARUYAMA T, SHINKAJI N 1991 The life-cycle of the box-tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). II. Developmental characteristics of larvae. *Jpn J Appl Entomol* 35 (3): 221-230. DOI: <https://doi.org/10.1303/jjaez.35.221>
13. LEUTHARDT FLG, BAUR B 2013 Oviposition preference and larval development of the invasive moth *Cydalima perspectalis* on five European box-tree varieties. *J Appl Entomol* 137 (6): 437-444. DOI: <https://doi.org/10.1111/jen.12013>
14. SANTI F, RADEGHIERI P, SIGURTÀ GI, MAINI S 2015 Sex pheromone traps for detection of the invasive box tree moth in Italy. *B Insectology* 68 (1): 158-160
15. TUSKE É, MARCZALI Z 2016 Study on the seasonal flight of the box tree moth (*Cydalima perspectalis* Walker 1859) in county Zala, Hungary in 2015. *NÖVÉNYVÉDELLEM* 77 (52) 2: 65-68
16. TANG SJ, QIN HZ, SUN W 1990 Studies on bionomics of *Diaphania perspectalis*. *Journal of Shanghai Agricultural College* 8 (4): 307-312
17. LOCKWOOD JL, HOOPES MF, MARCHETTI MP 2007 Invasion ecology. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, 304 p
18. VUKELIĆ J 2012 Šumska vegetacija Hrvatske. Faculty of Forestry University of Zagreb, Zagreb, Croatia, 403 p
19. MATOŠEVIĆ D 2013 Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*, Lepidoptera; Crambidae), New Invasive Insect Pest in Croatia. *South-east Eur forestry* 4 (2): 1-6. DOI: <https://doi.org/10.15177/see-for.13-09>
20. BRAS A, COURTIN C, KENIS M, BERNARD A, ROQUES A, ROUSSELET J, AUGER-ROZENBERG MA 2016 L'invasion fulgurante de la pyrale du buis en France et en Europe: diversité génétique et approche phylogéographique. In: Actes de la 4ème Conférence AFPP sur l'entretien des Jardins, Espaces Végétalisés et Infrastructures, Toulouse, France 19-20 October 2016.
21. WALDBAUER G 1968 The consumption and utilization of food by insects. *Advan Insect Physiol* 5: 229-288
22. LIBRADO P, ROZAS J 2009 DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (11): 1451-1452. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
23. KOREN T, ČRNE M 2012 The first record of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera, Crambidae) in Croatia. *Nat Croat* 21 (2): 507-510
24. HAVASRÉTI B 2017 Kártevő-helyzet a Győr-bácsi fénycsapda alapján – 2007-2011. URL: <http://szigetkoz.eu/kartevo.html> (2 April 2017)
25. DHMZ 2017 Mjesečno, sezonsko i godišnje praćenje klime. URL: http://klima.hr/ocjene_arhiva.php (2 April 2017)
26. ELTON CS 1958 The Ecology of Invasions by Animals and Plants. Springer, New York, United States, 181 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7214-9>
27. WAN H, HAYE T, KENIS M, NACAMBO S, XU H, ZHANG F, LI H 2014 Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe? *J Appl Entomol* 138 (10): 715-722. DOI: <https://doi.org/10.1111/jen.12132>

Annexe 3

Article

Effet de micro-injections d'emamectine benzoate dans l'arbre hôte sur la survie des premiers stades larvaires de la pyrale du buis.

Bras A., Auger-Rozenberg M.-A., Pineau P., Lorme P., Roques A., Laparie M., Rousselet J.

Actes de la 6e conférence AFPP sur les moyens alternatifs de protection pour une production intégrée, Lille, France (2017-03-21 - 2017-03-23).

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTÉGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

**EFFET DE MICRO-INJECTIONS D'EMAMECTINE BENZOATE DANS L'ARBRE HÔTE SUR LA SURVIE DES
PREMIERS STADES LARVAIRES DE LA PYRALE DU BUIS**

BRAS A. ⁽¹⁾, AUGER-ROZENBERG M.-A. ⁽¹⁾, PINEAU P. ⁽¹⁾, LORME P. ⁽¹⁾, ROQUES A. ⁽¹⁾, LAPARIE M. ^{(1)*},
ROUSSELET J. ^{(1)*}

*Co-derniers auteurs (contribution égale des auteurs à l'encadrement de l'étude)

⁽¹⁾ INRA, UR633 Zoologie Forestière, Orléans, France, jerome.rousselet@inra.fr

RÉSUMÉ

La formulation insecticide Revive[®], à base d'emamectine benzoate, est utilisée en micro-injection dans les troncs d'arbre pour lutter durant une à plusieurs années contre différents ravageurs. Depuis l'invasion en Europe de la pyrale du buis, le traitement des buis ornementaux par les méthodes actuelles (ex : *Btk*) doit être répété plusieurs fois par an pour limiter efficacement les défoliations. Pour évaluer l'intérêt des injections sur des buis ornementaux, trois volumes différents de Revive[®] ont été injectés dans des buis de diamètre 3 ± 1 cm et leur survie a été comparée à celles de buis témoins sans injection ou avec injection d'eau. L'efficacité du Revive[®] contre le ravageur a été testée en comptabilisant le taux de mortalité de jeunes chenilles néonates après environ huit jours d'alimentation sur des branches issues de chaque condition. La mortalité atteint de 46,1% à 62,5% selon le volume de Revive[®] injecté, contre moins de 10 % pour les arbres témoins. Ces premiers résultats positifs ne permettent cependant pas encore de déterminer la dose minimale efficace. Elle doit être définie en fonction de la taille des arbres à traiter, de la cinétique d'efficacité du produit sur les larves, et de sa durée de rémanence dans les arbres traités.

Mots-clés : Micro-injection, insecticide, Insecte invasif, *Cydalima perspectalis*, *Buxus*

ABSTRACT

Effect of emamectin benzoate tree micro injection on the survival rate of the first larval instar of the box tree moth

Revive[®], an emamectine benzoate formulation, is used as tree micro injection into the trunk of trees to limit, over several years, the damage associated with multiple pests. Since the invasion of the box tree moth in Europe, treatment of ornamental box trees using current methods (*i.e.*, *Btk*) must be repeated several times a year to effectively reduce defoliations and prevent tree mortality. To assess the relevance of Revive[®] injections in ornamental box trees, three distinct volumes of the product have been injected in trees of 3 ± 1 cm diameter, and their survival was then compared with control trees with either no injection or water injection. The effectiveness of Revive[®] against the pest was tested by checking mortality of young neonate larvae after *ca.* eight days feeding on branches from each condition. Mortality reached 46.1% to 62.5% depending on the injected volume of Revive[®], *versus* less than 10% in control conditions. However, these positive results are still preliminary and do not allow determining the minimal effective dose yet. This dose must be determined depending on the size of target trees, the kinetics of the insecticide's effect on larvae, and its remanence in injected trees.

Keywords: Tree micro injection, insecticide, invasive insect, *Cydalima perspectalis*, *Buxus*

INTRODUCTION

La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Walker 1859), est un lépidoptère originaire d'Asie observé pour la première fois en Europe en 2007 (Krüger 2008). Ses larves défoliatrices sont connues pour faire leur développement sur une quinzaine d'espèces du genre *Buxus*, dont *B. sempervirens* le buis commun européen, très apprécié notamment pour ses qualités ornementales (Jones 2014). La pyrale du buis a connu une expansion fulgurante probablement due au commerce de buis ornementaux (Van der Straten et Muus 2010 ; Brua 2013 ; Kenis et al. 2013 ; Roques et al. 2016) et est désormais présente dans au moins 27 états européens, dont la France où elle a d'ores et déjà colonisé 79 départements (Astredor & Plante & Cité, 2015 ; Bras et al. 2016). Les défoliations importantes et répétées dues aux pullulations de cet insecte multivoltin peuvent entraîner la mort des buis attaqués en quelques générations (Kenis et al. 2013). Présent désormais aussi bien dans les jardins à la française que dans les buxaies naturelles, cet insecte invasif constitue une menace à la fois pour le patrimoine culturel et naturel.

Plusieurs méthodes de lutte sont en cours de développement ou d'évaluation afin de construire une stratégie de gestion de cette espèce (Guérin et al. 2016). Les essais effectués concernent des méthodes de lutte ciblant les chenilles (pulvérisation de pyrèthre, de spinosad, de *Bacillus thuringiensis kurstaki* - *Btk*, de nématodes), les papillons mâles (piégeage phéromonal de masse), et les œufs (recherche de souches de trichogrammes capables de s'attaquer à la pyrale du buis) (Enriquez et al. 2015 ; Venard et al. 2016 ; Martin et al. 2015 ; Martin et al. 2016 ; Cartier & Cornillon 2016 ; Guérin et al. 2016 ; Rose et al. 2013). L'efficacité des actions entreprises est généralement fortement dépendante de leur mise en œuvre au bon moment du cycle biologique du ravageur (Guérin et al. 2016), qui peut varier d'une région à l'autre, et d'une année à l'autre (Nacambo et al. 2014). C'est en particulier le cas pour les traitements au *Btk* qui constituent l'une des méthodes de lutte actuellement les plus employées. Pour préserver les buis de ce ravageur, les pulvérisations doivent être appliquées à chacune des trois générations de l'année, dont l'apparition peut être notamment inférée par *monitoring* du vol des papillons à l'aide de pièges à phéromone (Guérin et al. 2016). Cependant, à partir du milieu de l'été, on peut parfois assister à un étalement du vol des adultes et à une présence plus ou moins continue de chenilles, sans distinction nette entre générations, compliquant la lutte. Par ailleurs, les traitements au *Btk* peuvent avoir des impacts sur les lépidoptères non cible et doivent être effectués dans des conditions permettant de les éviter (conditions météorologiques n'entraînant pas de lessivage, application bien ciblée sur les buis à traiter, ...). Il est également nécessaire de respecter un délai de rentrée dans les lieux ouverts au public.

Nous présentons ici les résultats de tests préliminaires visant à évaluer l'efficacité contre la pyrale du buis de micro-injections dans les buis du produit Revive®, une spécialité commerciale à base d'emamectine benzoate sous forme de micro-émulsion. Cette substance est un dérivé de la famille des avermectines qui sont des composés produits par des bactéries du sol, et utilisés de longue date en phytopharmacie et pharmacie vétérinaire pour leurs effets nématocide et insecticide (Bourdrez et al. 2014 ; Doccola & Wild 2012). Ils agissent par contact ou ingestion et paralysent l'insecte par effet agoniste de l'acide gamma aminobutyrique et activation des canaux chlorés du système nerveux (Bourdrez et al. 2014 ; Fettig et al. 2013). L'efficacité de l'emamectine benzoate a déjà été évaluée sur plusieurs coléoptères et lépidoptères, notamment aux Etats-Unis (e.g. Fettig et al. 2013 ; Cook et al. 2013a,b ; Fidgen et al. 2013 ; Bourdrez et al. 2014), et la formulation insecticide Revive® est actuellement homologuée en France contre le charançon rouge du palmier (AMM n°2140041). La technique de micro-injection présente l'avantage de limiter la quantité de produit phytosanitaire nécessaire, d'éviter les risques de lessivage et de dérive sur les végétaux non traités inhérents aux pulvérisations (Bourdrez et al. 2014) et, surtout, pourrait permettre de protéger les arbres traités de plusieurs mois à quelques années sans nécessiter de répéter l'application à chaque nouvelle génération (Doccola & Wild 2012 ; Bourdrez et al. 2014). Contrairement aux autres méthodes de lutte, la technique de micro-injection est sans doute difficile à mettre en œuvre à large échelle sur un grand nombre d'arbres, mais elle pourrait venir compléter le panel de méthodes disponibles. De par ses caractéristiques, elle apparaîtrait particulièrement adaptée à la protection de sujets remarquables (arbres taillés de longue date des jardins à la française et de l'art topiaire, vieux buis des villes et villages, ...) (i) si son efficacité et sa rapidité d'action étaient suffisantes pour notablement limiter les

défoliations, (ii) si sa persistance d'action chez le buis était suffisamment longue pour limiter le nombre d'interventions, (iii) si la blessure causée par l'injection, et *a fortiori* par des injections répétées, était sans effet négatif majeur sur la santé du buis traité et si (iv) la présence de résidus dans des parties de la plante susceptibles d'être disséminées (pollen, feuillage taillé ou tombé au sol), et leur demi-vie dans l'environnement étaient faibles.

L'objectif de cette étude exploratoire se limite à une première évaluation de l'effet d'injections de différents volumes de Revive® sur la survie des arbres traités et des jeunes stades de pyrale du buis. Cette expérience réalisée sur des buis de faible section (diamètre de 3 ± 1 cm) a été complétée dans un site naturellement infesté par la pyrale du buis par des observations de dégâts sur des buis traités et non traités de forte section (diamètre de 9 ± 1 cm) dont la taille correspond à celle de vieux sujets remarquables.

MATERIEL ET MÉTHODE

SITE ET TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX

Traitements par micro-injection (TMI)

Les expérimentations ont été conduites au lieu-dit « Le Petit bois » à Mettray (Indre-et-Loire, France, 47°27'07"N ; 0°39'30"E) où les buis, dont de nombreux individus centenaires, constituent une grande partie du sous-bois. Les arbres de l'expérimentation ont été sélectionnés en fonction de deux critères : l'intensité des défoliations lors de l'année 2015 et le diamètre du tronc à 30 centimètres du sol. Seuls les arbres dont le pourcentage de défoliation était inférieur à 50% ont été choisis, et prioritairement ceux défoliés à moins de 25%. De même, seuls les arbres de diamètre compris entre 2 et 4 cm ont été sélectionnés afin de standardiser au maximum le protocole d'injection.

Le produit Revive® injecté dans les arbres est une micro-émulsion à base de 4 % d'émamectine benzoate, commercialisée et fournie par l'entreprise Syngenta. Le produit a été injecté à la base du tronc à l'aide d'une seringue spécifique pour les TMI suivant l'expertise de l'entreprise Syngenta, habilitée à réaliser les injections. Trois volumes d'injection différents de Revive® ont été comparés : 0.75 mL (R1), 1.5mL (R2) et 3.0 mL (R3). Pour pouvoir tester l'impact du Revive® sur la survie du buis, deux conditions contrôle ont également été considérées : injection d'1.5 mL d'eau (CW) et aucune injection (C). Suivant les recommandations de Syngenta, un trou unique d'injection dans le tronc a été fait pour les volumes de R1 et R2, et deux trous de part et d'autre du tronc pour le volume R3. Chaque trou a été rebouché avec un *plug* biodégradable pour limiter tout risque de contamination ultérieure par des agents pathogènes. Au total, 50 arbres ont été suivis pour l'expérimentation à raison de 10 réplicats par condition testée (trois volumes d'injection différents et deux conditions témoin). L'ensemble des injections a été réalisé au début du mois de mai.

Afin d'explorer l'intérêt et la faisabilité des injections sur de gros buis patrimoniaux, une expérimentation exploratoire de TMI a été réalisée sur des buis ayant un diamètre compris entre 8 et 10 cm à 30 cm du sol. Au total, 8 arbres présentant des dégâts inférieurs à 25% de défoliations ont été sélectionnés. Deux arbres ont été utilisés comme témoins sans injection et l'injection du Revive® a été faite pour six arbres à différents volumes adaptés à leur diamètre : 2.5mL (R4), 5mL (R5) et 10 mL (R6), à raison de deux réplicats par condition. Quatre trous d'injections ont été faits de part et d'autre du tronc.

Tests d'alimentation

Pour tester l'effet du Revive® sur la mortalité de la pyrale du buis, des chrysalides ont été prélevées sur le site du « Petit Bois » puis placées en chambre climatique à 21 ± 1 °C (photopériode 16:8 L:D) jusqu'à émergence. Les papillons obtenus ont été placés dans une cage de reproduction jusqu'à la ponte et les œufs ont été prélevés tous les jours. Le nombre d'œufs a ensuite été compté pour chaque ponte puis des lots de 45 œufs ± 10 ont été constitués pour la suite de l'expérimentation au laboratoire.

Trois branches ont été prélevées à trois hauteurs différentes (bas, milieu, haut) de chaque arbre de l'expérimentation afin d'éviter un éventuel biais de répartition hétérogène du produit dans l'arbre. Chaque lot d'œufs a été placé deux à quatre jours après la ponte sur un groupe de trois branches de buis collectées, mis en boîte d'élevage et placé en chambre climatique à 21 ± 1 °C (16:8 L:D). Après deux jours, les pontes ont été retirées des boîtes d'élevage afin de comptabiliser le nombre d'œufs vides et déduire le taux d'éclosion. Huit jours après l'installation des œufs sur le feuillage, les chenilles vivantes et mortes ont été comptabilisées dans chaque réplicat.

ANALYSES STATISTIQUES

Un modèle linéaire généralisé pour données binomiales (famille = « quasibinomiale » afin de tenir compte de la surdispersion, lien = « logit ») a été constitué pour réaliser une analyse de déviance et tester l'influence, sur la mortalité des chenilles, du traitement (C, CW, R1, R2, R3), de la covariable diamètre de l'arbre et de l'interaction entre ces deux variables. Un test *post-hoc* de Tukey a ensuite été réalisé pour comparer deux à deux les niveaux du facteur traitement. L'adéquation de la distribution des résidus du modèle à la Loi Normale a été préalablement vérifiée par représentation graphique de type Q-Q plot et confirmée par un test de Shapiro-Wilk. Un second modèle linéaire généralisé pour données binomiales (famille = « quasibinomiale », lien = « logit ») a été utilisé pour réaliser une régression logistique de la mortalité en fonction du volume de Revive® injecté (0, 0.75, 1.5 ou 3 mL). Une transformation $\log(1 + x)$ a été appliquée à la variable explicative, permettant un meilleur ajustement du modèle. L'adéquation de la distribution des résidus à la Loi Normale a à encore été vérifiée par représentation graphique de type Q-Q plot et test de Shapiro-Wilk. L'ensemble des tests statistiques et des figures a été réalisé sous R 3.3.2 (R Development Core Team, 2008).

RESULTATS

DESCRIPTION DU JEU DE DONNEES

Cinq mois après injection, aucune mortalité n'a été constatée dans les arbres de l'expérience. Les branches utilisées pour l'expérimentation au laboratoire ont été prélevées sur des buis de manière semi-randomisée afin de gommer d'éventuels effets liés à la taille de l'arbre sur la mortalité des chenilles. Les branches utilisées pour l'expérimentation au laboratoire un mois et demi après l'injection ont été prélevées sur des buis de manière semi-randomisée afin de gommer d'éventuels effets liés à la taille de l'arbre sur la mortalité des chenilles. Ainsi, indépendamment du traitement, les rameaux étaient issus de plusieurs arbres de diamètre (à 30 cm de hauteur) similaire (Tableau I).

Après éclosion des œufs disposés sur les branches, nous avons constaté des effectifs de chenilles inférieurs au nombre d'œufs éclos, indiquant une activité locomotrice importante et la fuite potentielle de certains individus hors des boîtes d'élevage. Il n'a ainsi pas été possible d'évaluer la mortalité de l'ensemble des individus éclos, c'est pourquoi nous avons décidé de réaliser nos calculs sur la base du nombre de chenilles (vivantes ou mortes) retrouvées dans les boîtes d'élevage huit jours après dépôt des œufs sur les branches (Tableau I).

En raison du grand nombre de larves, les 50 réplicats initialement prévus n'ont pas pu être traités simultanément à l'issue des huit jours d'expérimentations, et la mortalité a ainsi été comptabilisée au bout de 10 jours dans cinq des réplicats. Estimant que ce décalage de deux jours pouvait constituer un biais significatif compte tenu d'une durée d'exposition plus importante au produit Revive®, nous avons décidé de retirer ces réplicats pour nos analyses (Tableau II). Le niveau de variance de la durée constatée entre le comptage de la mortalité au bout de huit jours sur branche et la date de ponte initiale est ainsi resté très limité, de même que le niveau de variance du diamètre moyen des arbres dont les branches ont été utilisées dans les différentes conditions (Tableau I, Tableau II).

Tableau I : Description des échantillons et des branches de buis utilisés pour les cinq traitements comparés en conditions expérimentales (les valeurs de diamètre et de durée sont données en moyenne $\pm$ écart-type).

Description of samples and box tree branches used for the five treatment conditions compared in the experiment (values for diameter and duration are given as mean $\pm$ standard deviation).

Traitement	C	CW	R1	R2	R3	Total
<i>N réplicats</i>	10	10	10	10	10	50
<i>N total de larves comptées</i>	306	324	333	355	346	1664
<i>Diamètre des arbres (cm)</i>	2.78 $\pm$ 0.40	2.84 $\pm$ 0.31	2.83 $\pm$ 0.22	3.03 $\pm$ 0.28	3.25 $\pm$ 0.39	2.95 $\pm$ 0.32
<i>Durée entre la ponte et le contrôle de la survie (j)</i>	9.90 $\pm$ 1.37	9.90 $\pm$ 1.52	9.40 $\pm$ 0.52	9.80 $\pm$ 1.32	10.50 $\pm$ 1.78	9.52 $\pm$ 1.30

Tableau II : Description des échantillons retenus pour l'analyse des données, correspondant aux réplicats dont la mortalité a pu être comptabilisée huit jours après le dépôt des œufs sur les branches de buis (les valeurs de diamètre et de durée sont données en moyenne $\pm$ écart-type).

Description of the samples kept for data analyses, corresponding to replicates for which mortality could be measured eight days after eggs were positioned on box tree branches (values for diameter and duration are given as mean $\pm$ standard deviation).

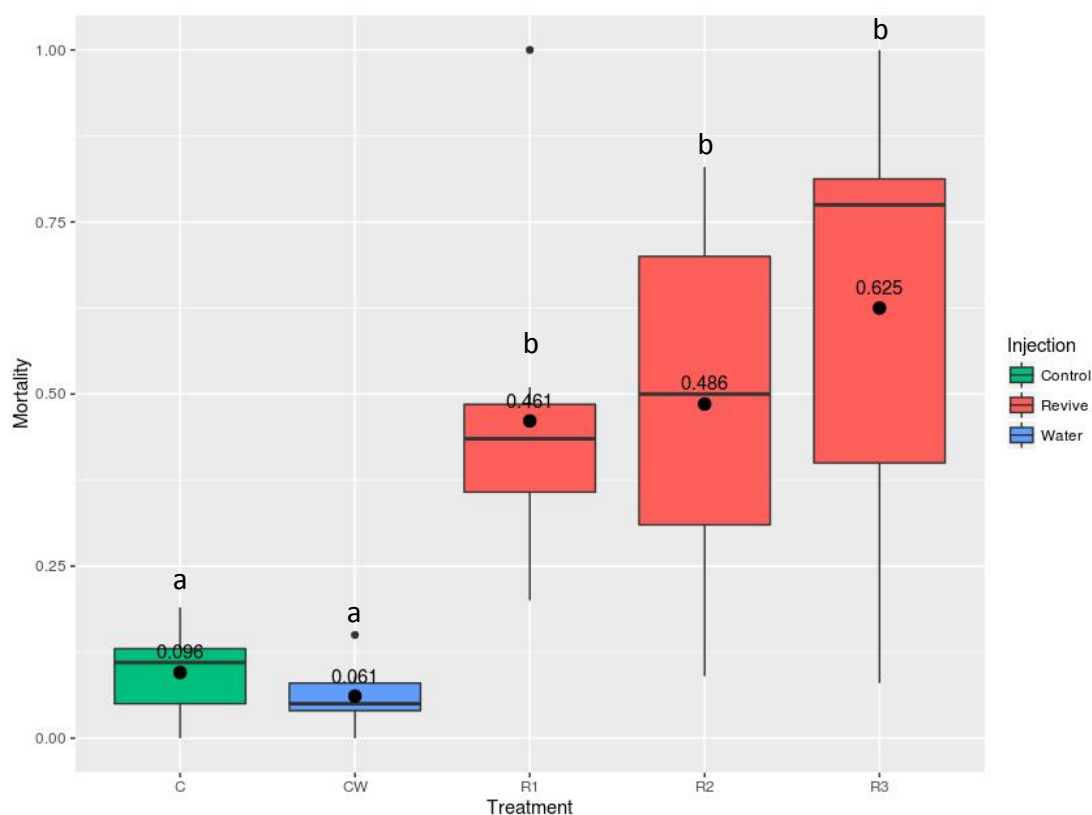
Traitement	C	CW	R1	R2	R3	Total
<i>N réplicats</i>	9	9	10	9	8	45
<i>N total de larves comptées</i>	282	293	333	316	271	1495
<i>Diamètre des arbres (cm)</i>	2.83 $\pm$ 0.39	2.83 $\pm$ 0.33	2.83 $\pm$ 0.22	3.06 $\pm$ 0.29	3.21 $\pm$ 0.42	2.95 $\pm$ 0.33
<i>Durée entre la ponte et le contrôle de la survie (j)</i>	9.56 $\pm$ 0.88	9.44 $\pm$ 0.53	9.40 $\pm$ 0.52	9.44 $\pm$ 0.73	9.75 $\pm$ 0.89	9.51 $\pm$ 0.71

EFFET DU REVIVE® SUR LA MORTALITE DES JEUNES LARVES

Une analyse de déviance sur nos données indique un effet significatif du traitement sur la mortalité des jeunes chenilles 9 à 11 jours après la ponte (GLM pour données binomiales, Likelihood Ratio test, $\chi^2 = 189.84$, ddl = 4, $p < 0.001$), à l'inverse du diamètre à 30 cm ($\chi^2 = 0.01$, ddl = 1, $p = 0.93$) et de l'interaction entre les deux variables ($\chi^2 = 9.14$, ddl = 4, $p = 0.06$). Les comparaisons deux à deux par test *post-hoc* de Tukey confirment des différences significatives au seuil $\alpha = 0.05$ entre les situations contrôle (C et CW) et les traitements avec Revive® (R1, R2, R3), mais pas de différences au sein de ces deux groupes (Figure 1). On constate une augmentation de la variance dans les traitements correspondant aux plus forts volumes de Revive®.

Figure 1 : Taux de mortalité (mesuré 9 à 11 jours après ponte) de chenilles de *C. perspectalis* sur des rameaux de buis issus d'arbres sans injection (C), avec injection d'1.5 mL d'eau (CW), 0.75 mL de Revive® (R1), 1.5 mL de Revive® (R2) ou 3.0 mL de Revive® (R3) ; les lettres différentes indiquent des différences significatives à $\alpha = 0.05$ après test *post-hoc* de Tukey.

Mortality rate (measured 9 to 11 days after egg laying) of larvae of *C. perspectalis* on branches sampled from box trees without injection (C), with injection of 1.5 mL of water (CW), 0.75 mL of Revive® (R1), 1.5 mL of Revive® (R2) or 3.0 mL of Revive® (R3); different letters indicate significant differences at $\alpha = 0.05$ after Tukey *post-hoc* procedure.

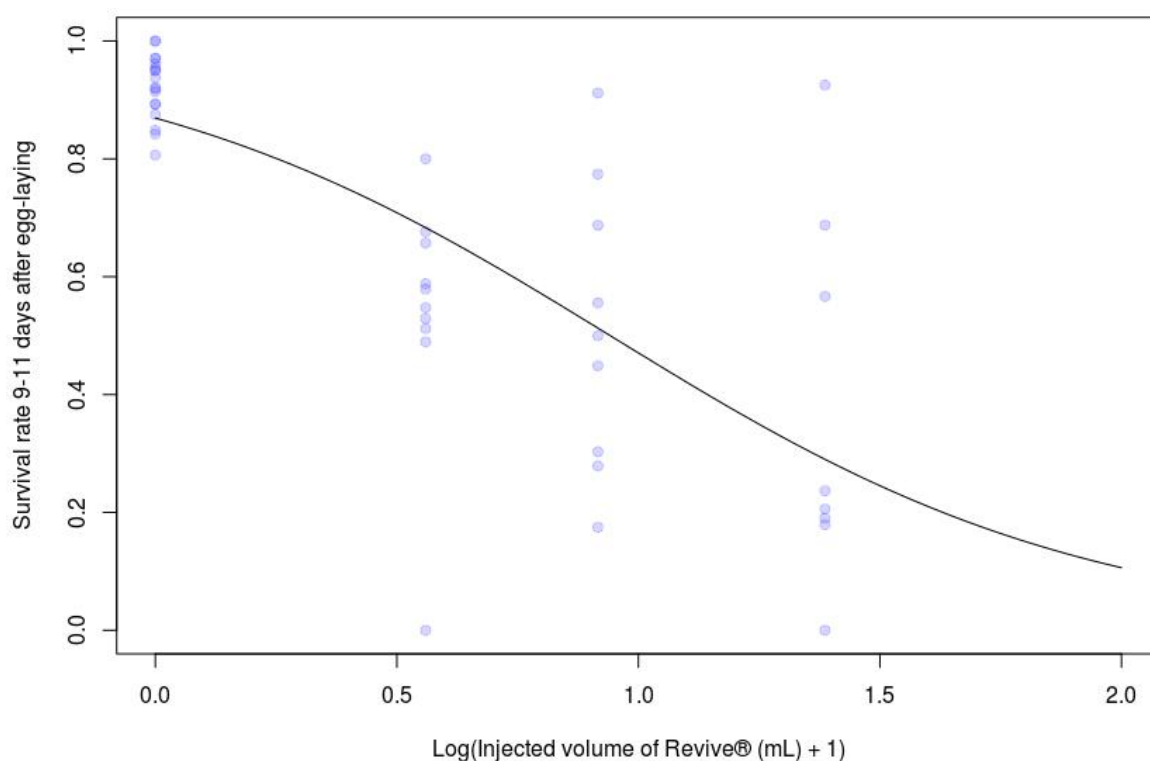


D'éventuels effets des conditions contrôle C (pas d'injection sur l'arbre) et CW (injection d'1.5 mL d'eau) ne sont attendus que sur la survie des arbres et non sur celle des larves s'alimentant sur leurs feuilles, ce qui est corroboré par l'absence de différences significatives de mortalité des chenilles entre les deux types de contrôle. Pour cette raison, les cinq conditions de la variable factorielle « Traitement » peuvent être transposées en une variable quantitative correspondant au volume de Revive® injecté dans les arbres : 0, 0.75, 1.5 et 3 mL. Cette variable quantitative peut être utilisée dans un modèle de régression logistique visant à prédire, dans les conditions de l'expérimentation réalisée ici, la mortalité des chenilles de pyrale du buis en fonction de la dose de Revive® injectée dans les arbres dont les feuilles ont été consommées. L'ajustement du modèle de régression logistique le plus parcimonieux a confirmé les résultats précédents avec aucun effet significatif du diamètre de l'arbre ou de son interaction avec le volume de Revive® injecté. La Figure 2 illustre le modèle retenu, qui correspond au taux de survie en fonction du volume de Revive® injecté dans les arbres (après transformation log).

Figure 2 : Modèle de régression logistique du taux de survie (mesuré 9 à 11 jours après ponte, à 22°C) de chenilles de *C. perspectalis* sur des rameaux de buis en fonction du volume de Revive® injecté dans l'arbre ; les points correspondent aux observations tandis que la régression illustre la prédiction du modèle.

Logistic regression model of the survival rate (measured 9 to 11 days after egg laying, at 22°C) of larvae of *C. perspectalis* on box tree branches depending on the volume of Revive® in the

tree; points correspond to observations while the regression illustrates the prediction of the model.



Sur la base de ce modèle de régression logistique et dans les conditions de l'expérimentation (diamètre des arbres, conditions de température, durée d'exposition des chenilles), les doses de Revive® conduisant à une mortalité de 50 % et de 90 % sont estimées respectivement à $LD50 = 1.56 \pm 0.093$ mL et $LD90 = 6.64 \pm 0.28$ mL.

TRAITEMENT PAR REVIVE® DE BUIS A GROS DIAMETRE

L'observation des dégâts de pyrale du buis ayant eu lieu durant l'été 2016 sur les buis ayant un diamètre d'environ 10cm traité au Revive® montre que cinq des arbres ont été défoliés au maximum à 75% (Tableau III). Uniquement les arbres non traités au Revive® présentent des défoliations supérieures à 90% (Figure3).

Tableau III : Classes de dégâts de pyrale du buis estimées en septembre sur les arbres de gros diamètres.

Damage rate of the box tree moth estimated in september on high diameter trees.

Traitement	Classes de dégâts					Total
	10%<D<25%	25%<D<50%	50%<D<75%	75%<D<90%	90%<D<100%	
C	0	0	0	0	2	2
R4	0	1	1	0	0	2
R5	0	0	1	1	0	2
R6	1	1	0	0	0	2



Figure 3 : Photographie de buis de diamètres d'environ 10cm traité (à droite, cercle bleu) et non traité (à gauche, cercle rouge) sur un site naturellement infesté par la pyrale du buis.

Picture of 10cm diameter box trees treated (left, blue circle) and not treated (right, red circle) on a place naturally colonized by the box tree moth.

DISCUSSION

Notre étude préliminaire montre un effet significatif du Revive® sur la mortalité des jeunes larves de pyrale du buis pour les trois traitements, tandis que la mortalité est inférieure à 10% dans les deux conditions contrôle (Figure 1). En revanche, pour la courte durée d'exposition testée ici, nous n'observons pas de différences significatives de mortalité des chenilles entre les volumes injectés dans des arbres de taille similaire (Tableau II) malgré l'apparition d'une tendance forte (46.1%, 48.6% et 62.5% de mortalité) qui pourrait suggérer un effet dose. Nous ne pouvons pas exclure l'apparition de différences significatives entre les doses après un temps d'exposition plus long. L'observation de nombreuses chenilles peu actives n'ayant pas la même coloration que les chenilles sur arbres témoins, et que nous pourrions qualifier de moribondes, dans les traitements Revive® ont été comptabilisées comme vivantes et supporte cette hypothèse car il est probable que ces chenilles seraient mortes lors d'un comptage plus tardif comme ce qui a été observé par Cook et al (2013a) sur *Dyorictria abietivorella* (Grote) sur douglas. Lorsque l'on intègre au jeu de données les cinq réplicats comptabilisés à 10 jours après l'installation des œufs (non pris en compte ci-dessus afin d'éliminer le biais éventuel), on observe en effet une tendance à l'augmentation de la mortalité dans les conditions R2 et R3 (57.8% et 68.9% respectivement). Lors d'une prochaine expérimentation, le suivi de la mortalité au cours du temps et dans les différentes conditions permettra de tester à la fois l'effet dose et sa cinétique.

La forte variance de la mortalité observée pour chacun des trois traitements Revive®, avec une nette augmentation du volume R1 à R3, peut contribuer à l'absence de différences significatives. À ce stade, il est difficile de définir la cause de cette variance accrue mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées. D'une part, le temps d'exposition effectif des chenilles au produit n'est pas directement mesuré et pourrait varier entre réplicats. En effet, les œufs ont été installés deux à quatre jours après la ponte, ce qui, à temps de développement embryonnaire fixe dans nos conditions d'élevage à 22°C, peut influencer d'autant la durée d'exposition des chenilles. Par ailleurs, le temps embryonnaire constaté dans ces conditions est d'environ quatre jours mais la variance autour de cette durée n'a pas été mesurée à ce jour. Cependant, compte tenu de la randomisation des réplicats dans les conditions expérimentales, on s'attend à une distribution aléatoire du biais de durée d'exposition dans les

différentes modalités. D'autre part, la diffusion du produit dans l'arbre à partir de seulement un ou deux points d'injection est inconnue et pourrait être hétérogène. Il est donc difficile d'exclure l'hypothèse de branches plus ou moins concentrées en produit Revive au sein d'un même arbre et donc au sein des réplicats. En outre, nos tests d'alimentation ont en effet été réalisés peu de temps après l'injection et il est connu que le passage du produit dans les différents tissus cellulaires de l'arbre peut prendre du temps (Cook et al, 2013a), d'autant plus que le buis est un arbuste très ramifié. Bien que l'échantillonnage des branches ait été réalisé de manière à prendre en compte ce biais éventuel (rameaux constitués de branches prélevées à différentes hauteurs), la capacité des larves à sélectionner les feuilles et à se déplacer entre branches reste également à tester, d'autant que leur activité locomotrice est réputée importante. Afin d'explorer cette piste, nous avons collecté des échantillons de feuilles à différentes hauteurs et orientations en vue de doser le produit et d'évaluer sa répartition dans chaque arbre de l'expérimentation.

Les résultats de l'approche exploratoire menée sur un petit échantillon d'arbres de gros diamètre (entre 8.5 et 10.3 cm) sont congruents avec ceux de l'expérimentation sur les buis de petits diamètres puisque seuls les grands arbres non-traités ont été totalement défoliés (observation réalisée cinq mois après les injections ; Figure 3, Tableau III). Par ailleurs, à cette date, tous les arbres ont survécu aux injections, que ce soient les arbres de petit ou de gros diamètre malgré des conditions d'injection différentes (maximum deux trous d'injection dans le tronc pour les petits diamètres, contre quatre trous répartis sur le pourtour des troncs de gros diamètre). Cette observation devra être confirmée avec un suivi à plus long terme sur un échantillon de plus grande taille.

CONCLUSION

L'expérimentation réalisée sur les arbres de petit diamètre, comme les toutes premières observations sur des arbres de gros diamètre, montrent une efficacité du Revive® contre les chenilles de pyrale du buis, mais les perspectives opérationnelles ouvertes par ces résultats nécessitent au préalable de lever plusieurs inconnues. D'abord, il s'agira de poursuivre les expérimentations de mortalité (notamment suivi dans le temps à différentes doses et pour des arbres de différents diamètres) qui pourront servir de base pour définir la dose efficace en fonction de la proportion de chenilles tuées et de la vitesse d'action recherchées. Ensuite, il sera nécessaire de caractériser la vitesse et l'homogénéité de la diffusion du produit dans l'arbre en fonction de sa taille et du protocole d'injection. Enfin, il restera à évaluer la rémanence du produit dans l'arbre à une concentration assurant le niveau d'efficacité recherché. Elle conditionnera la fréquence des injections nécessaire à une efficacité optimale contre la pyrale du buis, qui pourrait également influencer la survie de l'arbre. De plus, cette donnée est indispensable à l'évaluation des effets non intentionnels sur la faune non cible. Le buis étant peu attaqué par des insectes natifs (Jones 2014), les effets non intentionnels sont essentiellement envisageables à travers la présence éventuelle de résidus dans le pollen et/ou dans le feuillage taillé ou tombé au sol.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié du soutien financier de la région Centre Val de Loire (projet INCA). Les auteurs tiennent à remercier chaleureusement Jean-Luc et Véronique Moreau, propriétaires du « Petit Bois », pour avoir mis à disposition les buis nécessaires à cette expérimentation et donné accès à leur terrain. Les auteurs sont également très reconnaissants à Michèle Quentin (Association des Parcs et Jardins de la Région Centre Val de Loire), membre du comité de pilotage du projet INCA, pour les avoir mis en relation avec M. & Mme Moreau. Nous remercions vivement la société Syngenta, et en particulier Paule Bourdrez, Peter Wyss, et Othmar Ruesch, pour leur contribution à ce travail, et en particulier pour la réalisation des injections de Revive. Les auteurs tiennent également à exprimer tous leurs remerciements à Charlotte Mathieu, Etienne Rozenberg et Alexis Bernard pour leur contribution à la réalisation des expérimentations, à Vincent Lejeune et Patrick Poursat (INRA GBFOR) pour leur soutien

logistique, et aux membres du comité de pilotage du projet INCA, Maxime Guérin (Plante & Cité), Jean-Marc Delacour (CDHRC), Michèle Quentin (APJRC), Cyril Kruczkowski (FREDON Centre), Marc Kenis (CABI Suisse) pour les échanges fructueux que nous avons pu avoir autour de cette question. Néanmoins, les auteurs rappellent que le contenu de cette publication n'engage que leur responsabilité et ne reflète pas nécessairement les opinions et la politique des personnes physiques ou morales ayant financièrement soutenu ou contribué à cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- Astredhor, Plante&Cité. (2015). Synthèse 2014, Programme SaveBuxus, Volet pyrale du buis. (Visite 24.06.2016) http://www.valhor.fr/fileadmin/A-Valhor/Valhor_PDF/Innovation_PC_SynthesePyrale_Savebuxus2015.pdf
- Bourdrez P., Delgado R., Wyss P. (2014). Micro-injection sur pin, palmier, chêne et marronnier. *Phytoma*, no 678, 2-6.
- Bras A., Courtin C., Kenis M., Bernard A., Roques A., Rousselet J., Auger-Rozenberg M.-A. (2016). L'invasion fulgurante de la pyrale du buis en France et en Europe : diversité génétique et approche phylogéographique. Actes de la 4ème Conférence AFPP sur l'entretien des Jardins, Espaces Végétalisés et Infrastructures, Toulouse, 19-20 octobre 2016.
- Brua C. (2013). La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante, caractéristique de sa dynamique d'expansion en France et en Europe, des dégâts occasionnés sur les buis (*Buxus spp*) et des stratégies de lutte. Actes de la Conférence sur l'Entretien des Espaces Verts, Jardins, Gazons, Forêts, Zones Aquatiques et Autre Zones non Agricoles, Toulouse, 15-17 octobre 2013.
- Cartier A., Cornillon M. (2016). Quatre produits de biocontrôle testés contre la pyrale du buis. *Phytoma*, 695, 14-17
- Cook S.P., Sloniker B.D., Rust M.L. (2013a). Efficacy of two bole-injected systemic insecticides for protecting Douglas-Fir from damage by Douglas-Fir tussock moth and fir coneworm. *Western Journal of Applied Forestry*, 28, 4, 166-69.
- Cook S.P., Sloniker B.D., Rust M.L. (2013b). Using Systemically Applied Insecticides for Management of Ponderosa Pine Cone Beetle and *Dioryctria* Coneworms in Seed Orchards. *Western Journal of Applied Forestry*, 28, 2, 69 70.
- Doccola J.J., Wild P.M. (2012). Chapter 4. Tree injection as an alternative method of insecticide application, in insecticides - basic and other applications, Rijeka (Croatie), InTech, 1e éd., 61-78 p.
- Enriquez T., Giorgi C., Venard M., Colombel E., Gaglio F., Buradino M., Martin J. C., Tabone E. (2015). Des souches de trichogrammes contre la pyrale du buis. *Phytoma*, 685, 21-24
- Fettig C.J., Munson A.S., Grosman D.M., Bush P.B. (2013). Evaluations of emamectin benzoate and propiconazole for protecting ondividual *Pinus contorta* from mortality attributed to colonization by *Dendroctonus ponderosae* and associated fungi: bole injection protects *Pinus contorta* from *Dendroctonus ponderosae*. *Pest Management Science*, 70, 5, 771-78.
- Fidgen J.G., Kittelson N.T., Eckberg T. Doccola J., Randall C. (2013). Emamectin benzoate reduces defoliation by *Choristoneura occidentalis* Freeman (Lepidoptera: Tortricidae) on three host species. *Western Journal of Applied Forestry*, 28, 4, 170 173.
- Guérin M., Tabone E, Martin J.-C., Lacordaire A.-I., Gutleben C., Robert F. (2016). Pyrale du buis : vers une stratégie de gestion durable. *Phytoma*, 697, 26-30.
- Jones M. (2014). Buis et autres topiaires: soins, taille et utilisations. Ulmer. Les Essentiels. Paris: E. Ulmer.
- Kenis M., Nacambo S., Leuthardt F., Domenico F.D., Haye T. (2013). The box tree moth *Cydalima perspectalis*, in Europe : horticultural pest or environmental disaster ? *Aliens*, 33, 38-41.
- Krüger E.O. (2008). *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) - new for the European fauna (Lepidoptera:Crambidae). *Entomologische Zeitschrift mit Insekten-Börse*, 118, 2, 81-83.

- Martin J.-C., Brinquin A.-S., Morel E., Tabone É., Guérin M. (2015). Vers un outil de biocontrôle innovant et performant contre la pyrale du buis : un nouveau modèle de piège et un diffuseur de phéromone en développement ont été testés. *Phytoma*, 680, 41-44.
- Martin J.C., Brinquin A.-S., Bailly C., Corréard M., Buradino M., Thévenet J., Morel E. (2016). Nouvelles phéromones contre trois ravageurs en forêt et jardins. *Phytoma*, 692, 46-50.
- Nacambo, S., Leuthardt F.L.G., Wan H., Li H., Haye T., Baur B., Weiss R.M., Kenis M. (2014). Development characteristics of the box-tree moth *Cydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. *Journal of Applied Entomology*, 138, 1-2, 14-26.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Roques A., Auger-Rozenberg M.-A., Blackburn T.M. et al. (2016). Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biological Invasions*, 18, 4.
- Rose J., Kleespies R.G., Wang Y., Wennmann J.T., Jehle J.A. (2013). On the susceptibility of the box tree moth *Cydalima perspectalis* to *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AnfaNPV). *Journal of Invertebrate Pathology*, 113, 3, 191-97.
- Van der Straten M.J., Muus T. (2010). The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*, 21, 107-11.
- Venard M., Enriquez T., Colombel E.-A., Tabone E. (2016). Etude de la génération fille des parasitoïdes (F1) dans la mise en place d'un programme de lutte biologique contre la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera : Crambidae). *Actes de la 4^{ème} Conférence AFPP sur l'entretien des Jardins, Espaces Végétalisés et Infrastructures*, Toulouse, 19-20 octobre 2016.

Audrey BRAS

Identification des facteurs sous-tendant l'invasion fulgurante d'un insecte asiatique en Europe, la pyrale du buis : approche génétique et biologique

Résumé

Depuis les années 1990, on observe une accélération de la vitesse de propagation après établissement d'une grande partie des insectes introduits accidentellement en Europe. L'invasion fulgurante de la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis*, est un exemple de ce phénomène. Observée pour la première fois en 2007 en Allemagne, elle s'est ensuite propagée jusqu'au Caucase en une décennie. Il a été rapidement supposé que le commerce de buis d'ornement entre les pays européens et la Chine aurait permis son introduction tandis que l'intensification des échanges commerciaux entre pays européens aurait facilité sa propagation à travers le continent. Cependant, certains traits biologiques de l'insecte ont également pu favoriser son invasion. Pour mieux comprendre les facteurs impliqués dans son invasion fulgurante, une approche pluridisciplinaire a été utilisée au cours de cette thèse. Tout d'abord, les routes d'invasion ont été appréhendées avec deux types de marqueurs génétiques. Puis, deux traits biologiques ayant pu favoriser son établissement et son expansion ont été étudiés : ses capacités de vol et la diapause. Les résultats génétiques ont permis de cibler la partie côtière de la Chine comme zone source probable, et suggèrent au moins deux introductions indépendantes depuis la Chine suivi par un phénomène tête de pont probablement lié au commerce d'ornement. Les capacités de vol estimées sont élevées et expliqueraient la dispersion de l'insecte à l'échelle locale. De plus, la sortie de diapause influencée par la température a pu permettre l'adaptation du nombre de générations en fonction du climat annuel. Ces deux traits biologiques ont par conséquent dû favoriser son invasion à l'échelle locale mais il apparaît que les activités humaines, en particulier le commerce des plantes ornementales, ont joué un rôle majeur dans son invasion fulgurante à large échelle en Europe et au Caucase.

Mots clés : *Cydalima perspectalis*, *Buxus*, invasion, commerce de plantes d'ornement, introductions multiples, phénomène tête de pont, capacités de vol, diapause

Identification of factors involved in the fast invasion of an Asiatic insect in Europe, the box tree moth: genetic and biological approach

Abstract

Since 1990, recently established non-native insect species appear to be spreading across Europe significantly faster than before. The box tree moth, *Cydalima perspectalis*, is a representative of such a rapid spread. First observed in 2007, it spread across Europe to Asia Minor in a decade, damaging on *Buxus* plants in urban areas as well as in forests. The trade of ornamental box plants between Europe and China has been hypothesized as the invasion pathway of the insect while the trade between European countries could explain its fast expansion. The biological traits of the moth may also have favored its spread. To understand the factors involved in both its invasion and fast expansion, we used a multidisciplinary approach. First, the invasion routes were tentatively assessed using two genetic markers. Then, two biological traits, flight capacities and diapause, were studied because they may have promote its spread. The genetic analyses clearly suggest an origin from Eastern China origin but also complex invasion pathways. Two independent introduction events probably happened directly from China followed by bridgehead effects due to ornamental plant trade. The moth flight capacities are important but can only explain dispersal at local scale. Moreover, diapause termination was influenced by temperature, which may lead to an adapted number of generation depending on local climate. These biological traits may have favored local invasions. However, our study suggests that human-mediated dispersal played a key role in the fast expansion of *C. perspectalis* across Europe and Asia Minor.

Keywords: *Cydalima perspectalis*, *Buxus*, invasion, ornamental plant trade, multiple introductions, bridgehead effect, flight capacities, diapause