

Montpellier SupAgro

Thèse présentée à Montpellier SupAgro pour obtenir le diplôme de doctorat

Formation doctorale : Biologie de l'évolution et écologie

**Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences,
Environnement, SIBAGHE**

**Différenciation génétique et écologique des populations du
puceron *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera : Aphididae) :
mise en évidence de deux espèces sœurs aux cycles de vie
contrastés**

Présentée et soutenue publiquement par

Joséphine Piffaretti

le 30 novembre 2012

Devant le jury composé de :

Patrick Berrebi, Directeur de recherches, CNRS Montpellier (Examineur)

Tatiana Giraud, Directrice de recherches, CNRS Orsay (Examinatrice)

Emmanuelle Jouselin, Chargée de recherche, INRA Montpellier (Co-directrice de thèse)

Jean-Christophe Simon, Directeur de recherches, INRA Rennes (Rapporteur)

Flavie Vanlerberghe-Masutti, Directrice de recherches, INRA Montpellier (Directrice de thèse)

Christoph Vorburger, Professeur, ETH Zürich & EAWAG (Rapporteur)

Montpellier SupAgro

Thèse présentée à Montpellier SupAgro pour obtenir le diplôme de doctorat

Formation doctorale : Biologie de l'évolution et écologie

**Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences,
Environnement, SIBAGHE**

Différenciation génétique et écologique des populations du puceron *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera : Aphididae) : mise en évidence de deux espèces sœurs aux cycles de vie contrastés

Présentée et soutenue publiquement par

Joséphine Piffaretti

le 30 novembre 2012

Devant le jury composé de :

Patrick Berrebi, Directeur de recherches, CNRS Montpellier (Examinateur))

Tatiana Giraud, Directrice de recherches, CNRS Orsay (Examinatrice)

Emmanuelle Jouselin, Chargée de recherche, INRA Montpellier (Co-directrice de thèse)

Jean-Christophe Simon, Directeur de recherches, INRA Rennes (Rapporteur)

Flavie Vanlerberghe-Masutti, Directrice de recherches, INRA Montpellier (Directrice de thèse)

Christoph Vorburger, Professeur, ETH Zürich & EAWAG (Rapporteur)

Cette thèse a été effectuée au Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP), Montpellier, France. Elle a été financée par l'INRA département SPE et La Région Languedoc-Roussillon.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement Manue pour son encadrement, sa disponibilité et son soutien. J'ai passé trois années vraiment enthousiasmantes d'un point de vue scientifique et humain en grande partie grâce à toi. Cette thèse restera une expérience épanouissante et positive pour moi (sauf les derniers mois ;)). Merci aussi à Flavie, qui a toujours trouvé une petite place pour moi au milieu de toutes tes obligations de directrice. Toutes nos réunions ont toujours été très productives. Un grand merci à Armelle, pour son expertise « des poils de cul » des pucerons et pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des pucerons. Merci à toute l'équipe puceron de m'avoir permis de partir sur le terrain, faire des missions de rêve : Kazakhstan, Colorado, Californie, Oregon, Washington, Corée du Sud... Tous ces voyages resteront gravés en moi, et je ne sais pas si j'y aurais mis les pieds sans vous. Merci aussi à la babouchka de Zabaghly pour ses bons petits plats. Merci à Serge pour ses conseils, son sens pratique et son aide pour les élevages. Merci à Gwen pour tes conseils en biomol, et toutes les séquences que tu as produites! Enfin pour en finir avec l'équipe puceron, merci à Anne-Laure qui a été plus qu'une technicienne biomol et un soutien sur le terrain... contente de t'avoir rencontrée poulette! Je me souviendrais de toutes ces soirées, des parties de shopping dans les Outlet Stores, de ces heures d'errance dans des coins paumés des Etats-Unis à la recherche du bon puceron, de tous ces Motels 6, des mojitos, des sushis, des mille-feuilles...

Merci à toutes mes stagiaires pour leur aide en biomol et sur le terrain, Justine, Emilie, et en particulier Elsa pour son enthousiasme et sa ténacité face aux transferts exponentiels des petits monstres.

Merci à toutes les personnes qui ont cherché de l'helichrysi pour moi, qu'ils en aient trouvé ou pas !

Merci aux membres de mon comité de thèse pour leur intérêt et pour m'avoir cadrée.

Merci aux « filles du CBGP », ALC, Pascaline, Marie, Laure, Caro, pour toutes les soirées et sorties qu'on a partagé, les pauses tisanes, leur soutien dans les derniers mois. Vous êtes devenues plus que des collègues. Spéciale dédicace aussi à la belge et la tchèque avec qui j'espère qu'on gardera le contact.

Merci aussi à tous les autres du CBGP, qui ont partagé mon bureau, m'ont aidé, avec qui j'ai partagé un café ou un verre, fait des mots croisés force 4 (presque) jusqu'au bout, avec qui j'ai tiré ou pointé à Montferrier, etc. : Fabien, Gael, Max, Anne, Jeff, Bruno, Jean-Pierre, Günther, Laurent, Alex, Réjane, Manu, Olivier, Ashraf, Audrey, Julie... je suis sûre que j'oublie la moitié des gens mais sachez que vous avez tous contribué à la bonne ambiance générale de ma thèse.

Merci à Candice, Clémence, Noémie et Salima pour ces bouffées d'oxygène, lors des retours à Paris et lors des JNCCS.

Une pensée pour tous les EBE...

Enfin merci à ma famille qui m'a suivi de loin, comme vous le pouviez, merci pour leur soutien et leurs encouragements. Merci à Grand-maman pour m'avoir appris le nom de fleurs quand j'étais petite, les quelques souvenirs qu'il me reste m'ont bien aidé sur le terrain. Pour finir, merci à Maxime de t'être lancé, d'avoir été là et de m'avoir changé les idées quand il fallait.

Un grand merci à tout le monde. Je suis obligée d'oublier des gens, excusez moi... en trois ans j'en ai croisé !

Liste des figures

- Figure 1. Schéma de l'anatomie générale d'un puceron.
- Figure 2. Schéma de l'anatomie d'un puceron.
- Figure 3. Planche sur les femelles vivipares.
- Figure 4. Cycle de vie hétéroécique de *B. helichrysi*.
- Figure 5. Diversité des cycles de vie chez les pucerons.
- Figure 6. Schéma présentant les transitions évolutives majeures donnant lieu au différents cycle de vie des pucerons.
- Figure 7. Planche photographique sur *B. helichrysi*
- Figure 8. Carte mondiale présentant l'échantillonnage de *B. helichrysi*
- Figure 9. Protocole expérimental d'induction des formes sexuées.
- Figure 10. Planche photographique d'un mâle ailé *B. helichrysi*
- Figure 11. Planche photographique d'une jeune gynopare ailée *B. helichrysi*
- Figure 12. Planche photographique d'une femelle ovipare aptère *B. helichrysi*
- Figure 13. Cercle des corrélations pour l'étude de la répartition climatique des lignées H2.
- Figure 14. Enveloppes climatiques des lignées *B. helichrysi* H2.
- . Figure 15. Proportions respectives des bactéries infectant chaque lignée génétique.
- Figure 16. Proportions d'individus infectés par *Hamiltonella* pour chaque lignée génétique
- Figure 17. Proportions d'individus infectés par *Hamiltonella* par pays. 0, absence ; 1, présence d'*Hamiltonella*.
- Figure 18. Proportions d'individus infectés par *Rickettsia* pour chaque lignée génétique
- Figure 19. Proportions d'individus infectés par *Rickettsia* par pays
- Figure 20. Deux scénarios alternatifs expliquant l'évolution des cycles de vie au sein du complexe *B. helichrysi* – *B. spiraeae*.

Liste des tableaux

- Tableau 1. Résultats de la recherche d'allèles privés chez H1 et H2.
- Tableau 2. Diversité des phénotypes liés aux associations pucerons-bactéries.
- Tableau 3. Résultats de la détection des bactéries endosymbiotiques secondaires chez *B. helichrysi*.

Sommaire

Introduction générale.....	13
Avant-propos.....	13
I. Les pucerons.....	14
A. Les pucerons dans le monde du vivant.....	14
B. Biologie générale et écologie.....	15
C. Evolution chez les pucerons.....	26
D. Pucerons et agronomie.....	34
II. Le modèle d'étude : <i>Brachycaudus helichrysi</i> (Kaltenbach, 1843).....	37
A. Systématique, morphologie et écologie de <i>B. helichrysi</i> , un puceron cosmopolite et polyphage.....	37
B. Un ravageur de cultures.....	38
C. Etat de l'art sur <i>B. helichrysi</i>	40
D. Objectifs de la thèse.....	42
Partie méthodologie générale, les particularités du modèle <i>B. helichrysi</i>	45
I. Un travail à plusieurs échelles... quelques définitions.....	45
II. Un puceron de petite taille.....	46
A. Echantillonnage et tri des pucerons.....	46
B. Manipulation <i>in vivo</i>	48
C. Biologie moléculaire de routine.....	48
Chapitre 1. Mise en évidence des deux espèces sœurs H1 et H2.....	51
Introduction du chapitre : Diversité génétique chez <i>B. helichrysi</i> , état de l'art.....	51
A. Les reconstructions phylogénétiques du genre <i>Brachycaudus</i> révèlent la divergence de deux clades au sein de l'espèce <i>B. helichrysi</i>	51
B. Etude sur <i>B. helichrysi</i> menées au CBGP.....	52
C. Présentation des parties.....	53
I. Article n°1 Publié dans <i>Zoologica Scripta</i> . Molecular markers reveals the existence of two sibling species within the aphid pest <i>Brachycaudus helichrysi</i> (Hemiptera : Aphididae)....	55
II. Article soumis à <i>Applied Entomology and Zoology</i> : Molecular identification and ecological characteristics of two cryptic species within a cosmopolitan aphid pest, <i>Brachycaudus helichrysi</i> (Hemiptera: Aphididae).....	75
III. Recherche d'allèles privés H1/H2.....	95
IV. Note sur la différenciation morphologique.....	96
Chapitre 2. « L'attaque des clones » : mise en évidence de différents modes de reproduction et cycle de vie chez H1 et H2.....	99
Introduction du chapitre.....	99
I. Article n°3 en préparation pour <i>Molecular Ecology</i> . Regular sex or covert sex discriminates two sibling species and 8 superclones within the leaf curl plum aphid (<i>Brachycaudus helichrysi</i>).....	101
II. Le test d'induction de formes sexuées en conditions contrôlées.....	125
A. Estimation de la fécondité, du temps de maturation et contrôle de la densité à 20 °C.....	125
B. Les clones génétiques étudiés.....	126
C. Détail du protocole expérimental.....	126

D. Résultats : Seul H1 peut produire des morphes sexués dans ces conditions.....	129
Chapitre 3. Ecologie des lignées.....	133
Introduction du chapitre	133
I. Etude des variables climatiques associées à l'occurrence des différentes lignées	134
A. La résistance au froid des œufs, un facteur clé dans la distribution climatique et le maintien de sexués.....	135
B. Distribution climatique des deux espèces sœurs H1 et H2 dans l'hémisphère nord.....	135
C. Distribution climatique des lignées asexuées et sexuées chez <i>B. helichrysi</i> H2.....	136
II. Etude de la gamme de plantes hôte associées aux différentes lignées.....	140
A. Résumé des associations des deux espèces sœurs avec leurs plantes hôtes.....	140
B. Résumé des associations des lignées sexuées et asexuées H2 avec leurs plantes hôtes	141
III. Etude de la communauté de bactéries secondaires de <i>B. helichrysi</i>	143
Introduction.....	143
A. Matériel et méthodes	145
B. Résultats.....	147
C. Conclusion, discussion.....	151
Conclusion générale du chapitre, discussion	153
Chapitre 4. Histoire évolutive des espèces, des lignées, et des modes de reproduction	157
Introduction du chapitre	157
A. Résumé des résultats précédents.....	157
B. Mécanismes d'évolution du mode de reproduction, perte de la sexualité.....	157
C. Les marqueurs génétiques pour étudier l'évolution des lignées.....	157
D. Présentation du chapitre	158
I. Article n°4 en préparation pour Molecular Phylogenetics and Evolution. Elucidating the phylogenetic relationships of sexual and asexual lineages in the aphid pest <i>Brachycaudus helichrysi</i>	159
Discussion générale, perspectives	185
I. Principaux résultats de la thèse	185
A. Différenciation génétique	185
B. Différenciation écologique : climat et plantes hôtes.....	186
C. Les cycles de vie au sein du complexe <i>B. helichrysi</i> - <i>B. spiraeae</i>	187
D. Relation phylogénétique entre les différentes lignées, hypothèses sur l'évolution des cycles de vie.....	188
E. Le statut de ravageur.....	190
II. La spéciation chez <i>B. helichrysi</i>	192
III. Perspectives.....	194
A. Approfondir les connaissances sur la divergence des lignées au sein du complexe <i>B. helichrysi</i>	195
B. Quels sont les mécanismes génétiques impliqués dans les changements de mode de reproduction ?.....	199
C. Scenarii de colonisation des deux sous-espèces.....	200
D. Mot final.....	202
Bibliographie générale	205

Annexe Introduction	219
Annexe Supplementary data article n°1	223
Annexe Supplementary data article n°2	229
Annexe Supplementary data article n°3	241
Annexe Chapitre 3	249
Annexe Supplementary data article n°4	255

Introduction générale

Avant-propos

L'étude de la biologie de l'espèce de puceron *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach, 1843), pour laquelle nous avons essayé de comprendre pourquoi deux espèces soeurs ont divergé, nous a amené dans le cadre de plusieurs sujets de biologie évolutive passionnants comme la spéciation chez les insectes phytophages, l'évolution et le maintien de la reproduction asexuée chez les pucerons. Ces deux sujets ont récemment fait l'objet de plusieurs thèses (Delmotte 2001; Halkett 2004; Frantz 2005; Peccoud 2008) dans lesquels les mécanismes évolutifs ont été décrits et étudiés de façon théorique et empirique. Ces travaux portaient sur des espèces emblématiques de pucerons *Rhopalosiphum padi* et *Acyrtosiphon pisum*. *Brachycaudus helichrysi* est une espèce beaucoup moins étudiée, mais des études précédentes suggèrent une grande labilité du cycle de vie au sein du genre *Brachycaudus*. De plus les reconstructions phylogénétiques suggèrent l'existence de deux clades génétiques bien différenciés au sein de cette espèce. C'est pourquoi, *B. helichrysi* nous est apparu être un bon candidat pour l'étude de l'évolution des cycles de vie, qui peut être un moteur de la spéciation chez les pucerons. Une grosse partie de ce travail de thèse a été de démêler les caractéristiques écologiques de ces deux clades, en combinaison avec des données génétiques. J'ai pris le parti ici de présenter une introduction plutôt « naturaliste » que théorique, afin d'apporter des éléments clés concernant la biologie et l'écologie des pucerons nécessaires à une meilleure compréhension des forces évolutives en jeu.

Cette introduction présentera donc dans un premier temps la biologie des pucerons en général : un aperçu de leur diversité, les fonctions biologiques de bases, les cycles de vie, les symbioses bactériennes, leur évolution et leur importance agronomique. Puis les caractéristiques biologiques de *B. helichrysi* telles que connues avant ce travail de thèse seront exposées.

I. Les pucerons

A. Les pucerons dans le monde du vivant

Les pucerons appartiennent à la super-famille des Aphidoidea (Hemiptera) qui comprend près de 4700 espèces réparties en dix familles (Remaudière et Remaudière 1997; Blackman et Eastop 2006). Le fossile de puceron le plus ancien suggère que les Aphidoidea se sont diversifiés en parallèle avec les premiers Angiospermes, il y a environ 140 Millions d'années (Ma), mais il est probable que cette super-famille soit encore plus ancienne et qu'elle vivait en association avec les premiers conifères il y a près de 200 Ma. La plupart des familles alors existantes se seraient éteintes lors de la crise d'extinction à la transition Crétacée/Tertiaire. La majorité de la diversité actuelle se retrouve dans la famille des Aphididae qui aurait explosé en diversité au Miocène (environ 5-26 Ma). (Heie 1987; Heie 1994).

Les Aphidoidea sont des insectes phytophages mesurant quelques millimètres jusqu'à un centimètre pour les plus gros (*e.g. Tuberculachnus salignus* Gmelin (Blackman et Eastop 1994)). Seule une petite proportion des espèces de plantes sont des hôtes pour les pucerons (Dixon et al. 1987). Les plantes hôtes peuvent être exploitées par une ou plusieurs espèces de pucerons, sur laquelle ils forment des colonies localisées sur différentes parties aériennes ou souterraines de la plante hôte (Blackman et Eastop 2006). L'association puceron-plante hôte ne se fait pas au hasard, les pucerons peuvent avoir une ou plusieurs espèces de plantes hôtes qui ne sont pas forcément exclusives. Certaines familles botaniques comprennent une surreprésentation d'associations plante-puceron, comme les Asteraceae (plus de 600 espèces de pucerons en association), les Apiaceae (~600), les Rosaceae (~300) et les Coniferae (~350) (Blackman et Eastop 2006), alors que d'autres grandes familles de plantes (*e.g.* Cactaceae, Euphorbiaceae, Orchidaceae, Lauraceae, Moraceae, Myrtaceae) sont associées à un nombre restreint d'espèces de pucerons (Dixon 1998). Les pucerons sont présents dans le monde entier, sous des conditions environnementales très variées, bien que plus abondants dans les zones tempérées que sous les tropiques.

Leur aspect est très varié : la taille, la forme et la couleur de leurs corps ainsi que des différents appendices varient d'une espèce à l'autre mais également au sein d'une même espèce en réponse à leur environnement biologique et abiotique. De plus, des morphes aptères, ailés, sexués ou vivipares sont produits au cours de leur cycle de vie (Figure 1). Ce polyphénisme rend la systématique des pucerons assez ardue, reposant sur des critères morphologiques parfois difficiles à appréhender. Malgré cette plasticité, les pucerons possèdent des caractères morphologiques propres, discriminant vis-à-vis des autres insectes, et leur anatomie est assez simple (Figure 2).

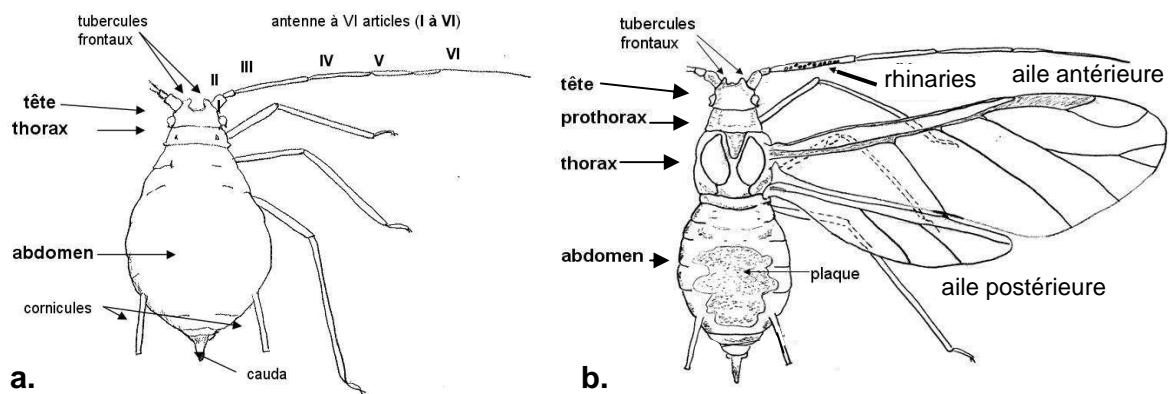


Figure 1. Schéma de l'anatomie générale d'un puceron. a. Femelle vivipare aptère. b. Femelle vivipare ailée. (modifié d'après Encyclop'Aphid © INRA 2012)

B. Biologie générale et écologie

Nutrition

Le régime alimentaire varie selon les espèces, de la monophagie (exclusivement associé à une espèce de plante hôtes), à la polyphagie (associé à une vaste gamme de plantes hôtes appartenant à différentes familles botaniques) en passant par l'oligophagie (associé à quelques espèces de plantes). Les espèces polyphages sont plus rares (moins de 1%) et sont généralement considérées comme des ravageurs des cultures (Blackman et Eastop 2000).

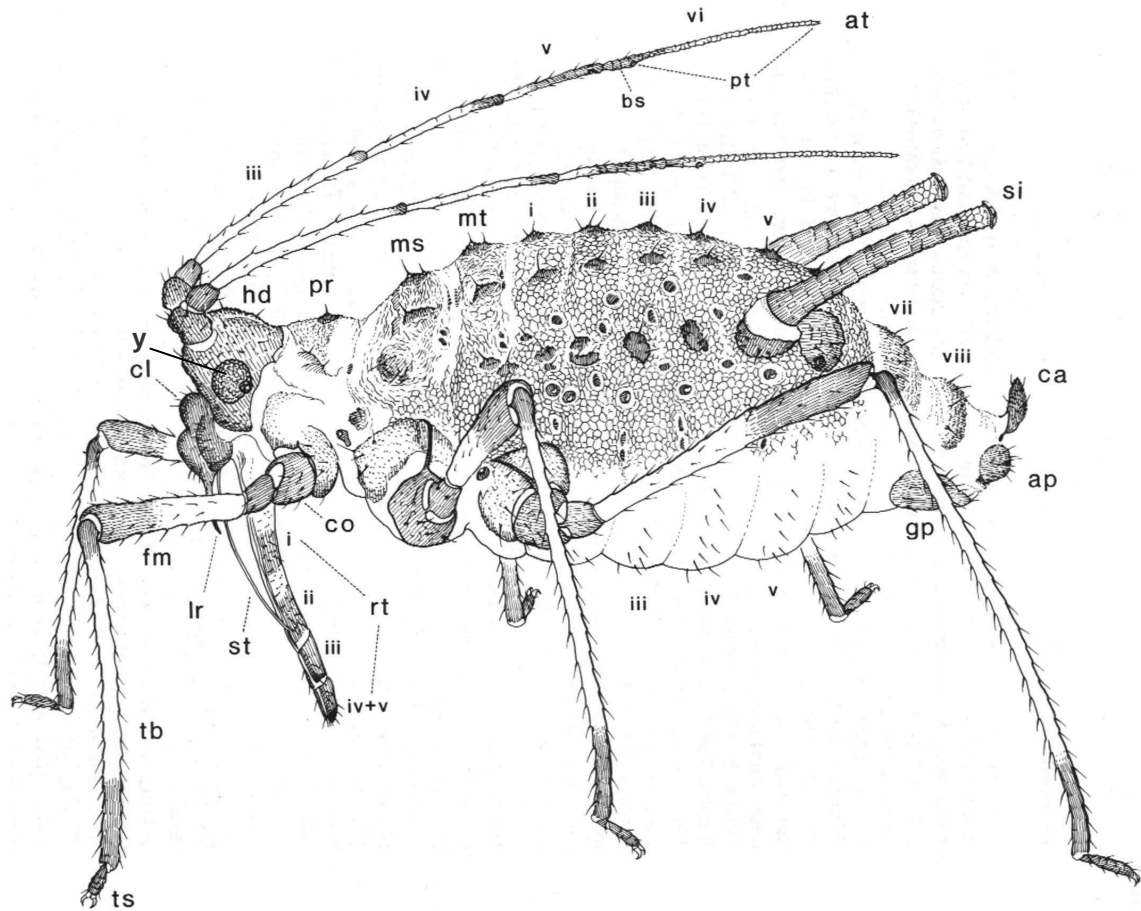


Figure 2. Schéma de l'anatomie d'un puceron. La tête (hd) contient le cerveau et porte les principaux organes sensoriels : une paire d'antennes (at) qui leur permet d'explorer leur environnement de manière tactile et olfactive, une paire d'yeux composés (y), et des pièces buccales de type piqueur-suceur, constituant le rostre (rt) qui porte les stylets (st), leur permet de « goûter » et de se nourrir du phloème de la plante hôte. Le thorax, divisé en 3 segments (ms, mésothorax ; mt, métathorax ; pr, prothorax), porte les organes de locomotion : 3 paires de pattes (coxa (co), fémur (fm), tibia (tb), tarse (ts)) et une paire d'ailes quand ces dernières sont présentes. L'abdomen, constitué de 10 segments, porte les organes de la reproduction et de l'excrétion : à la jonction des segments V et VI, émerge une paire de cornicules (si) sur la face dorsale qui permet d'excréter des défenses et des phéromones d'alerte ; la face dorsale de l'abdomen peut également porter des soies de différents types, des plaques pigmentaires et des opercules ; à l'extrémité de l'abdomen le segment X forme la queue ou cauda (ca), juste en dessous duquel se trouve la plaque anale (ap), l'anus d'où est excrété le miellat, et enfin la plaque génitale (gp). L'abdomen contient le système digestif et bien sur les organes reproducteurs internes. (autres abréviations : bs, base ; cl, clypeus ; lr, labre ; pt, processus terminalis. Les chiffres romains indiquent la segmentation). Modifié d'après (Miyazaki 1987).

Les pucerons sont totalement dépendants de leur plante hôte, car ils sont tous phloemophages. Grâce à leur rostre ils percent les couches supérieures de l'épiderme des

tissus végétaux puis déploient leurs deux paires de stylets fins et souples entre les cellules végétales pour atteindre la sève élaborée. Suite à l'installation des stylets la salive est injectée afin d'inhiber les mécanismes de défense de la plante, et l'ingestion de phloème peut avoir lieu (Auclair 1963; Powell, Tosh, et Hardie 2006). Chaque espèce est en général inféodée à une partie de la plante : aérienne (feuille et/ou tige) ou souterraine (collet ou racines). Les individus peuvent être libres ou former des galles : lors de la prise alimentaire, les stimulations mécaniques et chimiques provoquent un changement dans la différenciation des tissus végétaux formant de vraies galles fermées ou simplement l'enroulement de feuilles autour de la colonie de pucerons (pseudogalles). Seules quelques espèces forment de vraies galles, il existe alors une grande spécificité dans l'association plante-puceron (Forrest 1987).

La sève du phloème qui constitue l'unique source d'alimentation des pucerons est très riche en sucres mais pauvre en composés azotés comme les acides aminés. L'association obligatoire des pucerons avec une bactérie endosymbiotique, *Buchnera aphidicola*, pallie ce manque, celle-ci leur fournissant des vitamines, stérols et acides aminés (Douglas 1998). Les bactéries sont localisées dans l'abdomen de leur hôte, dans des groupes de cellules spécialisées : les bactériocytes.

Reproduction sexuée et asexuée

L'alternance de reproduction sexuée et asexuée, ou parthénogénèse cyclique, est une caractéristique des pucerons. La reproduction sexuée a lieu lors de l'accouplement d'un mâle et d'une femelle ovipare. La femelle fécondée pondra par la suite un œuf contenant un embryon portant une copie du matériel génétique de chacun des parents. A l'inverse, la parthénogénèse conduit à la production d'individus génétiquement identiques à la mère (Hales et al. 2002). Les pucerons possèdent tous la capacité de se reproduire par parthénogénèse qui est de type apomictique (Blackman 1978) (la division de maturation est équatoriale sans réduction chromosomique, puis le développement de l'embryon se fait uniquement par succession de mitoses). Les femelles vivipares portent en elles des embryons se développant donc en absence de fécondation, qui portent déjà en eux des embryons qui eux même engendreront une nouvelle génération de femelles vivipares (Figure 3). Trois générations télescopées se développent donc en parallèle à un temps et

dans un environnement donné. La reproduction asexuée est particulièrement efficace : une seule femelle vivipare peut produire une centaine de larves au cours de sa vie. La croissance des colonies en phase de reproduction asexuée est donc exponentielle.

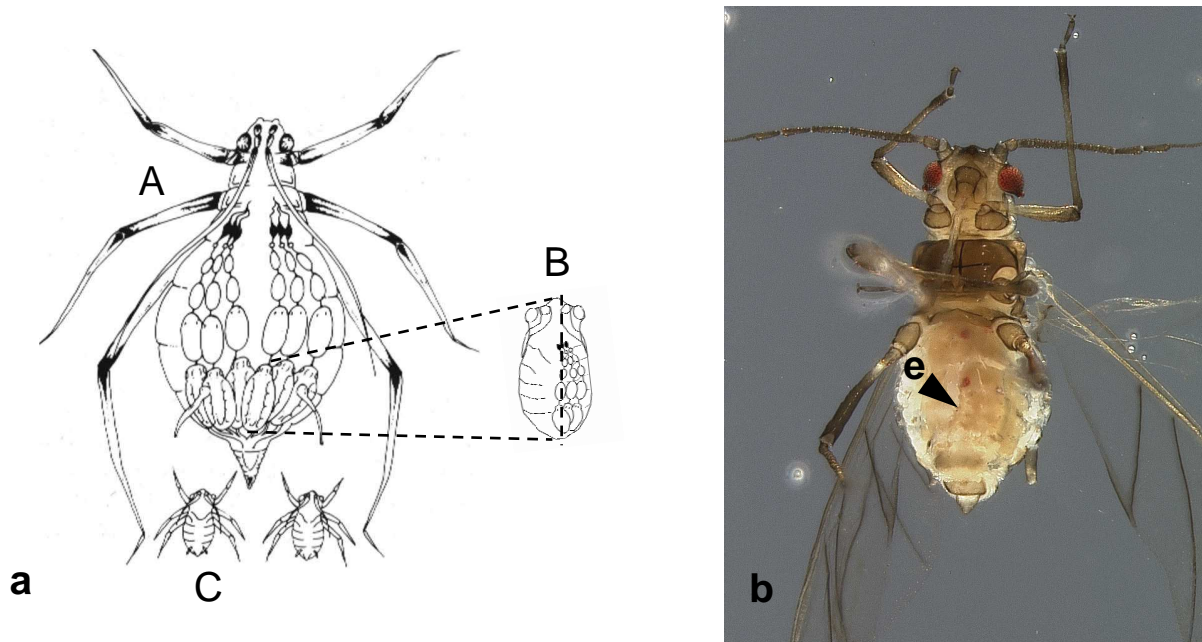


Figure 3. Planche sur les femelles vivipares. a, Schéma présentant une femelle vivipare aptère (A) et son système reproducteur : chaque ovariole contient un embryon à différent stade de développement. Chaque embryon en cours de développement (B) contient lui aussi des embryons en développement. Larves de premier stade (C). Modifié d'après (Dixon 1987). b, Photographie d'une femelle vivipare ailée *B. helichrysi*, en vue ventrale. En transparence, on distingue les embryons (e) dans l'abdomen de la mère. photographie © G. Fleck.

Complexité des cycles de vie

Alternance de phase sexuée et asexuée / Alternance de plantes hôtes

La parthénogénèse cyclique ou holoicyclie est le mode de reproduction classique chez les pucerons. La phase de reproduction sexuée a lieu à l'automne : après accouplement d'un mâle et d'une femelle, quelques œufs sont pondus sur la plante hôte. L'œuf rentre en dormance avec l'arrivée des températures négatives, ce qui lui permet de se soustraire aux effets délétères du gel et à la raréfaction des ressources alimentaires. Seule cette forme de résistance permet aux pucerons de passer la mauvaise saison dans les régions aux hivers

rudes. La levée de la dormance et l'éclosion ont lieu avec le retour du printemps, assurant de bonnes conditions alimentaires avec la montée de la sève, et une faible densité de prédateurs. Commence alors la phase de reproduction asexuée : une première génération est engendrée à partir de l'individu émergeant de l'œuf (appelé fondatrice), ces individus engendrent à leur tour quelques générations d'asexuées sur la même plante. Puis la dispersion a lieu vers d'autres plantes hôtes afin d'assurer un accès à des ressources alimentaires de qualité, et établissant ainsi de nouvelles colonies (Figure 4).

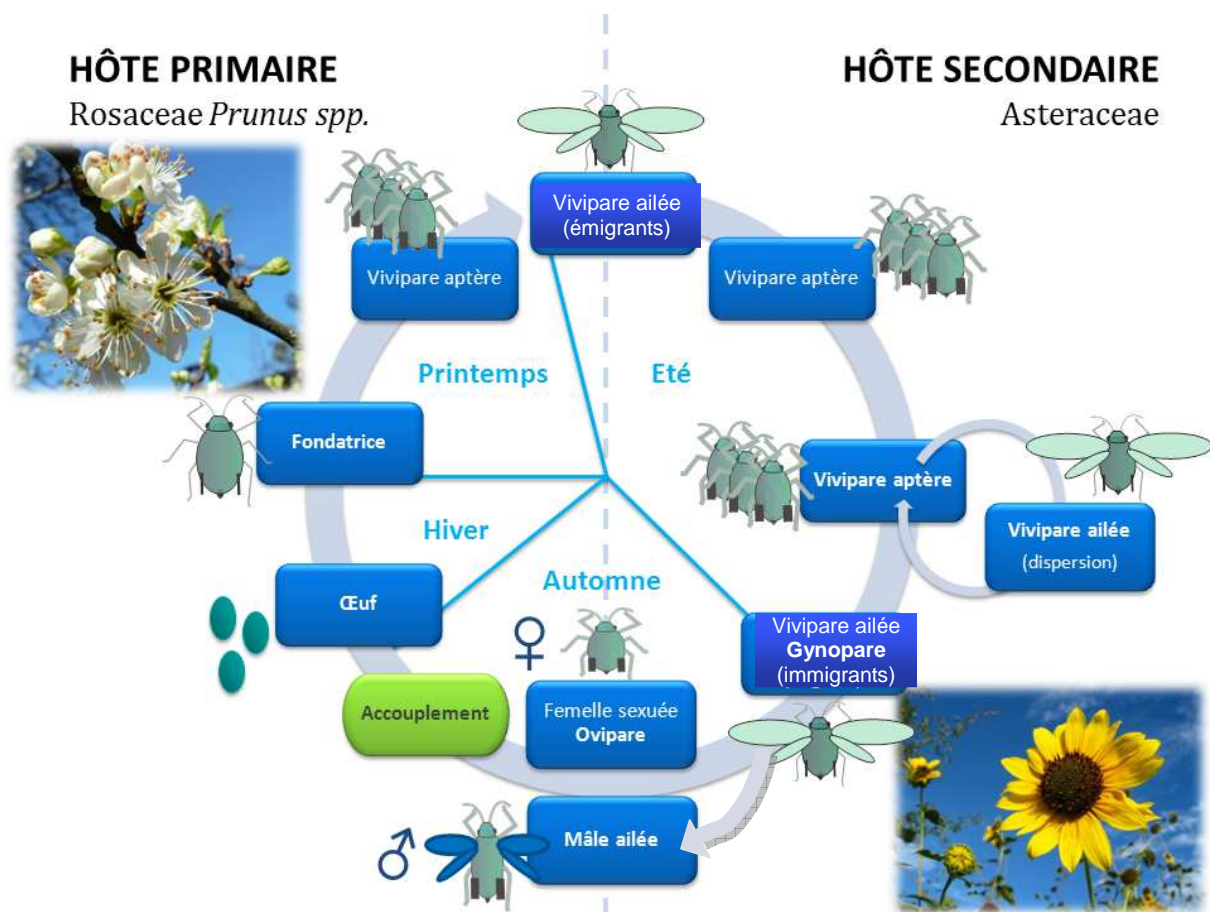


Figure 4. Cycle de vie hétéroécique de *B. helichrysi*.

Les plantes hôtes sur lesquelles ont lieu les différentes phases de reproduction (sexuée/asexuée) permettent de définir deux types de cycles de vie au sein de l'holocyclie : la monoécie vs l'hétéroécie (Figure 5). La monoécie, est le cycle de vie le plus répandu chez les pucerons, et correspond à un cycle se déroulant sur un même type de plante hôte (une ou plusieurs espèces d'herbacées, ou d'arbres, assez souvent apparentées). L'hétéroécie est représentée par seulement 10% des espèces de pucerons qui alternent entre deux gammes

de plantes hôtes de type différents et non apparentées : la phase de reproduction sexuée et les premières générations asexuées produites au printemps avant dispersion ont lieu sur un hôte dit primaire (généralement un arbre), puis les individus dispersent sur des hôtes dits secondaires (généralement des herbacées) où se déroule la majeure partie de la reproduction asexuée jusqu'à ce que les morphes sexués retournent sur l'hôte primaire. Quelques espèces de pucerons ont perdu la phase de reproduction sexuée dans leur cycle, on les appelle anholocycliques, les générations asexuées s'enchaînent tout au long de l'année sur le même type de plante hôte (Figure 5).

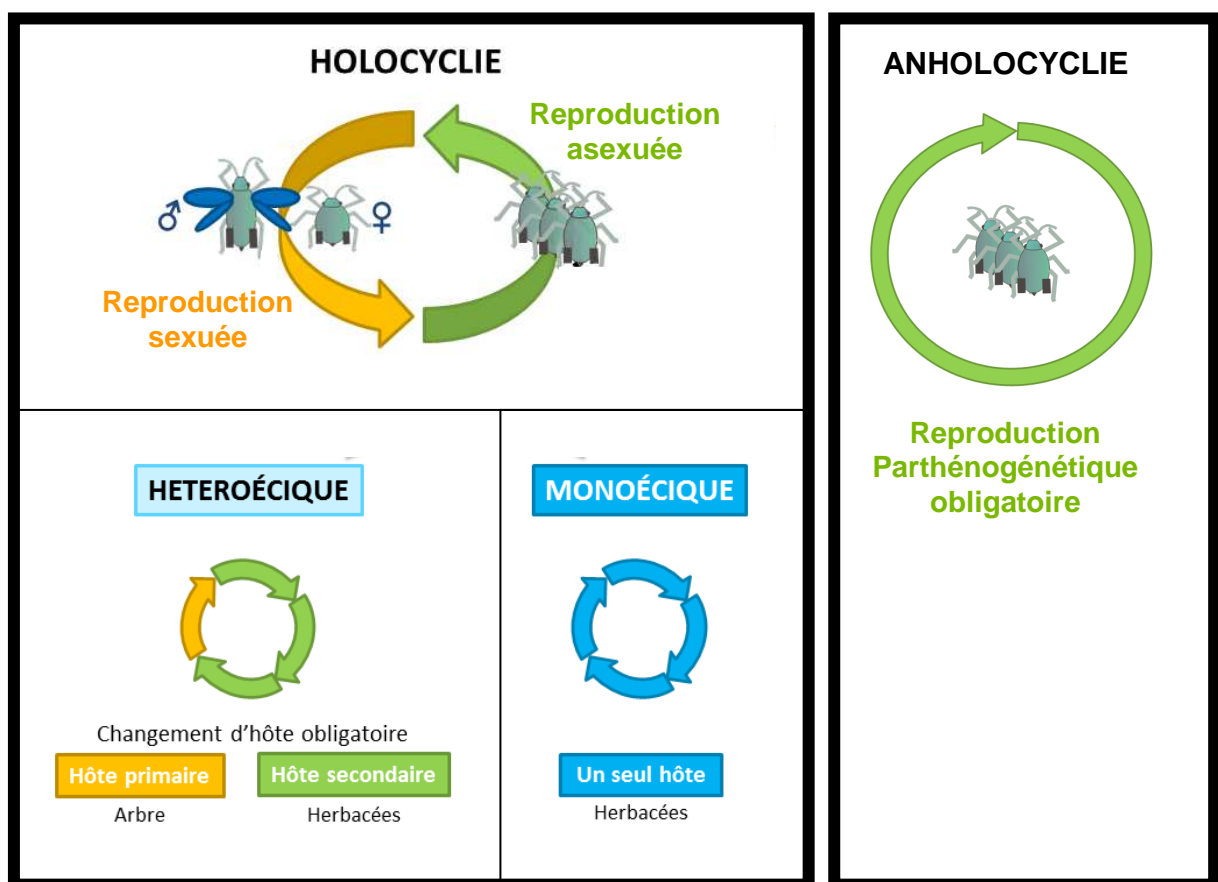


Figure 5. Diversité des cycles de vie chez les pucerons.

Plasticité phénotypique et cycle de vie

Chaque phase du cycle est caractérisée par la production de morphes assurant les fonctions de reproduction et de dispersion (pour ce paragraphe voir Moran (1992)).

Comme décrit précédemment, la phase de reproduction asexuée est assurée par des femelles vivipares, qui peuvent être aptères ou ailées. La dispersion entre différentes plantes

hôtes se fait par les femelles vivipares ailées, qui déposent des larves de femelles vivipares aptères sur la nouvelle plante. Les espèces hétéroéciques possèdent différentes catégories de vivipares ailées : les « émigrants » assurant la transition entre hôtes primaires et secondaires, les femelles de dispersion entre plante hôtes secondaires ou « alienicolae », et enfin les « immigrants » assurant le retour des hôtes secondaires vers l'hôte primaire (gynopares et sexupares). La production de femelles vivipares ailées est déclenchée par différents facteurs associés à de mauvaises conditions alimentaires : lorsque la colonie atteint une trop forte densité ou que la plante hôte elle-même ne convient plus (défenses chimiques, qualité de la sève médiocre, etc.). Les femelles vivipares aptères et ailées ont des caractéristiques morphologiques très différentes. Les ailés se distinguent des aptères par leur paire d'ailes, des appendices sensoriels plus développés, et ont souvent une coloration bien différente (des appendices et des plaques dorsales). Les espèces anholocycliques ne présentent que deux morphes : les femelles vivipares aptères et les femelles vivipares ailées de dispersion.

Chez les espèces holocycliques, la phase de reproduction sexuée nécessite la production de mâles et de femelles ovipares. Ils sont produits par parthénogénèse par des morphes spécialisés : les sexupares et les gynopares. Chez les espèces hétéroéciques (Figure 4), soit les sexupares, soit les sexués (produits sur hôte secondaires) sont ailés permettant la rencontre des mâles et des femelles ovipares sur l'hôte primaire. Les femelles ovipares sont le plus souvent aptères et possèdent des caractères morphologiques très particuliers liés aux fonctions d'oogenèse, d'accouplement et d'oviposition. Les mâles, quant à eux, ont des phénotypes très variés suivant les espèces, ils peuvent être aptères ou ailés, d'une taille comparable aux autres morphes ou bien nains. Les mâles sont hétérogamétiques XO, suite à une division spécifique de méiose au cours de laquelle seul le chromosome X subit une réduction chromosomique (les femelles vivipares ou ovipares sont XX).

Chez les espèces hétéroéciques appartenant à la sous-famille des Aphidinae, les femelles ovipares étant le plus souvent aptères, ce sont les gynopares qui sont ailées et doivent atteindre l'hôte primaire. La production des formes sexuées se fait dans un ordre précis afin de laisser le temps aux femelles d'atteindre le site d'accouplement. Tout d'abord, les gynopares ailées sont produites sur hôtes secondaires, et atteignent l'hôte primaire où elles produiront les femelles ovipares. Puis les mâles ailés sont produits, souvent sur hôte secondaire, et doivent à leur tour atteindre l'hôte primaire pour y trouver une femelle

ovipare à féconder. Dans le cas des espèces hétéroéciques des sous-familles d'Anoeciinae, Eriosomatinae et Hormaphidinae, ce sont les sexupares ailés qui sont produites sur l'hôte secondaire, et qui rejoignent l'hôte primaire pour y produire les femelles ovipares et des mâles aptères.

A l'éclosion de l'œuf, un morphe bien particulier émerge, appelé la fondatrice. Elle est généralement aptère et possède des caractéristiques qui lui assurent une grande fécondité et une résistance face aux conditions environnementales difficiles. C'est elle qui va établir la première colonie au printemps, elle joue donc un rôle crucial dans la survie des populations. Dans le cas des espèces à galles, la fondatrice a un comportement de sondage spécifique qui engendre la formation de la galle dans laquelle s'établira la colonie.

Il existe également, chez les quelques espèces de pucerons sociaux, des morphes spécialisés dans la reproduction, la défense des colonies, ou encore l'intrusion dans de nouvelles galles.

L'alternance d'hôtes : les mécanismes de localisation et de choix des plantes hôtes

Au cours des cycles de vie hétéroéciques, les pucerons alternent entre hôte primaire et secondaire appartenant à des familles botaniques non apparentées. La dispersion entre plante hôtes se fait par les formes ailées. Les pucerons ne sont pas de très bons « voiliers », ils n'ont la capacité de maîtriser la direction et la vitesse de leur vol que lorsque le vent est faible. Par conséquent leurs chances d'atteindre une plante adéquate sont dépendantes de la densité locale en hôtes. Les ailés possèdent des organes sensoriels olfactifs plus développés que les aptères. Il semblerait que les signaux chimiques jouent un rôle important dans la localisation et le choix de l'hôte primaire, leur permettant ainsi de contrecarrer leurs faibles capacités de vol.

De nombreuses études portant sur la sélection de leurs plantes hôtes par les pucerons ont permis de mettre en lumière les comportements et mécanismes mis en jeu. La plupart de ces études se sont concentrées sur le choix des hôtes secondaires par les émigrants (Powell et Hardie 2001; Powell, Tosh, et Hardie 2006). Tout d'abord, la mise en place du mouvement se fait suite à une première réaction phototactique en réponse aux longueurs d'ondes réfléchies par les plantes. Puis entrent en jeu les composés volatiles émis par les plantes qui peuvent être perçus comme attractifs ou répulsifs et conditionnent

l'atterrissage. Une fois posé, le puceron marche sur la plante et détecte les composés volatiles émis en surface grâce à des mouvements de va-et-vient de ses antennes. S'en suivent les premières pénétrations des stylets qui sont brèves et superficielles, lui permettant de goûter rapidement la sève. Puis, si la plante est acceptée, les stylets sont insérés plus profondément dans les tissus végétaux afin d'ingérer longuement le phloème.

Même si quelques espèces polyphages ont une large gamme d'hôtes secondaires, l'hôte primaire est généralement restreint à une ou quelques espèces. Le retour vers l'hôte primaire est un moment clé pour le maintien de la population l'année suivante, car il détermine la rencontre entre les mâles et femelles ovipares qui eux seuls peuvent produire des œufs qui résisteront à l'hiver. De plus, la ponte des œufs doit avoir lieu sur la plante hôte adaptée à la fondatrice qui en émergera : ce morphe est très peu mobile et fortement spécialisée vis-à-vis de son hôte (Moran 1992), et de sa survie dépend le maintien de la population. Les quelques études menées sur les signaux perçus par les immigrants sont dans l'ensemble peu concluantes (reviewées dans (Powell et Hardie 2001)) : les résultats sont très contrastés d'une étude à l'autre et seules quelques espèces ont été étudiées. Les gynopares semblent réagir aux composés volatiles chimiques émis par les plantes, tout comme les mâles. Ces derniers réagissent également à l'interaction de ces composés avec les phéromones sexuelles émis par les femelles déjà présentes sur l'hôte primaire, ce qui semble renforcer leur attraction. Puis, comme pour les émigrants, la plante est goûtée grâce aux stylets. Il semblerait que la composition chimique de la plante détermine le départ ou l'installation des ailés sur la plante, ainsi que la production de larves de femelles ovipares par les gynopares.

D'un point de vue évolutif, le choix d'un hôte primaire adéquat doit jouer un rôle prépondérant dans l'isolement reproducteur des espèces hétéroéciques, et donc dans les mécanismes de spéciation et d'évolution des pucerons.

La parthénogénèse cyclique : mécanismes de transition

La parthénogénèse cyclique est une caractéristique propre aux pucerons. L'holocyclie nécessite une transition permettant de passer de la production d'embryons vivipares à la production de formes sexuées. Les signaux impliqués dans l'induction de la production de

formes sexuées ont été très étudiés, mais les mécanismes physiologiques et métaboliques associés sont encore peu connus et mal compris.

Ce sont des signaux environnementaux liés à l'arrivée de l'automne qui sont à l'origine de la mise en place de cette transition : le facteur clé est la diminution de la durée de jour (Marcovitch 1924). La photopériode est perçue par des photorécepteurs (par la mère mais également par les embryons) et fonctionne avec un effet seuil en dessous duquel des changements métaboliques s'opèrent et induisent le développement d'embryons qui donneront de futures formes sexuées. Les pucerons sont sensibles précisément à la durée de la nuit, et un nombre seuil de périodes critiques de jour et de nuit consécutives est nécessaire pour induire le changement définitivement (Lees 1973). La température peut également modifier la réponse au changement photopériodique, les températures basses favorisant la production de formes sexuées (Lees 1959; Voegtlin et Halbert 1998; Vaz Nunes et Hardie 2000).

Le mécanisme de transduction du signal du cerveau aux ovaires reste encore inconnu. Il a été montré que des modifications cuticulaires avaient lieu en réponse aux jours courts (Cortes et al. 2008; Le Trionnaire et al. 2009; Gallot et al. 2010), augmentant probablement la neurotransmission. Des études récentes comparant les profils d'expression entre individu soumis à différentes photopériodes montrent que les hormones juvéniles et la mélatonine devrait jouer un rôle dans la transduction du signal (Simon, Stoeckel, et Tagu 2010).

Associations biologiques

Les pucerons font partie de réseaux trophiques complexes et vivent au contact de nombreux organismes en plus de leur plante hôte. Ils sont la proie de nombreux prédateurs comme les coccinelles (Coccinellidae), les larves de sirphes (Syrphidae), les Aphidoletes, les Chrysopidae, les araignées-crabes (Thomisidae). Ils sont aussi la cible de champignons entomopathogènes, principalement de l'ordre des Entomophthorales et des Hypocreales. En plus d'être de simples proies, les pucerons ont établi des relations complexes avec certains organismes au cours de l'évolution, comme l'association parasitique puceron-guêpe parasitoïde, le commensalisme puceron-fourmi, ou encore l'association symbiotique et mutualiste puceron-bactérie que nous allons détailler.

Bactéries

Les pucerons vivent tous en association avec une bactérie endosymbionte primaire : *Buchnera aphidicola*. Cette bactérie vit dans de grandes cellules modifiées appelées bactériocytes, localisées dans l'abdomen des pucerons. Leur densité est d'environ 10^7 bactéries/mg de puceron. La transmission de cette bactérie intracellulaire se fait uniquement de la mère aux embryons (par voie verticale) : la localisation des bactériocytes à proximité du tractus génital permet le passage contrôlé des bactéries vers les embryons en cours de développement (Wilkinson, Fukatsu, et Ishikawa 2003). L'association entre le puceron et la bactérie est obligatoire, la bactérie fournissant les composés alimentaires indispensables aux pucerons (Douglas 1998) et le puceron fournissant les bactériocytes.

Buchnera aphidicola a été acquise très tôt au cours de l'évolution des Aphidoidea, évoluant à partir d'une enterobactérie ancestrale il y a 160 à 280 Ma (Moran et al. 1993). On pense que cette association a joué un rôle majeur dans la radiation des pucerons, leur permettant d'exploiter une grande diversité de plantes, palliant le manque de composés azotés présents dans le phloème. *Buchnera aphidicola* s'est diversifiée en parallèle avec ses hôtes, le mode de transmission vertical conduisant à une co-évolution fine entre les deux partenaires (Munson et al. 1991; Clark et al. 2000; Jouselin, Desdevises, et Coeur d'acier 2009). Au cours de l'évolution, *B. aphidicola* a été perdue secondairement chez quelques espèces de pucerons de la famille Hormaphididae (Munson et al. 1991). Le génome de *B. aphidicola* serait de taille réduite par rapport au génome de son ancêtre pré-symbiotique, et probablement cette réduction drastique aurait eu lieu dès l'origine de l'association (van Ham et al. 2003; Gómez-Valero, Latorre, et Silva 2004, Moran et al. 2009). L'étude fine du génome de plusieurs souches révèle également une dégénérescence généralisée, sans doute liée à la perte d'une grande partie des fonctions de réparation et de réplication (van Ham et al. 2003). Il a également été montré une augmentation des gènes impliqués dans la production d'acides aminés : ces gènes ont été transloqués vers des plasmides permettant une surproduction des composés azotés (plasmide TrpEG (Rouhbakhsh et al. 1996), plasmide LeuABC (Baumann et al. 1999), (Gil et al. 2006)). Ces observations sont typiques des bactéries intracellulaires impliquées dans des symbioses.

En plus de l'endosymbionte primaire, les pucerons peuvent être associés à une ou plusieurs bactéries que l'on regroupe sous le nom d'endosymbiontes secondaires ou facultatifs. Les bactéries sont localisées sporadiquement dans différents tissus, présentes en petite quantité, et sont principalement transmises verticalement mais parfois aussi horizontalement (par les deux parents) avec une efficacité variable (Chen et Purcell 1997). Une même souche peut infecter des espèces de pucerons très éloignées mais toutes les associations ne sont pas viables. Le mécanisme de transmission interspécifique reste encore inconnu. Les endosymbiontes secondaires sont des représentants de diverses lignées bactériennes (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, et Mollicutes) reflétant des transitions multiples et indépendantes vers un mode de vie intracellulaire. Certaines de ces bactéries sont connues pour infecter largement les insectes (*Arsenophonus*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*), d'autres semblent être associées uniquement aux pucerons (*Regiella insecticola*, *Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica*). *Wolbachia* est une bactérie très courante chez les insectes mais rare chez les pucerons (seule l'association avec *Cinara cedri* est constante (Gómez-Valero et al. 2004)), on la trouve occasionnellement chez quelques espèces. Différents phénotypes sont exprimés suite aux associations bactériennes (synthétisés dans Oliver et al. (2010), pour le détail voir tableau 2 du Chapitre 3) : on a en a déduit que celles ci-peuvent avoir un effet défensif contre une large gamme d'ennemis naturels (*H. defensa* face aux parasitoïdes, *R. insecticola* face aux champignons), conférer une résistance accrue aux fortes températures (*S. symbiotica*), augmenter les performances des hôtes sur certaines plantes hôtes, modifier les capacités de dispersion et de reproduction. La modification du phénotype de l'hôte par les endosymbiontes, de façon plus ou moins héréditaire, a donc un rôle à jouer dans l'évolution des deux partenaires.

C. Evolution chez les pucerons

Toutes les caractéristiques biologiques complexes, détaillées jusqu'ici, font des pucerons des modèles de choix pour les études de biologie évolutive comme :

- Le rôle des associations interspécifiques dans la diversification : les pucerons sont associés de façon spécifique à leur plante hôte et présentent des régimes alimentaires variés (de la monophagie à la polyphagie) qui semblent avoir évolué plusieurs fois de façon

indépendante. On suspecte que cette association plante-puceron soit un moteur d'événements de radiation au sein des Aphidoidea.

- L'évolution des associations insecte-plante : les espèces hétéroéciques sont associées à des plantes hôtes non apparentées et possédant des caractéristiques contrastées : souvent une ou des plante(s) herbacée(s) et une plante ligneuse. Parmi les insectes phloemophages, seuls les pucerons sont capables de tels changements. Cette caractéristique implique un mécanisme adaptatif et une spécialisation pointue (physiologique, comportementale et morphologique), permettant aux pucerons de localiser et d'exploiter des hôtes très différents et de conserver cette alternance réglée à un tempo bien précis.

- L'évolution du mode de reproduction : la majorité des pucerons ont conservé la capacité de se reproduire de manière sexuée et asexuée, qui ont des conséquences évolutives bien différentes à court et à long terme. Cette caractéristique en fait donc de bons modèles pour étudier l'évolution et le maintien du sexe.

- Le déterminisme du polymorphisme (morphes sexués ou asexués, ailés ou aptères) et de la plasticité phénotypique (variation intraspécifique d'un même morphe liée à la plante hôte ou aux associations bactériennes secondaires par exemple).

- L'évolution et le maintien des associations biologiques : l'association puceron-*B. aphidicola* est souvent utilisée comme modèle pour étudier le maintien des associations symbiotiques, leurs conséquences évolutives et les phénomènes de co-spéciation.

L'étude de la différenciation génétique et écologique chez *B. helichrysi*, nous a amené à nous placer dans le cadre de l'évolution des cycles de vie chez les pucerons : l'évolution des associations avec les plantes hôtes et du mode de reproduction.

- Plante hôte et spéciation

Différents événements évolutifs peuvent être impliqués dans les mécanismes de spéciation : on distingue par exemple la spéciation géographique de la spéciation écologique. La spéciation géographique fait suite à un événement de vicariance qui isole deux populations de la même espèce (Mayr 1942). L'isolement reproducteur conduit à une accumulation différentielle de mutations entre ces deux populations créant alors des incompatibilités génétiques entre elles, et conduisant ultimement à la divergence de deux espèces. La spéciation écologique est un processus évolutif par lequel un changement dans l'exploitation des ressources ou de l'habitat engendre la formation de deux nouvelles

espèces exploitant des niches différentes (Rundle et Nosil 2005). La spéciation écologique ne peut avoir lieu que si l'ancêtre commun présentait un certain polymorphisme dans l'exploitation de niches. Inévitablement, des compromis évolutifs (*trade-offs*) dans l'efficacité de l'exploitation de la gamme complète de ressources apparaissent entre individus et conduisent à une sélection disruptive conduisant à la divergence de lignées.

La spéciation écologique peut avoir lieu aussi bien en allopatrie (entre deux populations séparées géographiquement) qu'en sympatrie (dans un environnement partagé). La spéciation sympatrique a été longuement débattue et de nombreuses théories ont vu dans la spéciation écologique un moteur qui la rendrait possible (Via 2001; Berlocher et Feder 2002; Drès et Mallet 2002; Bolnick et Fitzpatrick 2007). Finalement il semblerait que le plus souvent la spéciation écologique soit initiée en allopatrie, réduisant les probabilités d'hybridation lors de contacts secondaires. Quoiqu'il en soit, la spéciation écologique joue un rôle d'accélérateur dans la diversification de certains groupes que se soit en allopatrie ou sympatrie (Frantz 2005; Peccoud 2008; Nyman et al. 2010).

Chez les insectes phytophages, un des facteurs les plus évidents impliqué dans la spéciation écologique est la plante hôte (Nyman et al. 2010). Les associations plantes-insectes sont labiles et changent au cours des histoires évolutives des groupes d'insectes phytophages. Les colonisations occasionnelles de nouvelles plantes hôtes peuvent théoriquement engendrer de la spéciation écologique, ce qui pourrait expliquer l'importante diversité des insectes phytophages. Il est établi depuis longtemps que des changements d'association sont impliqués dans les processus de diversification des pucerons (Shaposhnikov 1987). L'exploitation de nouvelles plantes hôtes par des populations d'une même espèce conduit à la formation de races d'hôtes, un flux de gènes étant maintenu entre ces dernières à un taux faible mais estimable (plus de 1% par génération (Drès et Mallet 2002)), puis la rupture de flux de gènes par des mécanismes d'isolement reproducteur conduit à la spéciation. Deux modèles biologiques qui ont été largement étudiés chez les pucerons pour mettre en évidence ce phénomène de spéciation écologique lié à l'adaptation aux plantes hôtes sont : le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* qui rassemble une dizaine de populations sympatriques associées à des espèces de Fabaceae bien distinctes, représentant des races d'hôtes ainsi que quelques espèces potentielles (Hawthorne et Via 2001; Via et Hawthorne 2002; Peccoud et al. 2009) ; et *Aphis gossypii* qui rassemble au moins cinq races d'hôtes associées à des espèces de plantes appartenant à des

familles botaniques très différentes (Cucurbitaceae, Malvaceae et Solanaceae) (Carletto et al. 2009).

Evolution des cycles de vie

Scenarii d'évolution des cycles de vie au sein des Aphidoidea

Moran (1992) a établi un scénario parcimonieux de l'évolution des cycles de vie chez les pucerons basés sur la distribution de ce trait au sein des différentes familles. Le cycle de vie ancestral serait un cycle monoécique sur hôte ligneux, la capture d'hôtes herbacés concomitante à la radiation des angiospermes aurait conduit à l'évolution de cycles de vie hétéroéciques. La perte de l'hôte primaire ligneux aurait ensuite conduit à l'évolution vers un cycle de vie monoécique sur herbacées (Figure 6).

Une capture secondaire d'un hôte primaire et donc le retour vers un cycle hétéroécique complexe nécessitant l'adaptation à des plantes hôtes très différentes semble a priori peu parcimonieux d'un point de vue évolutif. Cependant, dans le genre *Brachycaudus*, les reconstructions phylogénétiques suggèrent qu'un retour vers l'hétéroécie à partir de la monoécie sur herbacées a évolué plusieurs fois indépendamment (Jousselin, Genson, et Coeur d'acier 2010). Une phylogénie récente du genre *Aphis* suggère également que des transitions multiples entre monoécie sur herbacées et hétéroécie ont eu lieu au cours de l'évolution (Kim, Lee, et Jang 2011). La perte de la sexualité à partir de ces trois types de cycles conduit à des cycles anholocycliques sur différents types d'hôtes (Figure 6).

Les contraintes évolutives sur les cycles de vie

Une telle complexité des cycles de vie pose la question des pressions de sélection et contraintes évolutives qui facilitent ou freinent des transitions vers tel ou tel cycle de vie.

Concernant l'évolution de l'hétéroécie, deux hypothèses ont été avancées pour expliquer son maintien et son évolution. 1/ Une première hypothèse « adaptative » a été proposée par Dixon (1987) qui avance les bénéfices qu'apporte un changement d'hôte en cours de saison : un tel changement permet l'utilisation de ressources alimentaires complémentaires, il permet d'éviter les prédateurs et parasitoïdes associés à une plante hôte, et enfin les hôtes ligneux (généralement hôtes primaires) offrent un meilleur site de

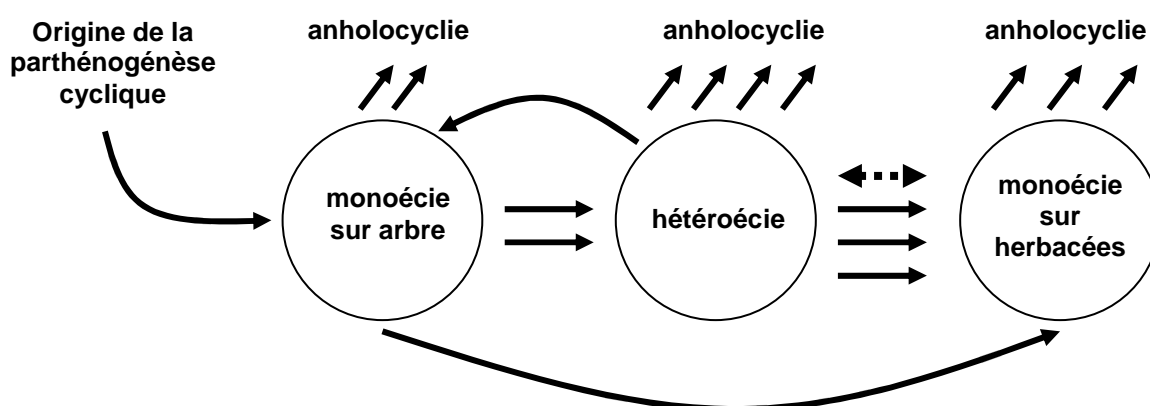


Figure 6. Schéma présentant les transitions évolutives majeures donnant lieu aux différents cycles de vie des pucerons. Le nombre de flèches indique la facilité des transitions. La double flèche en pointillés symbolise les transitions monoécie sur herbacées/hétéroécie. Modifié d'après (Moran 1992).

poncte pérenne pour les œufs hivernant. 2/ Une seconde hypothèse basée sur les contraintes évolutives de la fondatrice a été émise par Moran (1990; 1992). Les fondatrices présentent des caractères très spécialisés liés à l'adaptation à l'hôte primaire. Cette spécialisation extrême constituerait une impasse évolutive et de ce fait bien que les hôtes secondaires semblent plus favorables au développement des pucerons, les hôtes primaires seraient conservés au cours de l'évolution.

Evolution du mode de reproduction

Une modification du cycle de vie peut également faire intervenir un changement de mode de reproduction : il existe ainsi des transitions de l'holocyclie vers anholocyclie. La définition empirique du cycle de vie de diverses espèces et populations de pucerons a fait l'objet de nombreuses études combinant données écologiques et génétiques. Elles révèlent qu'il existe un continuum entre la parthénogénèse cyclique et la parthénogénèse obligatoire : certaines espèces de pucerons présentent des stratégies intermédiaires de parthénogénèse cyclique investissant différemment dans le sex-ratio, et encore des cycles à parthénogénèse obligatoire mais produisant des mâles fertiles à l'automne (Wilson, Sunnucks, et Hales 2003). Il existe finalement peu d'espèces purement anholocyclique, seulement 3% (Simon, Rispe, et Sunnucks 2002) : le plus souvent au sein d'une même espèce on retrouve des lignées anholocycliques et holocycliques.

Le maintien de la reproduction sexuée chez les pucerons est une question encore grandement débattue, et une vingtaine d'hypothèses ont été avancées dans des cadres théoriques variés. Alors que la reproduction asexuée semble avantageuse à court terme permettant de se soustraire au double coût du sexe (méiose et production des mâles) (Maynard-Smith 1978), à long terme ce mode de reproduction semble moins avantageux conduisant à des culs de sacs évolutifs. En effet, d'un point de vue génétique, seule la reproduction sexuée permet de créer de nouvelles combinaisons génétiques qui peuvent être sélectionnée positivement dans un environnement changeant. De plus, les événements de recombinaisons permettent d'éviter l'accumulation des mutations délétères. D'un point de vue écologique, la capacité à produire des œufs résistants au froid est possible uniquement lors de la reproduction sexuée, cet argument semble à lui seul expliquer son maintien chez les pucerons.

Trois principales voies de la perte de la sexualité ont été avancées (synthétisées dans Simon et al. (2003)), conduisant au contournement de la méiose lors de la production des gamètes femelles: 1/ une origine spontanée par mutation, qui serait facilitée dans un environnement où les pressions de sélection sur la production d'œufs résistants seraient relâchées, 2/ une perte par hybridation interspécifique entre deux lignées sexuées, ou intraspécifique entre des mâles issus d'une lignée asexuée et des femelles de lignée sexuée (= parthénogénèse contagieuse), 3/ une origine infectieuse liée à une modification phénotypique induite par un micro-organisme (*e.g. Wolbachia*).

Spéciation et évolution des cycles de vie

Quels que soient les mécanismes évolutifs sous-jacents, les cycles de vie semblent donc être un caractère assez labile au cours de l'évolution des pucerons, ces transitions vers de nouveaux cycles de vie peuvent donc aussi être un moteur de la spéciation. On comprend bien que la perte, l'acquisition ou simplement un changement d'hôte primaire, lieu de la reproduction sexuée, induit inévitablement un isolement reproducteur entre des populations d'une même espèce. Par exemple un scénario théorique dans lequel une population retourne sur hôte primaire tandis que l'autre reste sur hôtes secondaires lors de la reproduction sexuée, fait intervenir deux compartiments écologiques bien distincts pour la reproduction sexuée limitant les rencontres entre partenaires sexuels des deux

populations, créant ainsi une rupture de flux de gènes qui peut conduire à la spéciation (mécanisme similaire à la spéciation écologique décrit ci-dessus) d'une espèce hétéroécique et d'une espèce monoécique sur herbacées. De même qu'un changement dans l'alternance entre hôtes primaires et secondaires, la perte de la sexualité conduit à une rupture du flux de gènes entre populations holocycliques et anholocycliques. Si ces états deviennent irréversibles entre populations, la perte de la sexualité peut mener un événement de spéciation vers une espèce holocyclique et une espèce anholocyclique.

Cependant, comme on l'a vu, il existe des contraintes évolutives qui rendent les changements de cycle de vie liés à l'hôte primaire non équiprobables : il existe peu d'espèce de pucerons rassemblant des lignées hétéroéciques et monoéciques sur herbacées alors qu'on relate des espèces ayant des populations monoéciques sur arbre et des populations hétéroéciques (Moran 1990). De même, seules 3% des espèces de pucerons sont purement anholocycliques : les contraintes sur le maintien de la reproduction sexuée chez les pucerons devraient donc être fortes.

NB : D'autres modifications du cycle de vie peuvent intervenir à un niveau plus fin, comme des événements d'allochronie conduisant à une désynchronisation de la production de formes sexuées et donc à un isolement reproducteur, comme c'est le cas de deux espèces de pucerons formant des galles en Amérique du Nord du genre *Pemphigus* (Abbot et Withgott 2004).

Définir les cycles de vie

Comme nous l'avons vu précédemment, un changement dans le cycle de vie peut être un des moteurs de la spéciation chez les pucerons. Avoir une idée précise des cycles de vie des espèces de pucerons est primordiale pour estimer l'existence de flux de gènes et comprendre les forces évolutives en jeu, qui sont des facteurs clé dans la spéciation. Afin de définir le cycle de vie d'une espèce, il faut prendre en compte plusieurs populations ou lignées qui la constituent, et étudier de façon fine leur écologie, ainsi que leur biologie et leur structure génétique. Les données écologiques nous permettent de valider des hypothèses ou d'y apporter des arguments. Par exemple, définir à quels types de plantes les individus d'une population sont associés et à quel moment de l'année, nous renseigne sur

l'existence ou non d'une alternance d'hôtes chez cette population. La distribution climatique peut suggérer également des modes de reproduction différents : seules les lignées sexuées peuvent survivre dans les régions aux hivers rudes, la distribution des lignées anholocycliques montre que celles-ci sont généralement prédominantes dans les régions où les hivers sont doux, et absentes des régions des latitudes extrêmes (Rispe et al. 1998; Vorburger, Lancaster, et Sunnucks 2003).

Les études génétiques apportent des informations cruciales tout d'abord car elles permettent de rassembler ou de différencier des populations, mais également car elles informent sur le mode de reproduction. En effet, la reproduction sexuée ou la parthénogénèse apomictique laissent une signature génétique différente, du fait de réarrangements génomiques très contrastés après chaque événement de reproduction (Meeûs, Prugnolle, et Agnew 2007; Schurko, Neiman, et Logsdon Jr 2009). Même si la modélisation des conséquences génétiques de l'asexualité chez des organismes complexes comme les pucerons est délicate, trois grandes prédictions peuvent être faites (Halkett, Simon, et Balloux 2005). Tout d'abord, la reproduction clonale conduit à une surreprésentation de génotypes identiques, et par conséquent les populations clonales ont une faible diversité génotypique (Balloux, Lehmann, et de Meeûs 2003). Deuxièmement, du fait de la transmission sans modification d'un génotype de la mère à l'embryon, l'accumulation de mutations au cours des générations conduit à un excès en hétérozygotes, se traduisant par une estimation du F_{is}^1 négative. De plus, ces mutations engendrent une grande diversité allélique dans les lignées clonales anciennes, ce phénomène est appelé l'effet de Meselson (Welch et Meselson 2000). Enfin, la transmission de copies génétiques sans remaniement génère des associations fortes entre loci qui peuvent être détectées en estimant le déséquilibre de liaison entre paires de loci. A l'exception de la diversité génotypique, tous ces estimateurs ne sont significativement affectés que quand la reproduction sexuée est très peu fréquente, et l'estimation du F_{is} est brouillée par une variance forte lorsque de la reproduction sexuée intervient, même rarement (Balloux, Lehmann, et de Meeûs 2003; de Meeûs et Balloux 2004). Même si tous ces indicateurs ne

¹ Le F_{is} est une mesure du déficit en hétérozygotes des individus dans une sous-population par rapport aux proportions attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg. Le calcul du F_{is} se fait à partir de la différence en hétérozygotie d'individus d'une population sous HWE (H_e) et d'individus de la population observée (H_o), le tout rapporté à l'hétérozygotie attendue sous HWE ($F_{is} = (H_e - H_o)/H_e$). Le F_{is} peut varier de -1 à 1, et traduit donc des écarts à un régime de panmixie.

sont concluants que dans le cas où la reproduction clonale est dominante, ce qui est rare dans la nature (cf ci-dessus), plusieurs études empiriques confirment ces prédictions chez les pucerons, par exemple chez : *Rhopalosiphum padi* (Delmotte et al. 2002), *Myzus persicae* (Vorbürger, Lancaster, et Sunnucks 2003), *Sitobion avenae* (Papura et al. 2003), *Acyrtosiphon pisum* (Kanbe et Akimoto 2009), *Aphis fabae* (Sandrock, Razmjou, et Vorbürger 2011), *Aphis gossypii* (Thomas, Boissot, et Vanlerberghe-Masutti 2012), *Tuberolachnus salignus* (Aradottir et al. 2012).

La biologie, *i.e.* la production de morphes sexués, le choix de plantes hôtes, etc., peut être étudiée à l'aide de protocoles expérimentaux sur les organismes vivants placés en conditions contrôlées. Le mode de reproduction a beaucoup été étudié au moyen d'expériences ayant pour but l'induction de la production de formes sexuées (Lees 1959; Voegtlin and Halbert 1998). Les conditions expérimentales ont pour but de recréer artificiellement les conditions environnementales de l'arrivée de l'hiver, en réduisant la photopériode et parfois la température qui sont des facteurs clés dans l'activation des mécanismes métaboliques conduisant à la production de formes sexuées. C'est notamment grâce à ce type d'expériences qu'ont été mis en évidence l'existence de modes de reproduction intermédiaires chez les pucerons qui peuvent échapper aux études génétiques pures. On a en effet pu montrer que certaines lignées de pucerons parthénogénétiques continuaient de produire des mâles ailés et pouvaient donc s'hybrider avec des lignées sexuées (Dedryver et al. 2001).

D. Pucerons et agronomie

Des ravageurs des cultures

Le puceron est un des ravageurs majeurs des cultures (Blackman et Eastop 1984; Minks et Harrewijn 1987; van Emden et Harrington 2007). Plusieurs caractéristiques biologiques en font des ravageurs redoutables : leur fécondité explosive, leur mobilité (grâce aux formes ailées transportées par les courants aériens), le caractère polyphage de certaines espèces, ou au contraire la forte spécialisation d'autres espèces vis-à-vis de plantes hôtes cultivées mondialement.

Les dégâts infligés aux plantes hôtes sont variés et ont plusieurs origines. Tout d'abord, la perforation des tissus végétaux blesse la plante, en réaction à cette agression on observe souvent une modification des tissus végétaux comme l'enroulement des feuilles colonisées qui réduit la surface photosynthétique et finalement induit une baisse de rendement. L'exploitation de la sève et l'injection de salive toxique affaiblissent la plante. Les pucerons sont également vecteurs de virus de plantes. Ceux-ci sont transmis par la salive du puceron qui entre en contact direct avec la sève élaborée et circule ensuite dans la plante. L'injection de salive est obligatoire même lors du sondage des plantes, et par conséquent la transmission de virus est effective même aux plantes sondées mais non acceptées. Les pucerons acquièrent les virus lors de l'ingestion de sève. Par exemple, le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*, est vecteur de plus de 100 virus de plantes (van Emden et al. 1969). Par ailleurs, la production de miellat et son accumulation à la surface de la plante hôte contribuent au développement de champignons qui peuvent être phytopathogènes.

De part la grande diversité de plantes hôtes associées aux plusieurs milliers d'espèces de pucerons, une bonne partie des plantes cultivées pour l'agriculture ou bien l'ornementation sont associés à des pucerons ravageurs potentiels. La gravité des dégâts infligés aux plantes cultivées, a conduit à la mise en place de nombreuses études et au développement de moyens de lutte contre les pucerons (traitements insecticides, vaporisation d'huiles, lutte biologique, utilisation de répulsifs, plantes résistantes, etc.).

Voies d'introduction

De nombreuses espèces de pucerons ravageurs de cultures ont été introduites dans de nouvelles aires. On suspecte souvent l'activité humaine via le transport de plantes colonisées d'être la cause de ces introductions. On peut citer en exemple, le puceron du Soja *Aphis glycines* qui s'est répandu de manière fulgurante en Amérique du Nord suite à une introduction depuis la Chine (Venette et Ragsdale 2004), le puceron farineux du prunier *Hyloopterus pruni* qui a été introduit à plusieurs reprises en Amérique du Nord à partir de différents foyer européens (Lozier, Roderick, et Mills 2009), le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* qui a été introduit au Chili à partir de l'Europe (Peccoud et al. 2008), ou encore *Myzus persicae* qui est maintenant un ravageur des vergers de pêchers

mondialement répandu (Margaritopoulos et al. 2009). Grâce à la génétique, aux données historiques et aux outils bioinformatiques, on peut maintenant retracer les routes d'introduction de ces espèces afin de mieux comprendre comment ce sont passées ces introductions et quels sont les facteurs impliqués (Lozier, Roderick, et Mills 2009; Margaritopoulos et al. 2009; Zepeda-Paulo et al. 2010).

Importance des superclones dans les complexes d'espèces ravageurs.

Un nombre croissant d'études portant sur la biologie des espèces de pucerons ravageurs de cultures révèle qu'une grande partie est constituée de lignées asexuées. Lynch (1984) a suggéré qu'au cours de l'évolution, la sélection devrait favoriser les clones généralistes. Une reproduction exponentielle continue, l'affranchissement vis-à-vis de la reproduction sexuée (coûteuse en temps, en individus et inféodée au site d'accouplement) combinés à un potentiel de dispersion intercontinental (entraînés par les courants d'air d'altitude ou déplacés par les activités humaines) peuvent conduire rapidement à l'émergence de superclones ravageurs. Les études récentes confirment la dispersion et la persistance de superclones à travers le monde. Peccoud et al. (2008) ont montré que des clones d'*Acyrtosiphon pisum* adaptés à différentes plantes hôtes ont envahi le Chili et se sont établis sur les cultures de légumineuses locales. De même les lignées invasives de *Myzus persicae* (Margaritopoulos et al. 2009) et plusieurs espèces du genre *Sitobion* (Sunnucks et al. 1996; Wilson, Sunnucks, et Hales 1999) se révèlent être purement clonales. L'espèce *Sitobion avenae* comprend deux superclones généralistes dont l'émergence a été favorisée par les pratiques agricoles (Haack et al. 2000; Figueroa et al. 2005). Enfin, *Aphis gossypii* est constitué de superclones, chacun spécialisé sur quelques espèces de plantes hôtes, et sont distribués dans le monde entier (Carletto et al. 2009).

II. Le modèle d'étude : *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach, 1843)

A. Systématique, morphologie et écologie de *B. helichrysi*, un puceron cosmopolite et polyphage

L'espèce *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach, 1843)² appartient à la famille des Aphididae (sensu Rémaudière), la tribu des Macrosiphini, au genre *Brachycaudus*, et enfin au sous-genre *Brachycaudus s.str.* (van der Goot, 1913). Le genre *Brachycaudus* comprend 50 espèces valides (Remaudière et Remaudière 1997). Quatorze espèces du genre sont hétéroéciques associées à différentes espèces de *Prunus* comme hôte primaire, et les autres sont monoéciques. *B. helichrysi* fait partie des quelques espèces du genre ayant une distribution quasi-mondiale, la plupart des espèces de *Brachycaudus* étant plutôt restreintes à l'Eurasie (Remaudière et Remaudière 1997; Blackman et Eastop 2000).

Le sous-genre *Brachycaudus s.str.* (van der Goot, 1913) comprend une dizaine d'espèces, parmi lesquelles *B. helichrysi* qui est l'espèce sœur de *B. spiraeae*. Alors que *B. spiraeae* est décrite comme monoécique sur plusieurs espèces de *Spiraea* (ligneuses de la famille des Rosaceae), *B. helichrysi* fait partie des quelques espèces hétéroéciques. La phase sexuée se déroule sur des espèces du genre *Prunus* et plus particulièrement les pruniers (*e.g.* *P. domestica*, *P. spinosa*, *P. insititia*, *P. cersifera*) (Bennett 1955; Madsen et Bailey 1958; Bell 1983) ou pêchers (*P. persicae*) (Verma et Singh 1990; Gupta et Thakur 1993), puis les pucerons migrent sur leurs hôtes secondaires herbacées qui comprennent de nombreuses espèces, appartenant principalement aux familles des Asteraceae et Boraginaceae (Blackman et Eastop 2000). Dans la littérature, *B. helichrysi* est aussi noté associé au trèfle (*Trifolium*), ces populations étant parfois considérées comme une autre espèce ou une sous-espèce (*warei* Theobald). Par ailleurs dans certaines régions aux conditions climatiques douces, des lignées anholocycliques peuvent être présentes toute l'année (Heie 1991; Blackman et Eastop 2000). Cette espèce forme des pseudogalles créées par l'enroulement des feuilles sur les colonies (Figure 7d). S'il ne colonise pas les feuilles, il s'installe

² Synonymes : *Aphis helichrysi*, *Anuraphis helichrysi*

préférentiellement dans des structures végétales complexes (Figure 7c) (bourgeon floraux ou foliaires, ombelles, cymes, aisselles foliaires) (pers. observation) qui vraisemblablement lui apportent une protection envers les prédateurs et/ou les intempéries. Il produit une grande quantité de miellat qui cristallise rapidement et s'accumule sur la plante (Figure 7c).

En plus de se cacher sur sa plante hôte, *B. helichrysi* est un puceron de petite taille (~2 mm à la taille adulte), sa couleur se confond facilement avec celle de la plante hôte, et il peut donc passer inaperçu lorsque les colonies sont peu développées (Figure 7). Les aptères sur hôtes secondaires sont encore plus petits que ceux sur hôte primaire. On remarque sa présence à l'enroulement des feuilles plutôt qu'au puceron lui-même. La morphologie de l'espèce sœur *B. spiraeae* est très proche, on les distingue par la taille de leur rostre, légèrement plus court chez *B. spiraeae*, et une soie en moins sur le premier segment du tarse de *B. spiraeae*.

B. Un ravageur de cultures

Au sein du genre *Brachycaudus*, on compte 6 espèces de ravageurs dont *B. helichrysi* fait partie. Du fait de sa grande polyphagie et de sa distribution cosmopolite, il est une menace pour un grand nombre de plantes cultivées à travers le monde. Il s'attaque aux vergers de pruniers (Madsen and Bailey 1958) et de pêchers (Verma et Singh 1990), ainsi qu'à des plantes herbacées cultivées comme les tournesols (Lerin et Badenhausser 1995; Badenhausser et Lerin 1998), et les chrysanthèmes (Wardlow et Gould 1981; Miller et Stoetzel 1997; Ramakers et Maaswinkel 2002). Il affecte de manière directe le développement de la plante hôte provoquant l'enroulement des feuilles (Figure 7d), ce qui induit une baisse de rendement des productions agricoles. Il est très surveillé dans les vergers de pruniers et pêchers car il est un des principaux vecteurs du virus de la Sharka (Plum Pox virus) qui provoque la plus sérieuse des maladies des arbres fruitiers à noyaux (Bell 1983; Verma et Singh 1990; Levy et al. 2000). Son importance agro-économique lui vaut le surnom de « puceron vert du prunier » ou « leaf-curl plum aphid ». Il est également vecteur de nombreux phytovirus, pour ses plantes hôtes mais également pour des plantes qu'il ne colonise pas mais qu'il « goûte » lors de sa recherche d'hôte, comme le cucumovirus mosaïque du concombre, le caulimovirus mosaïque du Dahlia, un virus mosaïque des

Cineraria, le virus Y C(AB) de la pomme-de-terre (Blackman et Eastop 2000). Sous serres, des lignées anholocycliques s'établissent sur les plantes ornementales comme les chrysanthèmes (Blackman et Eastop 2000).



Figure 7. Planche photographique sur *B. helichrysi*. a, Les femelles vivipares aptères sont de couleur vert clair à jaune ou marron clair, leur corps est luisant. La face dorsale n'est pas pigmentée, les cornicules courtes sont claires, les antennes et les pattes sont foncées. La cuticule comporte des tubercules rapprochés plus ou moins visibles. Photographie © 2010 A. Jensen. b, Les femelles vivipares ailées portent des antennes, des pattes et des cornicules sombres. L'abdomen vert est recouvert de sclérites sombres sur les bords et d'une tache sombre étendue sur la face dorsale qui est composée de la fusion de plusieurs rayures sombres. Photographie © 2010 A. Jensen. c, Colonie de *B. helichrysi* sur une inflorescence de *Senecio vulgaris* et mise en évidence des gouttes de miellat cristallisées (m). d, Pseudogalles de feuilles de *P. domestica* formées par les colonies de *B. helichrysi*.

C. Etat de l'art sur *B. helichrysi*.

Très peu d'études en dehors d'études purement agronomiques ont été centrées sur *B. helichrysi*. Une recherche dans la base de données bibliographique Web of Knowledge (mot clé : « *Brachycaudus helichrysi* », le 18/09/2012) renvoie 34 résultats assez divers. Seules quelques études portent sur la biologie de l'espèce, principalement l'étude phénologique des générations sur hôte primaire pruniers et pêchers (Bell 1983; Gupta et Thakur 1993), les phéromones sexuelles (Symmes et al. 2012), la dynamique des populations sur tournesol et autres plantes d'intérêt (Badenhausser 1994; Lerin et Badenhausser 1995; Zhou et al. 1995; Badenhausser 1996; Badenhausser et Lerin 1998a; Dewar et al. 2000; Basky et Magyar 2009); plusieurs études portent sur *B. helichrysi* comme vecteur de virus (Basky et Raccah 1990; Powell, Harrington, et Spiller 1992; Isac, Preda, et Marcu 1998), sa susceptibilité aux souches d'un champignon entomopathogène (Sitch et Jackson 1997); et une vingtaine d'entre elles correspondent à des études descriptives sur la faune associées à des plantes d'intérêt (pruniers, pêchers, cultures maraîchères, plantes ornementales cultivées sous serre, plantes envahissantes), relevant la présence de *B. helichrysi* et parfois de ses parasitoïdes associés. La plupart des conclusions soulignent la grande polyphagie de *B. helichrysi* sur hôtes herbacées, sa distribution mondiale et son adaptation à de nouveaux environnements, son rôle dans la transmission de virus phytopathogènes, tous ces caractères soulignant son potentiel ravageur.

Son écologie est encore peu connue. Seules quelques études ponctuelles relèvent son association avec certaines plantes hôtes mais aucun recensement exhaustif de ses hôtes secondaires n'a fait le cas d'étude. Il existe quelques bases de données de collections entomologiques relatant la présence de *B. helichrysi* mais aucune synthèse sur sa distribution et son écologie n'a été publiée. Les informations disponibles sur *B. helichrysi*, ses plantes hôtes, sa distribution dans les guides d'identification des pucerons ont très peu évolué depuis les années 80. De plus, toutes les anciennes données sont basées sur des identifications morphologiques et il n'existe aucune donnée génétique associée. On peut se baser sur plusieurs bases de données entomologiques qui couvrent de vastes aires géographiques, afin d'orienter notre échantillonnage pour cette thèse :

- La base de données d'Essig accessible sur internet (Essig Museum of entomology collection, <http://essigdb.berkeley.edu/>) recense 635 lames de pucerons identifiés comme *B. helichrysi*, collectées en Argentine, Australie, Belgique, Brésil, Canada, Chili, Colombie, Costa Rica, Egypte, Allemagne, Indonésie, Italie, Japon, Madagascar, Mexique, Pakistan, Perou, Suisse, Turquie, Royaume-Uni, Etats-Unis (dont Hawaï) (carte en annexe chapitre 1), sur des plantes hôtes appartenant à 26 familles botaniques différentes, de 1909 à 1970.
- La base de données des Aphidoidea de l'USDA du laboratoire de Systématique et d'Entomologie (<http://www.sel.barc.usda.gov/aphid/aphframe.htm>) qui note la présence de *B. helichrysi* dans 44 pays, dont 27 états des Etats-Unis et provinces du Canada, associés à sept familles de plantes mais ne donne pas de localités précises.
- L'agro-atlas russe « Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic plants and their diseases, pests and weeds.» (Berim 2003) (http://www.agroatlas.ru/en/content/pests/Brachycaudus_helichrysi/). Cette base de données présente *B. helichrysi* comme un des ravageurs de pruniers et pêchers d'Asie centrale. Une carte détaillée de cette région montre que les dégâts les plus importants ont lieu sur les vergers de Crimée, du Moyen-Orient, du Sud du Kazakhstan, et dans certaines régions du Caucase (carte en annexe chapitre 1).

Bien que les études sur *B. helichrysi* relèvent son potentiel ravageur et son importance agro-économique, cette espèce passe assez inaperçue dans la littérature au milieu d'espèces de pucerons plus emblématiques pour lesquelles un gros travail génétique a été entrepris. Il faut attendre plusieurs études phylogénétiques sur le genre *Brachycaudus* (Coeur d'acier et al. 2008; Jousset, Desdevises, et Coeur d'acier 2009; Jousset, Genson, et Coeur d'acier 2010) et l'acquisition de séquences pour plusieurs spécimens de l'espèce *B. helichrysi* pour souligner son intérêt scientifique et agronomique: comme on l'a vu, c'est une des rares espèces à être hétéroécique, *B. helichrysi* est très polyphage et les reconstructions phylogénétiques du genre suggèrent l'existence de deux clades génétiques au sein de cette espèce. *B. helichrysi* est donc un modèle de choix pour des études d'évènements de spéciation, de cycle de vie, d'associations plantes-pucerons, d'évolution de ravageurs de cultures, etc. Une première étude portant sur la différenciation génétique et morphologique au sein de *B. helichrysi* (Tayeh 2007) confirme l'existence de deux clades génétiques et

soulève des hypothèses intéressantes quant à leur biologie, suggérant des cycles de vie différents : un clade alternerait entre *Prunus* et herbacées alors que le second aurait un cycle de vie se déroulant uniquement sur herbacées.

D. Objectifs de la thèse

La diversité génétique et écologique existante au sein de *B. helichrysi* a semble-t-il été sous-estimée, il était donc temps de clarifier les choses d'un point de vue génétique, biologique et écologique.

Le premier objectif de la thèse a été de confirmer l'existence de deux clades appelés *B. helichrysi* H1 et H2, et de définir leurs statuts (espèces ?, lignées mitochondriales ?). La divergence génétique existant entre ces deux taxa a été utilisée afin de mettre au point un test de discrimination par PCR-RFLP. Cette méthode d'identification rapide a permis d'étudier la distribution climatique ainsi que l'association aux plantes hôtes des deux espèces. Ce travail est présenté dans le Chapitre 1.

Une fois la divergence de deux espèces sœurs établie, mon deuxième objectif a été de déterminer les cycles de vie de H1 et H2. Ce travail a nécessité la compilation de données génétiques (microsatellites), afin de définir des lignées au sein des deux espèces sœurs ainsi que leurs modes de reproduction, et d'intégrer les données écologiques concernant les plantes hôtes recueillies au cours d'échantillonnages. Les résultats sont présentés dans le Chapitre 2.

Nous avons établi que H2 rassemble des lignées aux cycles de vie distincts, majoritairement des lignées anholocycliques qu'on retrouve dans le monde entier durant plusieurs années. Du fait de l'importance des lignées clonales dans le potentiel ravageur des pucerons, nous avons poussé l'étude sur ces lignées clonales H2 afin de clarifier leur écologie. Pour cela nous avons compilé des données climatiques, d'association de plante-hôte, et enfin d'association avec une communauté de bactéries secondaires afin de voir si un patron émergeait. Cette étude est présentée dans le Chapitre 3.

Finalement, nos résultats révèlent une histoire complexe au sein de cette espèce, avec l'émergence de lignées aux cycles de vie bien distincts. Nous avons donc essayé de comprendre les relations phylogénétiques existantes entre toutes ces lignées, afin de

retracer l'histoire évolutive des changements de cycle de vie au sein de *B. helichrysi*. Ce travail est présenté dans le Chapitre 4.

Partie méthodologie générale, les particularités du modèle *B. helichrysi*.

I. Un travail à plusieurs échelles... quelques définitions

A l'inverse d'autres organismes, du fait de la clonalité, il est assez difficile de définir les limites des colonies, populations, etc., de pucerons.

Les périodes d'échantillonnage ont lieu généralement à la fin du printemps, lorsque plusieurs générations asexuées se sont succédées sur hôte primaire et qu'une partie des individus ont commencé à s'installer sur hôtes secondaires. A cette époque de l'année, les ressources alimentaires et les conditions environnementales sont optimales, et la reproduction sexuée est en pleine explosion, permettant l'accès à une grande quantité de matériel biologique.

Pour cette étude, nous appelons colonie, l'ensemble des individus d'une même espèce présents sur une même plante (l'ensemble de la plante pour les hôtes secondaires herbacées, les feuilles d'un même rameau sur *Prunus*). Cette colonie a pu être fondée par une seule femelle vivipare ailée, les individus de cette colonie seront alors tous identiques génétiquement ; ou bien par plusieurs femelles vivipares aptères, on aura alors un amalgame d'individus de génotypes différents. Du fait de l'absence de caractères morphologiques distinguant H1 de H2, dans notre cas les colonies peuvent être composées d'individus des deux espèces sœurs sur hôtes secondaires.

Nos échantillons sont constitués d'une partie des individus d'une colonie ou de deux colonies présents sur deux plantes très proches.

Les populations sont définies *a posteriori* grâce aux analyses de génétique des populations, rassemblant des individus de plusieurs échantillons mais pas forcément tous les individus d'un même échantillon.

Par superclone, on entend une lignée purement asexuée, dont les représentants sont présents sur plusieurs continents et persistent pendant plusieurs années. Ils sont donc tous génétiquement identiques, à l'exception de quelques mutations spontanées et qui peuvent se fixer à une échelle locale.

II. Un puceron de petite taille...

A. Echantillonnage et tri des pucerons

Tous ces travaux reposent sur l'exploitation de spécimens en collection au Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP), l'obtention de colonies de régions non échantillonnées grâce à des collaborations, ainsi qu'un gros travail d'échantillonnage de colonies dans 3 régions principales : La France (2009-2012), Le Sud du Kazakhstan (2010), Les Etats-Unis (Colorado (2010) et la Côte Ouest (2011)) (Figure 8). Ces régions ont été choisies car elles présentent des caractéristiques écologiques variées nous permettant d'optimiser la récolte d'échantillons aux cycles de vies contrastés s'ils existent. La France a été largement échantillonnée car nous y avons facilement accès et ce pays permet d'échantillonner dans des régions aux conditions environnementales (climat, flore, etc) très variées. La côte Ouest des Etats-Unis a été choisie car cette zone géographique est proche de l'aire d'origine du tournesol (Nord du Mexique - Californie) qui est un des hôtes d'importance agronomique pour *B. helichrysi*. Nous avons également pu bénéficier des données de la base d'Essig pour préparer notre plan d'échantillonnage. Cette base de données fait notamment mention de colonies récoltées tard en automne ou tôt au printemps sur herbacées faisant donc référence à de potentielles lignées anholocycliques ou monoéciques sur herbacées. La douceur du climat océanique devrait permettre le maintien de lignées asexuées dans cette région. La topologie de la côte nous a aussi permis d'effectuer un transect Nord-Sud sans obstacle géographique à franchir. Contrairement à la côte, le Colorado est soumis à des hivers rigoureux, où devrait dominer des lignés sexués. Enfin le Kazakhstan est lui aussi soumis à des hivers sévères où devrait dominer des lignées sexués et de plus il fait partie de l'aire d'origine des espèces du genre *Brachycaudus* et de leurs hôtes primaires du genre *Prunus* et, on s'attend donc à y retrouver une grande diversité.

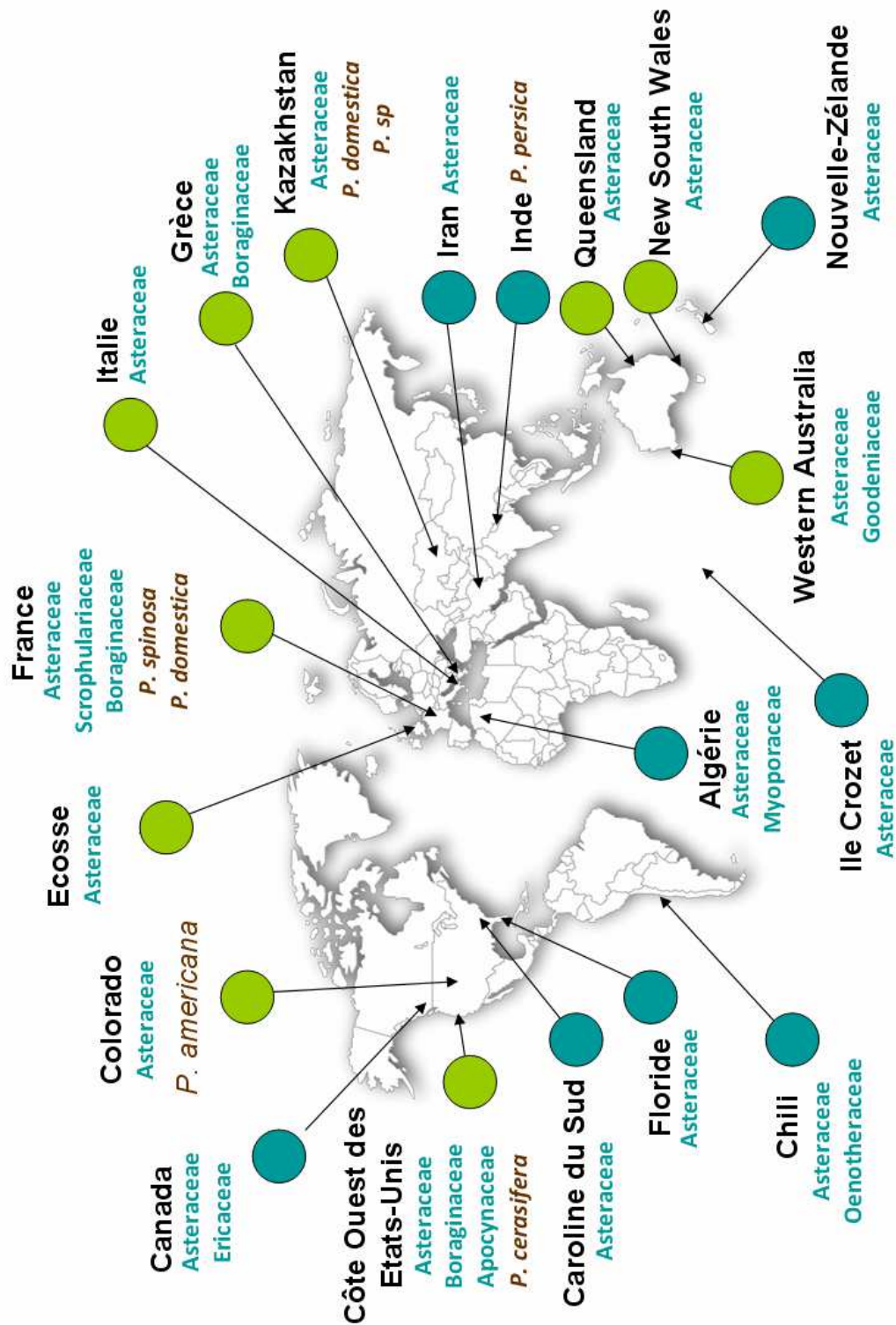


Figure 8. Carte mondiale présentant l'échantillonnage de *B. helichrysi*. En vert, les colonies échantillonnées par le CBGP ; en bleu, les colonies obtenus grâce à des collaborations. Les familles d'hôtes herbacées sur lesquelles ont été récoltés les colonies sont en bleu, les hôtes primaires en marron.

La collecte des échantillons se fait à l'aide d'un aspirateur à bouche. Les pucerons sont immédiatement mis dans des tubes contenant de l'alcool à 90°, l'échantillon est numéroté, géoréférencé, et la date et la plante hôte sont renseignées. Du fait de sa petite taille et de sa couleur verte, *B. helichrysi* est souvent confondue avec les larves d'autres espèces qui peuvent co-exister sur une même plante et qu'il est difficile de distinguer à l'œil nu. Il faut donc passer par une étape de tri des individus au laboratoire sous loupe binoculaire. Cependant, cette étape ne permet pas de différencier les individus des espèces sœurs H1 et H2.

B. Manipulation *in vivo*.

En plus de sa petite taille, la formation de pseudogalles ne rend pas sa manipulation *in vivo* aisée. Après avoir testé différentes plantes hôtes, les pousses d'*Achillea millefolium* se sont avérées être une bonne alternative aux plantes à feuilles simples qui étaient rapidement transformés en pseudogalles et rendaient le suivi des générations impossible lors des expériences. Les feuilles d'*A. millefolium* ne forment pas de pseudogalles, ni en condition expérimentales ni dans la nature. Les pousses d'*A. millefolium* sont sélectionnées au stade « premières feuilles », quand elles sont encore peu découpées ce qui facilite le transfert des individus sur une surface foliaire plane. Seule une feuille par plantule est conservée, le bourgeon foliaire est régulièrement coupé et maintenu sous une couche de sable pour éviter que les pucerons s'y installent, ce qui rendrait encore une fois leur observation difficile.

C. Biologie moléculaire de routine.

Au cours de ce travail, un test d'identification par PCR-RFLP a été mis au point, et des nouveaux marqueurs moléculaires ont été développés :

- 3 couples d'amorces ont été mis au point pour amplifier 3 fragments de gènes bactériens (Leu3F/Leu5R, MethelF/MethelR, Trpbel_F/Trpbel_R)
- la définition d'un nouveaux couple d'amorces pour le gène nucléaire Aph afin d'avoir un meilleur rendement autant chez H1 que chez H2 (AphelicF/AphelicR)

- la définition d'un nouveau couple d'amorces pour amplifier un fragment du gène CytB des individus H2 collectés en Inde sur pêcheurs. (CytBhelicF/CytBhelicR).
- 4 marqueurs microsatellites additionnels ont été développés et intégrés dans les PCR-multiplex.

C'est au cours de ce travail de thèse sur *B. helichrysi* que nous avons mis en évidence que les deux espèces sœurs co-existaient fréquemment, ainsi que différentes lignées génétiques, ce qui nécessite d'extraire l'ADN d'un individu unique. En contrepartie, la quantité d'ADN disponible pour chaque individu est limitée et parfois insuffisante pour acquérir un jeu de données complet par individu (séquences nucléaire, mitochondriales, bactériennes, et 14 marqueurs microsatellites).

Chapitre 1. Mise en évidence des deux espèces sœurs H1 et H2

Introduction du chapitre : Diversité génétique chez B. helichrysi, état de l'art.

A. Les reconstructions phylogénétiques du genre *Brachycaudus* révèlent la divergence de deux clades au sein de l'espèce *B. helichrysi*.

Récemment, la systématique et la phylogénie du genre *Brachycaudus* a été revue (Coeur d'acier et al. 2008). Les reconstructions phylogénétiques basées sur un marqueur nucléaire, deux mitochondriaux révèlent une divergence génétique de deux clades au sein de *B. helichrysi*, représentée par 4 spécimens. La divergence génétique observée entre ces deux clades est d'ailleurs la plus forte variation intraspécifique relevée dans cette étude.

Dans une seconde étude phylogénétique du genre étudiant la cospéciation avec l'endosymbionte primaire *Buchnera aphidicola* (Jousselin, Desdevises, et Coeur d'acier 2009), l'existence de deux clades au sein de l'espèce *B. helichrysi* est une fois de plus suggérée. L'addition des trois marqueurs bactériens au jeu de données précédent (Coeur d'acier et al. 2008), confirme l'existence de deux clusters génétiques correspondant à deux espèces sœurs d'après les critères définis dans cette étude (mais pas par la méthode de délimitation d'espèces de Pons (Pons et al. 2006)).

Dans une troisième étude portant sur l'évolution des cycles de vie au sein du genre *Brachycaudus* (Jousselin, Genson, et Coeur d'acier 2010), les reconstructions phylogénétiques sont basées sur le jeu complet de marqueurs (un nucléaire, deux mitochondriaux, trois bactériens) auquel s'ajoute un marqueur nucléaire correspondant à un espaceur intergénique (Aph) donc plus informatif au niveau de l'espèce. Les reconstructions menées sur ce jeu de données confirment l'existence de deux clades au sein de *B. helichrysi*. De plus, par la méthode de délimitation d'espèces de Pons, les deux clades sont définis comme deux espèces sœurs au sein de *B. helichrysi*.

De manière plus anecdotique, une étude de barcoding portant sur la famille des Aphididae révèle une forte variation intraspécifique entre séquences de COI de *B. helichrysi* accessibles sur Genbank ainsi que celles obtenues à partir de spécimens récoltés en Corée du Sud (Lee et al. 2011). La variation intraspécifique mesurée au sein de *B. helichrysi* est une des plus fortes parmi toutes les espèces de pucerons de la famille des Aphididae étudiées ici.

B. Etude sur *B. helichrysi* menées au CBGP

L'étude de cette divergence au sein de l'espèce *B. helichrysi* a ensuite fait l'objet d'un stage de recherche de master (Tayeh 2007). Pour cette étude une trentaine de spécimens ont été utilisés afin de mener des reconstructions phylogénétiques, ainsi qu'une étude morphologique (en prenant notamment en compte l'effet de la plante hôte) sur une centaine d'individus.

Les reconstructions phylogénétiques basées sur deux marqueurs mitochondriaux (COI et CytB) révèlent l'existence de deux clades, la divergence génétique observée est de l'ordre de celle mesurée entre espèces du genre *Brachycaudus*. L'auteur suggère qu'un clade serait hétéroécique, alors que l'autre resterait sur des plantes de types hôtes secondaires (monoécie ou anholocyclie).

L'étude morphologique n'a pas montré de différences significatives entre les deux clades sur l'ensemble des caractères morphologiques étudiés. Par contre, cette étude morphologique a mis en évidence une forte plasticité phénotypique en fonction de la famille de plante hôte (primaire : Rosaceae, et secondaires : Asteraceae, Boraginaceae et Scrophulariaceae) et de la zone géographique d'origine (France, Grèce, Australie).

Une banque microsatellites a été établie et une dizaine de marqueurs ont été développés Tayeh *et al.* (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* 2010).

C. Présentation des parties

Dans ce chapitre, deux articles sur la divergence génétique des deux espèces sœurs seront présentés dans deux premières parties.

Une première étude basée sur un échantillonnage mondial de spécimens de *B. helichrysi* démontre l'existence des deux espèces sœurs appelées *B. helichrysi* H1 et H2. Les reconstructions phylogénétiques obtenues à partir de plusieurs séquences (deux marqueurs mitochondriaux, un marqueur nucléaire et un marqueur bactérien de l'endosymbionte primaire *Buchnera aphidicola*) soutiennent fortement l'existence de deux clades au sein de *B. helichrysi*. La divergence génétique entre ces deux clades est de l'ordre de celle observée entre espèces sœurs au sein du genre *Brachycaudus*. L'existence de deux clades est également soutenue par les reconstructions phylogénétiques basées sur 14 marqueurs microsatellites.

Dans une seconde étude, la divergence génétique sera utilisée afin de développer un test moléculaire permettant de discriminer les individus des espèces H1 et H2 qui sont morphologiquement indistinguables. Grâce à ce test d'identification, nous avons mis en évidence l'existence de colonies mixtes, constituées d'un mélange d'individus H1 et H2. Ce test nous permet d'étudier la distribution géographique et les associations aux plantes hôtes à partir d'un échantillonnage mondial et représentant des conditions environnementales variées. H2 n'est jamais retrouvé associé aux Prunus, et H1 et H2 partagent la même gamme de plantes hôtes herbacées. H1 et H2 présentent des distributions climatiques différentes. Les résultats de l'étude écologique suggèrent que H1 et H2 ont des cycles de vie différents.

Afin d'explorer la divergence génétique entre les deux espèces sœurs dans notre jeu de données complet, nous rechercherons l'existence d'allèles privés pour les 14 locus microsatellites étudiés. Cette étude constituera la troisième partie de ce chapitre.

La description formelle de nouvelles espèces s'accompagne de descriptions morphologiques. Nous présenterons dans une quatrième partie des résultats pertinents d'études morphologiques menées sur *B. helichrysi*, mais l'absence d'identification moléculaire des individus ne nous permet pas de tirer des conclusions sur les caractéristiques morphologiques de H1 et H2.

I. Article n°1 Publié dans Zoologica Scripta. Molecular phylogeny reveals the existence of two sibling species within the aphid pest Brachycaudus helichrysi (Hemiptera : Aphididae).

Joséphine Piffaretti, E-mail : piffaretti@supagro.inra.fr

Flavie Vanlerberghe-Masutti, E-mail : Flavie.Vanlerberghe@supagro.inra.fr

Ashraf Tayeh, E-mail: tayeh@supagro.inra.fr

Anne-Laure Clamens, E-mail: Anne-Laure.Clamens@supagro.inra.fr

Armelle Cœur d'Acier, E-mail : coeur@supagro.inra.fr

Emmanuelle Jousselin, E-mail : jousseli@supagro.inra.fr

INRA – UMR 1062 CBGP (INRA, IRD, CIRAD, Montpellier SupAgro), Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet CS 30 016, F-34 988 Montferrier-sur-Lez, France.

Fax: +33 (0) 4 99 62 33 45

Molecular phylogeny reveals the existence of two sibling species in the aphid pest *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae).

J. PIFFARETTI, F. VANLERBERGHE-MASUTTI, A. TAYEH, A-L. CLAMENS, A. CŒUR D'ACIER, E. JOUSSELIN.

Molecular divergence of two sibling species of aphid

J. Piffaretti *et al.*

(2012) Zoologica Scripta, 41, 266–280.

Abstract

Brachycaudus helichrysi is a worldwide polyphagous aphid pest that seriously damages its primary hosts (*Prunus* spp.) and the various cultivated plants among its secondary hosts (e.g. sunflower). A recent study of the *Brachycaudus* genus suggested that this species might encompass two differentiated lineages. We tested this hypothesis, by carrying out a phylogenetic study of this aphid pest based on worldwide sampling and the evaluation of mitochondrial, nuclear and *Buchnera aphidicola* DNA markers. We show that this species is actually an amalgamation of two sibling taxa, *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2, that seem to have overlapping geographic ranges and herbaceous host plant preferences. These two taxa displayed levels of genetic divergence as great as those generally found between sister species in the *Brachycaudus* genus, suggesting that they actually correspond to two distinct species. Our phylogenetic reconstructions revealed a degree of incongruence between the topologies obtained with the aphid gene dataset and with data for a DNA marker from its primary endosymbiont. We identified possible reasons for this observation and discuss the ecological and genotypic data suggesting that *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 have different life cycles. Joséphine Piffaretti, Flavie Vanlerberghe-Masutti, Ashraf Tayeh, Anne Laure Clamens, Armelle Cœur d'Acier, Emmanuelle Jousselin, INRA – UMR 1062 CBGP (INRA, IRD, CIRAD, Montpellier SupAgro), Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet CS 30 016, F-34 988 Montferrier-sur-Lez, France.

E-mail piffaretti@supagro.inra.fr ; jousseli@supagro.inra.fr

Keywords: Leaf-curl plum aphid, cryptic species, primary endosymbiont, phylogenetic incongruence, aphid life cycle, microsatellites.

Introduction

Easy access to increasingly large numbers of DNA sequences has been provided by the development of molecular and bioinformatic tools. Analyses of these sequences have highlighted the importance of molecular markers for identifying cryptic species (Bickford *et al.* 2007), particularly for arthropods, a highly diverse group of invertebrates displaying considerable morphological convergence, for which taxonomy is far less developed than for certain other groups, such as mammals (Hebert *et al.* 2004; Hajibabaei *et al.* 2006; Footit *et al.* 2008; Smith *et al.* 2008).

Aphids (Insecta, Hemiptera, Aphididae) constitute one of the groups of insects for which molecular tools have proved useful for species identification and delimitation (Carletto *et al.* 2009; Footit *et al.* 2009; Peccoud & Simon 2010). These sap-sucking insects encompass about 4700 species (Remaudière & Remaudière 1997; Blackman & Eastop 2000), some of which are pests of cultivated host plants worldwide. They damage their host plants directly, through their feeding behaviour, and indirectly, by transmitting major plant viruses (Blackman & Eastop 2000; Emden & Harrington 2007). One of the features differentiating aphids from other insects is their reproduction by cyclic parthenogenesis (Minks & Harrewijn 1987; Blackman & Eastop 2000): multiple asexual generations are produced in the favourable conditions prevailing during the summer; when the photoperiod and temperature decrease under a critical threshold in autumn (announcing winter's less favourable environmental conditions), a single sexual generation is produced that produces eggs for the purposes of overwintering. Aphids display highly diverse feeding behaviour, from monophagy to polyphagy. Their effectiveness as crop pests is due both to their capacity to reproduce asexually (rapidly producing very large numbers of individuals) and the broadness of their host ranges.

Aphid taxonomy has been much more thoroughly studied than that of other insect groups and is still being investigated, due to the pest status of some species (Miller & Footit 2009). However, many challenging issues remain in the identification and delimitation of species within this group. Features specific to the life cycle of aphids result in intraspecific polyphenism, due to the production of various morphs — sexual or parthenogenetic, viviparous/oviparous, winged or apterous individuals (Minks & Harrewijn 1987; Braendle *et al.* 2006; Brisson 2010) — and polymorphism due to morphological variations linked to the use of different host plants or environmental factors (Lambers 1966; Wool & Hales 1997; Margaritopoulos *et al.* 2000; Nevo & Coll 2001; Ruiz-Montoya *et al.* 2005). This polyphenism and

the plasticity of morphological traits may complicate classical taxonomic methods based solely on morphological characters. Various molecular markers have been developed to overcome these problems, and the usefulness of these markers for aphid species identification and delimitation has been demonstrated in many studies. DNA-based discrimination tests, such as RFLP analyses, have been used for the identification of closely related and morphologically similar species (Carletto *et al.* 2009). DNA barcoding (i.e. the use of a short standardized DNA sequence from one specimen and its comparison with sequences including referenced vouchers to identify species) has also proved efficient in some aphid groups (Footit *et al.* 2008, 2009; Lee *et al.* 2011). Furthermore, several studies investigating intraspecific genetic variation have identified host races or populations specialising on a particular host (Via *et al.* 2000; Margaritopoulos *et al.* 2005; Carletto *et al.* 2009; Peccoud *et al.* 2009) that might even, in some cases, constitute different species (Peccoud *et al.* 2009). Molecular phylogenies based on a large number of DNA markers have also revealed that species identification based on classical taxonomy alone may be misleading, with some species erroneously defined on the basis of associations with host plants ((Coeur d'acier *et al.* 2008; Jousselin *et al.* 2009)).

In this study, we used molecular markers to investigate the existence of two well differentiated lineages within the aphid species *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach, 1843). *Brachycaudus helichrysi* is a polyphagous, cosmopolitan aphid (Blackman & Eastop 2000). It has a heteroecious life cycle, alternating between several *Prunus* (Rosaceae) species as primary hosts (Bennett 1955; Gupta & Thakur 1993) and various herbaceous secondary hosts (belonging mostly from the Asteraceae and Boraginaceae) during the summer. This species is known as the leaf-curl plum aphid and is considered to be a pest on several crops (field sunflower (Lerin & Badenhauer 1995; Badenhauer & Lerin 1998), plum orchards (Madsen & Bailey 1958), and ornamental flowers, such as chrysanthemums (Wardlow & Gould 1981; Miller & Stoetzel 1997; Ramakers & Maaswinkel 2002)). *B. helichrysi* colonies cause damage by curling the leaves of the plant and transmitting viruses, including the plum-pox virus, which causes the most serious viral disease of stone fruits (Bell 1983; Verma & Singh 1990; Levy *et al.* 2000). The eggs hatch on *Prunus* during spring, each giving rise to a morph called a fundatrix, which is apterous and viviparous. These individuals produce several generations of apterous aphids, which move to the leaves and feed on the phloem, causing the leaves to curl. At the end of spring, winged forms are

produced for dispersal to secondary hosts. The winged viviparous form establishes a new colony on the secondary host, which is maintained by generations of apterous parthenogenic females until the population density becomes too high and

Previous molecular phylogenies of the genus *Brachycaudus* suggested that *B. helichrysi* comprised two different genetic entities (Coeur d'acier *et al.* 2008; Jousselin *et al.* 2009). However, this assertion was based on a very small number of samples and required confirmation in a larger sample. The two lineages could exhibit different life cycles (i.e. difference in host plant and/or reproductive mode). A better knowledge of the biology of this aphid is actually needed for understanding its life cycle and population dynamics and deciding on pest control strategies (Bennett 1955; Arora *et al.* 2009). For instance, different uses of cultivated host plants would imply that the two lineages are exposed to very different pesticide treatments and could have major implications for the evolution of resistance to pesticide. In this study, on *B. helichrysi* specimens collected around the world, we constructed a molecular phylogeny based on two aphid mitochondrial genes, one aphid nuclear DNA marker and one DNA marker from the primary symbiont of the aphids, *Buchnera aphidicola*. We also studied 14 microsatellite loci, 10 of which were previously used by Tayeh *et al.* (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* 2010), the remaining four being developed for this study, for confirmation of the genetic differentiation observed for more variable nuclear DNA sequences and to investigate the genetic diversity intraclade. We also briefly study the use of the COI sequences, usually used for aphids DNA barcoding, generated in our study to test the assignment of *B. helichrysi* specimens for which the COI data are deposited in Genbank from countries absent in this study.

Materials and methods

Aphid samples

We collected 65 aphid colonies between 1995 and 2009, from various host plants (from 6 plant families, 17 genera) and different parts of the world (9 countries on 5 continents) (Table 1). These colonies were immediately preserved in 70° ethanol for storage. Several specimens from species closely related to *B. helichrysi* were chosen as outgroups. We collected samples of *Brachycaudus salicinae* (Börner, 1939) and *Brachycaudus spiraeae* (Börner, 1932), which, like *B. helichrysi*, belong to the genus *Brachycaudus* and subgenus *Brachycaudus*. Each sample corresponded to specimens collected from one or a few neighbouring host plants of the same species. From

winged dispersal forms are produced (Bennett 1955). In some regions with mild climatic conditions, asexually reproducing lineages may be present throughout the year (Heie 1991).

each sampled colonies, we took one individual for DNA sequencing and five to 10 other individuals for genotyping.

DNA extraction and sequencing

Total genomic DNA was extracted from a single individual per sample with the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) in 50 µl of extraction buffer. All DNA samples were stored at -20°C.

All polymerase chain reactions (PCR) were performed in a final volume of 30 µl containing 1x reaction buffer (CoralLoad PCR Buffer, Qiagen), 0.1 mM of each dNTP, 0.7 µM of each primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase and 2 or 3 µl of DNA extract.

A 658 bp fragment of the mitochondrial *cytochrome oxidase subunit I* (COI) gene was amplified with the LepF (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3') and LepR (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3') primers (Sheffield *et al.* 2009), in an Eppendorf thermocycler, as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 48°C and 1 min at 72°C and a final elongation phase at 72°C for 5 min.

An approximately 750 bp fragment of the mitochondrial *cytochrome B* gene (CytB) was amplified with CP1 (5'-GATGATGAAATTTTGGATC-3') (Harry *et al.* 1998) and CB2 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3') primers (Jermin & Crozier 1994), in an Eppendorf thermocycler, as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 48°C and 1 min at 72°C and a final elongation phase at 72°C for 5 min.

An approximately 600 bp fragment of the *ssb-dnaB* intergenic spacer of the primary symbiont *B. aphidicola* (sDNA) was amplified with the sbF (5'-CGAACWTCVGGATCTTGWC-3') and dnaBR (5'-ATCCCATTGTTTCATTATCTAACAT-3') primers (Jousselin *et al.* 2009), in an Eppendorf thermocycler, as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min; followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C and 1 min at 72°C and a final elongation phase at 72°C for 5 min. The mitochondrial and bacterial genes were purified by PCR and sequenced by Macrogen (Korea), using the PCR primers.

Two pairs of primers were used to amplify an approximately 770 bp intron corresponding to the *para*-type gene encoding the *IIS2-S6* region of the voltage-gated sodium channel of the *B.*

Table1. Information about sampling of *Brachycaudus helichrysi*, *Brachycaudus spiraeae* and *Brachycudus salicinae*. Group identification, group attribution after phylogenetic reconstruction; N genotyped individuals, number of individuals genotyped with less than 20% missing data; N unique MLG, number of unique multilocus genotype per sampled colonies.

Species	Voucher	Sampling date	Host plant family	Host plant species	Country	Region	group identification	N genotyped individuals	N unique MLG
<i>B. helichrysi</i>	705	June 1999	Asteraceae	<i>Achillea macrophylla</i>	France	Lorraine	H1	6	5
<i>B. helichrysi</i>	707	June 1999	Asteraceae	<i>Saussurea alpina</i>	France	Lorraine	H1	8	6
<i>B. helichrysi</i>	852	June 2000	Asteraceae	<i>Helichrysum stoechas</i>	France	Aquitaine	H2	9	6
<i>B. helichrysi</i>	1149	June 2001	Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i>	France	Haute-Normandie	H1	5	3
<i>B. helichrysi</i>	1207	June 2001	Rosaceae	<i>Prunus spinosa</i>	France	Haute-Normandie	H1	9	5
<i>B. helichrysi</i>	1455	May 2002	Asteraceae	<i>Scorzonera sp.</i>	Greece	Péloponèse	H2	6	4
<i>B. helichrysi</i>	1600	June 2002	Boraginaceae	<i>Myosotis sp.</i>	Greece	Péloponèse	H2	11	10
<i>B. helichrysi</i>	1608	June 2002	Asteraceae	<i>Achillea sp.</i>	Greece	Péloponèse	H2	12	10
<i>B. helichrysi</i>	1684	April 2005	Scrophulariaceae	<i>Veronica sp.</i>	France	Provence-Alpes-Côte d'Azur	H2	12	6
<i>B. helichrysi</i>	1695	April 2005	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	1702	April 2005	Rosaceae	<i>Prunus spinosa</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	5	3
<i>B. helichrysi</i>	1712	April 2005	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Midi-Pyrénées	H1	6	2
<i>B. helichrysi</i>	1716	April 2005	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Midi-Pyrénées	H1	5	2
<i>B. helichrysi</i>	1728	May 2005	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	5	4
<i>B. helichrysi</i>	1749	May 2005	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Frache-Comté	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	1805	October 2005	Goodeniaceae	<i>Goodeniaceae sp.</i>	Australia	Western Australia	H2	6	1
<i>B. helichrysi</i>	1809	October 2005	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	Australia	Western Australia	H2	7	4
<i>B. helichrysi</i>	1828	October 2005	Asteraceae	<i>Asteraceae sp.</i>	Australia	Queensland	H2	6	4
<i>B. helichrysi</i>	1926	April 2006	Asteraceae	<i>Senecio vulgaris</i>	France	Languedoc-Roussillon	H2	6	1
<i>B. helichrysi</i>	1937	May 2006	Rosaceae	<i>Prunus spinosa</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	10	7
<i>B. helichrysi</i>	1939	May 2006	Rosaceae	<i>Prunus spinosa</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	5	5
<i>B. helichrysi</i>	1946	May 2006	Asteraceae	<i>Chrysanthemum sp.</i>	Italy	Sicile	H2	10	6
<i>B. helichrysi</i>	2170	April 2007	Rosaceae	<i>Prunus sp.</i>	Kazakhstan	Almaty	H1	7	6
<i>B. helichrysi</i>	2185	April 2007	Rosaceae	<i>Prunus sp.</i>	Kazakhstan	Almaty	H1	8	3
<i>B. helichrysi</i>	2211	April 2007	Rosaceae	<i>Prunus sp.</i>	Kazakhstan	Almaty	H1	7	5
<i>B. helichrysi</i>	2218	May 2007	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	Kazakhstan	Ongtustik	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2379	April 2007	Myoporaceae	<i>Myoporum sp.</i>	Algeria	Batna Province	H1	-	-
<i>B. helichrysi</i>	2398	December 2007	Asteraceae	<i>Haplopappus sp.</i>	Chile		H2	4	2
<i>B. helichrysi</i>	2406	April 2008	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	4	4
<i>B. helichrysi</i>	2407	April 2008	Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i>	France	Languedoc-Roussillon	H2	11	5
<i>B. helichrysi</i>	2408	May 2008	Boraginaceae	<i>Myosotis sp.</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	10	10
<i>B. helichrysi</i>	2412	May 2008	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	7	7
<i>B. helichrysi</i>	2422	May 2008	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Languedoc-Roussillon	H1	8	6
<i>B. helichrysi</i>	2424	May 2008	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	France	Provence-Alpes-Côte d'Azur	H1	7	7
<i>B. helichrysi</i>	2433	May 2008	Asteraceae	<i>Senecio vulgaris</i>	France	Provence-Alpes-Côte d'Azur	H1	10	5
<i>B. helichrysi</i>	2438	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Poitou-Charentes	H1	5	5
<i>B. helichrysi</i>	2448	May 2008	Asteraceae	<i>Carthamus lanatus</i>	France	Languedoc-Roussillon	H2	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2458	May 2008	Asteraceae	<i>Calendula sp.</i>	France	Languedoc-Roussillon	H2	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2461	May 2008	Asteraceae	<i>Chrysanthemum sp.</i>	France	Languedoc-Roussillon	H2	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2463	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Bourgogne	H1	5	5
<i>B. helichrysi</i>	2464	May 2008	Rosaceae	<i>Prunus insititia</i>	France	Lorraine	H1	7	5
<i>B. helichrysi</i>	2465	May 2008	Rosaceae	<i>Prunus insititia</i>	France	Lorraine	H1	7	7
<i>B. helichrysi</i>	2468	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Centre	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2469	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Lorraine	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2470	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Rhône-Alpes	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2474	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Auvergne	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2475	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Champagne-Ardenne	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2476	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Champagne-Ardenne	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2477	May 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Aquitaine	H1	6	5
<i>B. helichrysi</i>	2487	June 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Pays-de-Loire	H1	5	5
<i>B. helichrysi</i>	2505	June 2008	Asteraceae	<i>Asteraceae sp.</i>	Kazakhstan	Almaty	H1	5	5
<i>B. helichrysi</i>	2523	June 2008	Asteraceae	<i>Asteraceae sp.</i>	Kazakhstan	Almaty	H1	6	5
<i>B. helichrysi</i>	2528	June 2008	Asteraceae	<i>Asteraceae sp.</i>	Kazakhstan	Almaty	H1	6	6
<i>B. helichrysi</i>	2590				Kazakhstan	Almaty	H1	4	4
<i>B. helichrysi</i>	2595	June 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Centre	H1	5	5
<i>B. helichrysi</i>	2597	June 2008	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	France	Centre	H1	5	4
<i>B. helichrysi</i>	2791	September 2009	Asteraceae	<i>Senecio sp.</i>	France	Languedoc-Roussillon	H2	5	1
<i>B. helichrysi</i>	2793	October 2009	Asteraceae	<i>Senecio sp.</i>	France	Languedoc-Roussillon	H2	6	3
<i>B. helichrysi</i>	2794	October 2009	Asteraceae	<i>Senecio sp.</i>	France	Languedoc-Roussillon	H2	10	2
<i>B. helichrysi</i>	EU701532	-	-	<i>Veronica anagallis-aquatica</i>	United States	Washington	H2	-	-
<i>B. helichrysi</i>	EU701533	-	-	-	United States	Washington	H2	-	-
<i>B. helichrysi</i>	EU701534	March 2005	-	-	United States	Hawaii	H2	-	-
<i>B. helichrysi</i>	GU978957	-	-	-	Korea	-	-	-	-
<i>B. helichrysi</i>	GU978792	-	-	-	Korea	-	-	-	-
<i>B. helichrysi</i>	HQ632652	-	-	-	India	-	-	-	-
<i>B. spiraeae</i>	1775	2005	Rosaceae	<i>Spiraea sp.</i>	France	Provence-Alpes-Côte d'Azur			
<i>B. spiraeae</i>	2143	August 2006	Rosaceae	<i>Spiraea salicifolia</i>	United Kingdom	Scotland			
<i>B. spiraeae</i>	2226	May 2007	Rosaceae	<i>Spiraea sp.</i>	Kazakhstan	Ongtustik			
<i>B. spiraeae</i>	2240	May 2008	Rosaceae	<i>Spiraea sp.</i>	Kazakhstan	Almaty			
<i>B. spiraeae</i>	2586	June 2008	Rosaceae	<i>Spiraea hypericifolia</i>	Kazakhstan	Ongtustik			
<i>B. salicinae</i>	307		Asteraceae	<i>Inula salicina</i>	Czech Republic	South Bohemia			

helichrysi nuclear genome (Aph). PCR was carried out with the Aph13 (5'-GATTGAATCAATGTGGGACTGCTTAC-3') and Aph15 (5'-ACTCAGCAACAACGCCAAGAAAAG-3') primers (Carletto *et al.* 2009), in an Eppendorf thermocycler, as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 54°C and 1 min at 72°C, and a final elongation phase at 72°C for 5 min. We specifically designed new primers for samples for which no amplicon was obtained: AphelicF (5'-TGTAATGGGAATAACACTGGAG-3') and AphelicR (5'-TTATAACACTGTAGTAGCTGGT-3'). The PCR conditions used were similar to those described above, except that the annealing temperature was set at 58°C. PCR and sequencing reactions for this nuclear gene were carried out by Macrogen (Korea) and SFR119 'Montpellier Environnement Biodiversité' (Montpellier, France), with the PCR primers. All new sequences were submitted to the Genbank database (accession numbers JQ289405–JQ289452 (COI), JQ289453–JQ289500 (CytB), JQ289501–JQ289549 (sDNA) and JQ289357–JQ289404 (Aph), see Table S1 for details).

Phylogenetic analyses

All chromatograms were inspected, corrected and preliminary alignments were generated with Seqscape v2.5 (Applied Biosystems) software. Alignments were performed with ClustalW via Bioedit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0 software (Hall 1999) and adjusted by eye. After correction, the COI, CytB, sDNA and Aph alignments were 456 bp, 741 bp, 567 bp and 760 bp long, respectively. Mitochondrial gene sequences were checked for protein coding frameshifts, to eliminate pseudogenes (Zhang & Hewitt 1996), with Mega v4.1 (Kumar *et al.* 2004).

We conducted both maximum likelihood (ML) phylogenetic analyses and Bayesian inference (BI) on the aphid DNA and bacterial DNA datasets. Gaps were treated as missing data.

For each gene, for the concatenated matrix of the two mitochondrial genes (COI + Cytb) and for the concatenated matrix of the mitochondrial and nuclear aphid genes (COI + Cytb + Aph), we identified the best model of evolution with ModelTest 3.5 (Posada & Crandall 1998). Then, for the phylogenetic analyses, we used the evolution model available in each software with the best corrected Akaike information criterion (AICc (Akaike 1974)) obtained from ModelTest. For the ML analyses, we chose a GTR+I+G₄ model for the concatenated matrix of aphids DNA fragments (COI+CytB+Aph) and a GTR+I model for the bacterial DNA fragments (sDNA). For the Bayesian analyses, we applied the GTR+I model for the

concatenated matrix of mitochondrial aphid genes (COI+CytB), the HKY85+G₄ model for the nuclear aphid gene (Aph) and, for the bacterial gene (sDNA) we used a GTR+I model.

ML analyses were conducted with Phyml v3.0 software (Guindon *et al.* 2009). The model parameters were estimated directly by the program. Bootstrap values were calculated for 1000 replications, and a bootstrap value >80% was considered to indicate significant support.

For Bayesian inference, analyses were carried out with MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), and data partitions were defined for the aphid DNA dataset: Cytb, COI and Aph.. The parameters of the model were treated as unknown variables with uniform prior probabilities and were estimated during the analysis; they were allowed to vary across partitions. Two replicate analyses were run for 10 million generations for the aphid DNA dataset and 2 million generations for the *B. aphidicola* DNA dataset, to ensure that the runs converged on the appropriate posterior probability distribution. We ran four chains of the Markov Chain Monte Carlo, sampling every 100 generations. The stationary point was then determined (the point at which the distribution of likelihoods reached a plateau) and trees preceding the stationary point were discarded (for all runs, 500 trees were discarded as burn-in samples). The remaining trees were used to calculate 50% majority rule consensus trees. The posterior probabilities (pp) were summarised accordingly. Posterior probabilities > 0.9 were considered to indicate significant support.

Based on the results of the phylogenetic analyses, each of the sampled colonies could be assigned to a genetic group (H1 or H2) (Table 1). For each DNA fragment, we calculated the mean genetic distances (p-distances) between and within H1 and H2 groups, using Mega v4.1.

In view to state more precisely the use of COI sequence for group assignation, we also retrieved COI sequences from Genbank from specimens identified as *B. helichrysi* (see Table 1 for collection details, when available). We conducted Bayesian inference analyses in MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), on the COI dataset including these sequences. We applied the GTR+I model to this dataset, and analyses were conducted as specified above. Posterior probabilities > 0.9 were considered to indicate significant support. We also carried out ML analyses with Phyml software v3.0 (Guindon *et al.* 2009). We used the GTR+I+G₄ evolution model for this COI dataset. Bootstrap values were calculated for 1000 replications. Bootstrap values > 80% were considered to indicate significant support.

The mean genetic distance (p-distances) between Genbank sequences and the sequences

obtained in our study were calculated with Mega v4.1.

DNA extraction and genotyping

For each sampled colony use in the phylogenetic analysis, DNA was extracted individually from five to 10 aphids in 10 % (w/v) Chelex ® 100 resin solution (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) in a 96 wells plate. Briefly, we filled the wells with 8 µl of proteinase K at 20 mg/ml, and then added one aphid in each well, and finally 100 µl of 10 % (w/v) Chelex ® 100 resin solution. The plate was incubated at 55 °C all night long. The next day, the plate was incubated at 95°C for 15 min, 20°C for 15 min and again 95°C for 15 min. The plate was vortexed and then briefly centrifuged in order to collect the Chelex beads at the bottom of the tube. Finally we transferred 100 µl of supernatant to the DNA collection plate. All DNA extracts were stored at – 20°C.

We used 10 pairs of primers previously used by Tayeh *et al.* (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* 2010) to amplify 10 microsatellite loci. We also designed four additional pairs of primers with Primer3 (Rozen & Skaletsky 1999), for the amplification of four new microsatellite markers: Bh-GT3F8, Bh-CT3H5, Bh-GT2E6, Bh-GT3E11, obtained by sequencing a clonal bank of digested *B. helichrysi* DNA. Multiplex PCR kits were optimised with MultiplexManager software (Holleley & Geerts 2009). The forward primers were labelled with VIC, HEX, NED and FAM fluorescent dyes. The 14 microsatellite markers were amplified in four multiplex PCRs (Table S2). These multiplex PCRs were performed in an Eppendorf thermocycler, by initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 35 to 40 cycles of denaturation at 94°C for 30s, hybridisation at 58 to 63°C for 90s and elongation at 72°C for 60s, with a final elongation at 60°C for 30 min (see Table 2 for the number of cycles and annealing temperature). The amplification products were analysed on an ABI capillary sequencer by the SFR119 Montpellier 'Montpellier Environnement Biodiversité' (France). Alleles were scored by length and genotyping was carried out with GENEMAPPER v4.0 (Applied Biosystems), the results then being checked and corrected by eye.

Microsatellite analysis

We retained only individuals with no more than 20% missing data for the analysis. Each individual was assigned to a genetic clade (H1 or H2) corresponding to the identification of its colony, obtained by phylogenetic reconstruction from DNA sequences. For this worldwide study, we estimated genotypic diversity by calculating G/N (number of unique genotypes in one group divided by the

number of unique genotypes per sample in one group), allelic diversity by calculating 1-Qinter (genetic diversity of the individuals within a group), and we searched for diagnostic alleles for each locus with GENEPOP v4.0 (Rousset 2008). We did not extend our population genetics analysis further, because the sampling carried out in this study was not designed for such analyses, we aimed only to obtain an index of worldwide genetic diversity.

We used POPULATIONS v1.2.32 software to generate a matrix of the distances between individuals representing unique multilocus genotypes (MLG) for each colony (i.e. when two individuals from the same colony had the exact same genotype, we retained only one), based on Goldstein's distances (Goldstein *et al.* 1995). We then constructed an unrooted neighbour-joining tree from this matrix.

Results

Phylogenetic relationships within B. helichrysi samples

The ML and BI phylogenetic trees built from the combined analysis of aphid DNA markers with *B. salicinae* as an outgroup were highly congruent. They clearly identified two clusters of *B. helichrysi* samples, hereafter referred to as the H1 and H2 lineages. The existence of these two clades was supported by very high bootstrap and posterior probability values (Fig. 1A). Very little sequence variation was observed within each group and phylogenetic analyses of these DNA data revealed no clustering based on the geographic proximity of samples.

The ML and BI phylogenetic trees built from data for the *B. aphidicola* DNA marker, with *B. salicinae* as the outgroup and *B. spiraeae* as a sister group, also revealed the existence of H1 and H2 lineages, with a high degree of confidence (Fig. 1B). Again, there was very little sequence variation within each lineage and no phylogenetic clustering as a function of the geographic proximity of specimens, except for the samples from Kazakhstan. The Kazakh cluster was supported by a bootstrap value of 61 % for all Kazakh samples, and of 79.3 % (posterior probability of 0.7) for all Kazakh samples except 2528 (Fig. 1B)).

Samples assigned to the H1 lineage were associated with *Prunus* spp. and various herbaceous hosts, whereas those assigned to the other clade (H2) were found only in association with herbaceous plants from the known secondary host plant range of *B. helichrysi* (mostly from the Asteraceae and Boraginaceae) (Table 1). H1 and H2 had many herbaceous host plant species in common, and our phylogenetic reconstructions (Fig. 1A-B, Table 1) provided no evidence of

genetic clustering according to host plant association within H1 or H2.

The topology of the bacterial phylogenetic tree differed from that of the aphid tree. According to the topology of the aphid tree, *B. helichrysi* H1 was a sister group to *B. helichrysi* H2, with *B. spiraeae* as an outgroup. By contrast, the topology of the *B. aphidicola* phylogenetic tree suggested that *B. helichrysi* H1 was a sister clade to *B. spiraeae* and that *B. helichrysi* H2 was an outgroup (Fig. 1A versus Fig. 1B). Due to this discrepancy between aphid DNA analyses and *B. aphidicola* DNA analyses, we did not analyse the four molecular markers in a combined analysis. The assignment of the sampled colonies to the H1 and H2 clusters was, in any case, 100% congruent for all the molecular markers used.

The four genes studied displayed a high degree of intergroup differentiation: the p-distances between *B. helichrysi* groups H1 and H2 and *B. spiraeae* was about 0.02 (Table 2). By contrast, there was very little variation within each group (Table 2).

The BI phylogenetic tree inferred from the COI dataset including *B. helichrysi* COI sequences available from Genbank had the same topology as the phylogenetic reconstruction based on aphid genes (Fig. 2 and Fig. 1A). It clearly placed the COI sequence from the USA (EU701532, EU701533, EU701534) within the H2 COI sequences with a high posterior probability. The Korean COI sequences (GU978957, GU978792) clustered together with high confidence, and they clustered with the Indian COI sequence (HQ632652). These Korean and Indian specimens seemed to branch with the *B. helichrysi* H2 group. The ML phylogenetic tree built from this COI dataset gave a slightly different topology from the BI tree and the phylogenetic trees constructed with the aphid markers studied here (Fig. 2, versus Fig. 1A), suggesting that *B. helichrysi* H1 is a sister group to *B. spiraeae*. However, the support for all these nodes was very weak and the ML phylogenetic reconstruction tended to create polytomies. The USA COI sequence clearly branched within the H2 group, whereas the Korean and Indian sequences branched out of the *B. helichrysi* – *B. spiraeae* cluster. However, these Asian nodes were, again, not well supported. The relationship between *B. helichrysi* H1, *B. helichrysi* H2 and *B. spiraeae* and the additional Korean and Indian sequences thus remained unresolved in the ML reconstruction. Nevertheless, the introduction of the Genbank COI dataset did not call into question the existence of the two clades, H1 and H2 (Fig 2).

For studies of genetic divergence, we created three groups within the COI sequences available from Genbank. There was very little variation within each group (Table S3). The COI

sequences from the USA differed very little from those of the H2 group (Table S3), as shown by the phylogenetic tree. Interestingly, the Korean and Indian sequences displayed higher levels of variation when compared to any of the other groups, and there was a p-distance of about 1% between these two groups (Table S3). These COI sequences had mutations in common with *B. salicinae*, *B. spiraeae*, *B. helichrysi* H1 and H2, and each had one specific mutation (one for the Indian sequence and one for both Korean sequences).

Genetic relatedness and diversity of multilocus genotypes

All 14 microsatellite markers were polymorphic and the total number of alleles per locus ranged from three to 30 (Table S2).

The numbers of genotypes with less than 20% missing data were 211 for H1 and 83 for H2. Worldwide genotypic diversity was higher in the H1 group ($G/N=210/211=0.99$) than in the H2 group ($G/N=71/83=0.85$). Worldwide allelic diversity was a little higher in the H1 group ($1-Qinter=0.7158$) than in H2 group ($1-Qinter=0.6709$).

A study of the alleles for each locus identified no potential diagnostic alleles, with the possible exceptions of: 1) allele 330 of Bh-CT4B9, for which $f_{330}=0$ in the H1 group and $f_{330}=0.083$ in the H2 group; 2) allele 137 of Bh-GT3E11, for which $f_{137}=0.097$ in the H1 group and $f_{137}=0$ in the H2 group and 3) allele 76 of Bh-GT2E6, for which $f_{76}=0$ in the H1 group and $f_{76}=0.098$ in the H2 group. However, these are cases in which a higher frequency of a particular allele in one group is associated with the absence of the allele concerned from the other group. Given the large number of alleles per locus (Table S2) and the low frequencies of the minority alleles, it would be risky to consider these alleles to be “characteristic”. At this point in our investigations, we cannot exclude missing alleles, due to the chance nature of sampling.

The neighbour-joining tree based on Goldstein’s distance between multilocus genotypes also provided evidence for the existence of the two clusters: H1 and H2. The H1 multilocus genotypes seemed to be more closely related, but also more diverse. In the H1 cluster, the multilocus genotypes were linked by short branches and our reconstructions showed many polytomies. By contrast, H2 multilocus genotypes appeared to be less diverse, but more divergent: the multilocus genotypes in the H2 part of the tree were linked by longer branches and there were several clusters, indicating the existence of redundant multilocus genotypes among *B. helichrysi* H2 colonies (Fig. 3). Again, we observed no clustering according to host plant or geography.

Fig. 1

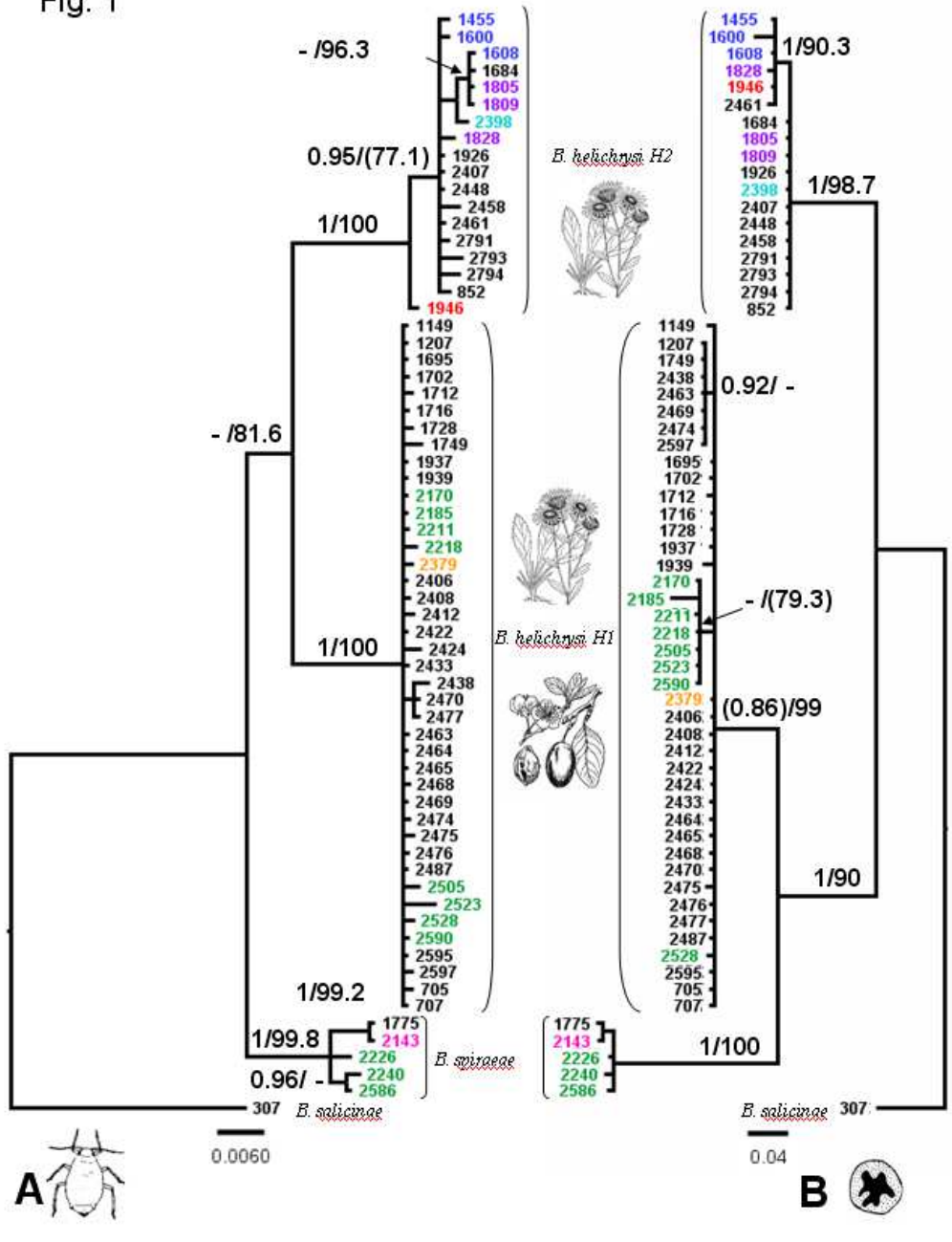


Figure 1. *Brachycaudus helichrysi* and associated *Buchnera aphidicola* phylogenies (Bayesian Inference (BI) topology and branch length). The phylogenetic reconstruction of (A) *Brachycaudus* is based on analysis of the combined dataset (CytB, COI and Aph). The phylogenetic reconstruction of (B) *Buchnera aphidicola* is based on one molecular marker (sDNA). For both trees, values above branches indicate Bayesian posterior probability (pp) / ML bootstrap % values. Posterior probability support values > 0.9 and bootstrap values > 80% are indicated. Outgroup: *B. salicinae*. The host plants on which the colonies were found are indicated as *Prunus* (primary host) or herbaceous (secondary hosts). Colours indicate the country of sampling: dark blue, Greece; light blue, Chile; violet, Australia; red, Italy; green, Kazakhstan; orange, Algeria; pink, United Kingdom; black, France.

Table 2. P-distances within and between groups for each gene. The p-distances are given with their standard error. N: number of sequences used.

	Gene	N	B. helichrysi H1	B. helichrysi H2	B. spiraeae	B. salicinae
B. helichrysi H1	COI	41	0.001 ± 0.001			
	CytB	41	0 ± 0			
	Aph	39	0.004 ± 0.001			
	sDNA	41	0.004 ± 0.001			
B. helichrysi H2	COI	18	0.027 ± 0.007	0.001 ± 0.001		
	CytB	18	0.016 ± 0.005	0 ± 0		
	Aph	16	0.02 ± 0.005	0.004 ± 0.001		
	sDNA	18	0.057 ± 0.010	0.004 ± 0.002		
B. spiraeae	COI	5	0.019 ± 0.006	0.018 ± 0.006	0.001 ± 0.001	
	CytB	5	0.018 ± 0.005	0.021 ± 0.005	0 ± 0	
	Aph	5	0.02 ± 0.005	0.019 ± 0.004	0.006 ± 0.002	
	sDNA	5	0.041 ± 0.009	0.056 ± 0.010	0.002 ± 0.002	
B. salicinae	COI	1	0.037 ± 0.008	0.033 ± 0.008	0.023 ± 0.007	-
	CytB	1	0.035 ± 0.006	0.038 ± 0.007	0.032 ± 0.006	-
	Aph	1	0.044 ± 0.008	0.046 ± 0.008	0.041 ± 0.007	-
	sDNA	1	0.066 ± 0.012	0.051 ± 0.009	0.058 ± 0.011	-

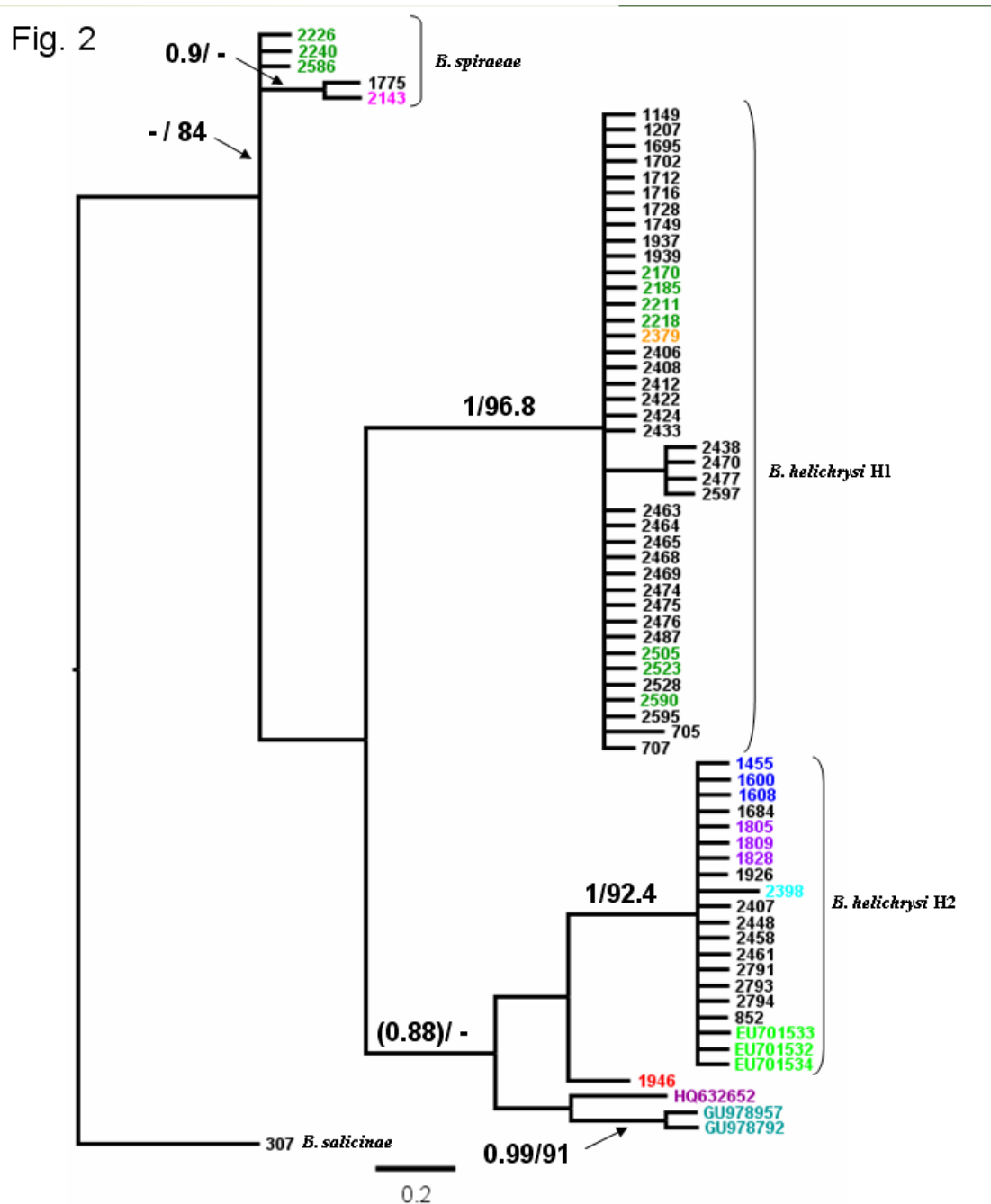


Figure 2. *Brachycaudus helichrysi* phylogenetic tree (BI topology and branch length) based on the COI dataset, including Genbank COI sequences. Values above branches are Bayesian posterior probability (pp) / ML bootstrap % values. Posterior probability support values > 0.9 and bootstrap values > 80% are indicated. Outgroup: *B. salicinae*. Genbank COI sequences are: EU701532, EU701533 and EU701534 (USA) ; GU978957 and GU978792 (Korea) ; HQ632652 (India).

The NJ tree showed that some sampled colonies were actually a mix of individuals belonging to H1 and others to H2 (for five colonies / all: 2408, 2433, 1600, 1608, 1946) (Fig. 3). This is consistent with the occurrence of H1 and H2 together on the same plants. Colonies including aphids from both lineages occurred only on herbaceous host plants.

Discussion

Our phylogenetic reconstructions clearly demonstrate the existence of two clades within the aphid pest species *B. helichrysi*. We named these two clades *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2. The genetic divergence between these two clades was sustained by mitochondrial, bacterial and nuclear markers (DNA sequence and microsatellites). This study also revealed the existence of some incongruence between the evolutionary histories of the genes of the aphid and the bacterial DNA fragment used here.

Does Brachycaudus helichrysi encompass two different species?

Based on the DNA sequences of mitochondrial, bacterial and nuclear markers used in this study, there was a very high level of divergence between H1 and H2. The degree of divergence, as assessed by the p-distances between H1 and H2, was similar to that between the sister species *B. helichrysi* and *B. spiraeae* (Table 2) and between other species of the genus *Brachycaudus* (Coeur d'acier *et al.* 2008). Microsatellite data analyses, which are based on many molecular markers scattered throughout the nuclear genome of the aphid, also provided support for the existence of two strongly differentiated lineages. As our samples were collected on various host plants (Asteraceae, Boraginaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Goodeniaceae, Myoporaceae), in different countries (France, Italy, Greece, Algeria, Kazakhstan, Chile, Australia) over a period of 14 years (1995 to 2009), this genetic differentiation is unlikely to be due principally to environmental effects. Our findings suggest that the two clades may actually correspond to two different species. According to our analyses of the *B. helichrysi* COI sequences available from barcoding studies, H2 is also present in the USA (Genbank accession numbers EU701532, EU701533, EU701534) and, possibly, in Korea (GU978957, GU978792) and India (HQ632652). However, the phylogenetic position of these Asian specimens identified as *B. helichrysi* remains unclear (the BI reconstruction based on COI sequences indicated that they were closely related to H2, whereas ML reconstructions remain unresolved) and they share mutations with both *B.*

helichrysi groups, *B. spiraeae* and *B. salicinae*. In their barcoding study on Korean aphids, Lee *et al.* (2011) showed that the intraspecific genetic distance within *B. helichrysi* samples was greater than that in most aphid species (Table 3 in Lee *et al.* (2011)), although they did not comment extensively on this result in their discussion. We can not exclude the possibility that these Korean and Indian specimens belong to an other sister species, in this case *B. helichrysi* will be a species complex undescribed yet. The sequencing of additional markers from more *B. helichrysi* samples from these parts of the world will be required for the precise identification of these samples. Our results demonstrate that the three aphid DNA markers used are potentially efficient tools for investigating these samples and determining the genetic group to which an individual of *B. helichrysi* actually belongs.

The evolution of the *ssb-dnaB* intergenic spacer portion of the DNA of the primary symbiotic bacterium, *B. aphidicola*, did not follow that of the aphid DNA. The phylogenetic tree based on bacterial DNA findings places *B. spiraeae* as a sister group to *B. helichrysi* H1, and *B. helichrysi* H2 as an external group (Fig. 1A versus Fig. 1B). In addition, the genetic divergence of the sDNA gene fragment was lower between *B. spiraeae* and *B. helichrysi* H1 than between *B. spiraeae* and *B. helichrysi* H2 (Table 2). These observations confirm the findings of an earlier study investigating cospeciation between the aphids of the *Brachycaudus* genus and their primary symbiont, *B. aphidicola* (Jousselin *et al.* 2009). *Buchnera aphidicola* has been shown to be exclusively maternally (vertically) inherited (Wilkinson *et al.* 2003), and phylogenetic reconstructions based on *Buchnera* DNA markers should therefore be congruent with phylogenetic analyses based on aphid mitochondrial DNA (Funk *et al.* 2000). Our results are thus surprising. There are several possible explanations for our results. Firstly, the bacterial marker we used is an intron and would therefore be more likely to undergo mutations than the coding regions of the mitochondrial markers. It might also evolve more rapidly than host nuclear introns. As suggested by van Ham *et al.* (2003), the evolution of the *Buchnera* genome is degenerative, with the reduction of repair systems and replication machinery, in particular. It is thus possible that the mutations accumulating in *B. spiraeae* DNA sequences have converged by chance with those observed in *B. helichrysi* H1 sequences rather than with those in *B. helichrysi* H2 sequences.

Fig. 3

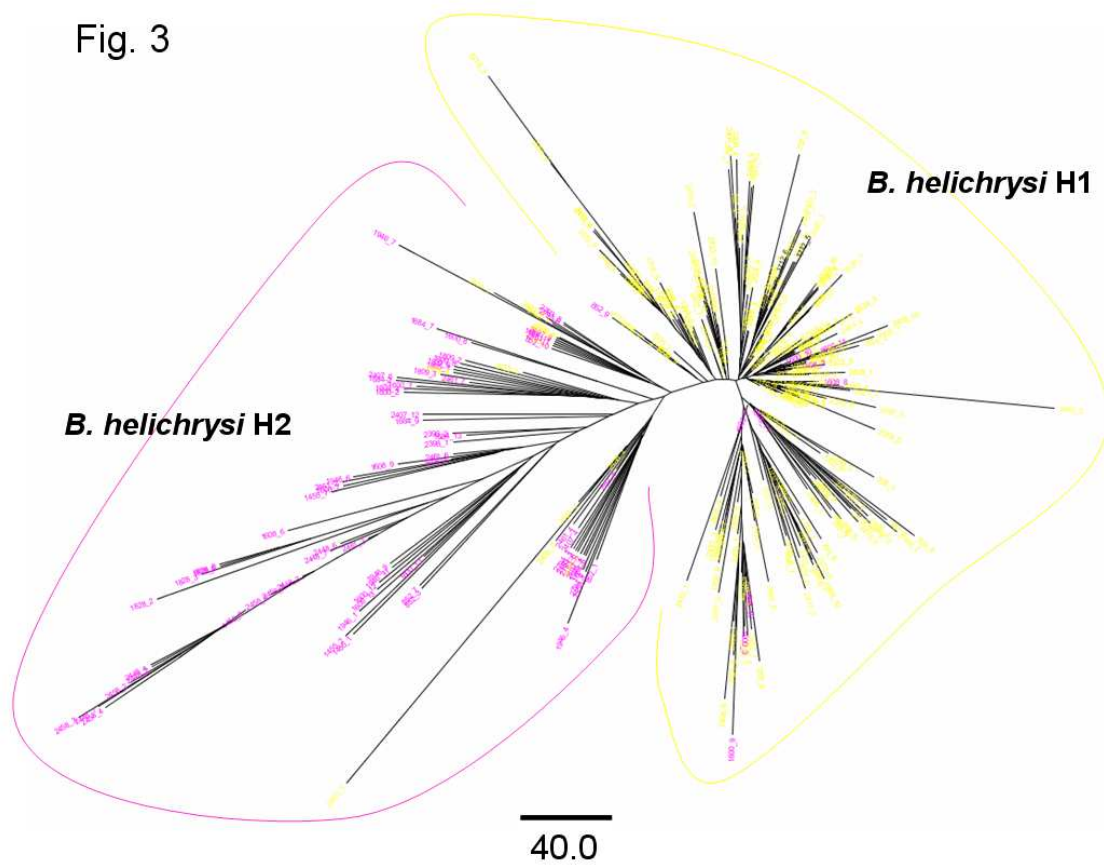


Figure 3. Unrooted neighbour-joining tree based on Goldstein's distance for 14 microsatellite markers. In yellow: *B. helichrysi* H1 clade; in pink: *B. helichrysi* H2 clade.

Alternatively, if the ancestral polymorphism occurred in the bacterial genome before speciation between *B. spiraeae* and *B. helichrysi*, incomplete lineage sorting may have led to a lack of congruence between the trees obtained (Pamilo & Nei 1988; Wu 1991; Rosenberg 2002; Maddison & Knowles 2006; Pollard *et al.* 2006): the same copy of *ssb-dnaB* intergenic spacer may have been conserved in *B. spiraeae* and *B. helichrysi* H1, whereas another copy has been conserved in *B. helichrysi* H2. It is also possible that extended periods of gene flow occurred during speciation, increasing lineage sorting effects due to the occurrence of a high level of genetic drift (Rannala & Michalakis 2003). The most surprising possible explanation would be a *B. aphidicola* host shift between *B. helichrysi* H2 and *B. spiraeae*. The horizontal transfer of *Buchnera* has never been demonstrated (Funk *et al.* 2000), but it has been suggested that such a transfer could occur through parasitoid attack, for instance (Vavre *et al.* 1999; Clark *et al.* 2000). We will need to study additional molecular markers from the *B. aphidicola* genome, including coding regions, and to compare the topologies obtained, to test these various hypotheses. This incongruence must, in any case, be investigated further before the hypothesis of horizontal transfer of *B. aphidicola* can be proposed.

Life cycle differences between the two lineages

All the colonies collected on plum trees belonged to *B. helichrysi* H1, whereas H2 colonies were found only on herbaceous plants. This suggests that H1 and H2 have different life cycles. *Brachycaudus helichrysi* H1 aphids are clearly heteroecious, as classically described for *B. helichrysi* (with *Prunus* sp. as the primary host and various herbaceous plants as secondary hosts) (Bennett 1955; Blackman & Eastop 2000). By contrast, the life cycle and mode of reproduction of *B. helichrysi* H2 are more debatable. *Brachycaudus helichrysi* H2 aphids may be monoecious on herbaceous plants and/or anholocyclic, remaining on the secondary host plants of *B. helichrysi*. H2 was found mostly in regions in which anholocycly is possible (the Mediterranean area, Chile, Australia, west coast of the USA). Furthermore, microsatellite data showed that H2 genotypes were less diverse than H1 genotypes. Both observations are consistent with the hypothesis that H2 may be an anholocyclic lineage. The possible existence of derived anholocyclic lineages within *B. helichrysi* has been documented (Heie 1991), but our results are not consistent with this suggestion: the microsatellite data showed a high degree of differentiation between H1 and H2 genotypes, suggesting that there may be one differentiated worldwide lineage rather than several anholocyclic

lineages derived from the holocyclic lineages that commonly occur in many aphid species in mild climatic conditions. Alternatively, H2 may alternate between hosts, but we may have failed to sample it on its primary host plants. However, this is unlikely, because we sampled *B. helichrysi* H2 very early in the season (March-April) and late in the season (October), on herbaceous plants. Furthermore, we carried out extensive sampling on various *Prunus* species and *Spiraeae* species (the primary hosts of closely related *Brachycaudus* species (Jousselin *et al.* 2010)) in different parts of the world and found no *B. helichrysi* H2 on these plants. This strongly suggests that *B. helichrysi* H2 occurs only on herbaceous host plants.

More thorough analyses of microsatellite data for a larger sample will be required before any firm conclusions can be drawn concerning the mode of reproduction (Halkett *et al.* 2005) of H2. In addition, field observations and experiments to induce sexuality in controlled conditions should help to unravel the life cycle of H2 and to determine whether it is monoecious or purely anholocyclic.

The hypothesis that *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 have different life cycle could be extended to the possibility that these two taxa are actually two species. Indeed, whether *B. helichrysi* H2 is monoecious on herbaceous plants or anholocyclic, *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 can not inbreed: the monoecy on herbaceous for H2 implies that H1 and H2 do not share the same host-plant during the period of sexual reproduction, and the anholocycly by definition exclude the possibility of sexual reproduction. There cannot, therefore, be any gene flow between these two groups. So, the ecological differences between H1 and H2 involve the loss of the primary tree host for *B. helichrysi* H2 group or the gain of the primary host for *B. helichrysi* H1. It would be interesting to determine whether this loss or gain is one of the drivers of the speciation process. Indeed, the phylogenetic history of the *Brachycaudus* genus has revealed many transitions in life cycles that have been identified as drivers of speciation events in this genus (Jousselin *et al.* 2010).

Conclusion

We have demonstrated the existence of two closely related taxa, hereafter referred to as *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2, among specimens described as *B. helichrysi*. This observation is based on mitochondrial, bacterial and nuclear DNA sequences and on 14 microsatellite markers. These two clades are strongly differentiated. To firmly conclude that *B. helichrysi* H1 and H2 are two distinct species, we lack a taxonomic description based on diagnostic morphologic characters. Our findings suggest that

the distribution ranges of *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 overlap considerably, but that H2 has a different life cycle, being associated exclusively with herbaceous host plants. Further investigations are required to determine whether this taxon is monoecious or purely anholocyclic. Interestingly, our study also reveals incongruence between the phylogenies obtained on the basis of data for aphid and bacterial genes, which will need to be investigated further before we can suggest a host shift in the evolutionary history of *B. aphidicola*. As a crop pest, particularly on sunflower fields and plum orchards, and as a vector of the plum pox virus, *B. helichrysi* is of ecological and economic importance. The aphid life cycle plays a key role in crop invasion success (Mondor *et al.* 2006; Harrison & Mondor 2011; Lebouvier *et al.* 2011) and plant virus epidemiology. It also determines in which crop the aphid is present at a given time, and which selective pressures this aphid will encounter. Orchards and crop fields are not submitted to the same insecticides, further, control practices can differ between countries or economic region (Peck & Ellner 1997; Holb *et al.* 2010; Ai *et al.* 2011). These differences necessarily have consequences on the population dynamics of these species as well as the evolution of resistance mechanisms. A greater understanding of the biology (the life cycle, in particular) and of the host plant ranges and geographic distributions of the two clades may therefore be very important for crop pest management (Hendry *et al.* 2011). To date, as H1 and H2 appeared morphologically indistinguishable when found on herbaceous hosts and as we have proven that they occurred in sympatry, it highlights that tools of rapid identification (molecular and/or morphological) are necessary too.

Acknowledgement

This work was funded by an ANR JCJC-05 (*Brachycaudus*) grant to EJ and AC, the SPE Department of INRA (“SDIPS project”) and a PhD grant to J. Piffaretti from INRA-SPE and the Languedoc Roussillon region. The data used here were generated in part by molecular analyses at the technical facilities of SFR119 ‘Montpellier Environnement Biodiversité’. We thank the CETIOM’s people for providing us a lot of *B. helichrysi* samples and Gwenaëlle Genson for the lab support.

References

Ai, T.-C., Liu, Z.-Y., Li, C.-R., Luo, P., Zhu, J.-Q., Jin, W.-B., & Cai, Q.-N. (2011). Impact of fertilization on cotton aphid population in Bt-cotton production system. *Ecological*

- Complexity*, 8(1), 9-14. doi:10.1016/j.ecocom.2010.08.002
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716-723. doi:10.1109/TAC.1974.1100705
- Arora, R., Gupta, R., & Bali, K. (2009). Population dynamics of the leaf curl aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) and its natural enemies on subtropical peach, *Prunus persica* cv. Flordasun. *Journal of Entomology and Nematology*, 1(3), 036–042.
- Badenhausser, I., & Lerin, J. (1998). Comparison of population dynamics of *Brachycaudus helichrysi* and damage symptoms in four sunflower cultivars. *Aphids in natural and managed ecosystems. Proceedings of the Fifth International Symposium on Aphids, Leon, Spain, 15-19 September, 1997.* (p. 513-518). Leon Spain: Universidad de Leon Secretariado de Publicaciones.
- Bell, A. C. (1983). The life-history of the leaf-curling plum aphid *Brachycaudus helichrysi* in Northern Ireland and its ability to transmit potato virus Yc(AB). *Annals of Applied Biology*, 102(1). Consulté de http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=CABI&search_mode=GeneralSearch&qid=2&SID=X2P8@IbdhAeCo9lfbBI&page=5&doc=47
- Bennett, S. H. (1955). The biology, life history and methods of control of the leaf curling plum aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt). *J. Hortic. Sci*, 30, 252–259.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., et al. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148-155. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004
- Blackman, Roger L., & Eastop, V. F. (2000). *Aphids on the world's crops: an identification and information guide* (2^e éd.). John Wiley & Sons Ltd., England.
- Braendle, C., Davis, G. K., Brisson, J. A., & Stern, D. L. (2006). Wing dimorphism in aphids. *Heredity*, 97(3), 192-199.
- Brisson, Jennifer A. (2010). Aphid wing dimorphisms: linking environmental and genetic control of trait variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1540), 605-616. doi:10.1098/rstb.2009.0255
- Carletto, J., Blin, A., & Vanlerberghe-Masutti, F. (2009). DNA-based discrimination between the sibling species *Aphis gossypii* Glover and *Aphis frangulae* Kaltenbach. *Systematic Entomology*, 34(2), 307-314. doi:10.1111/j.1365-3113.2008.00458.x

- Carletto, J., Lombaert, E., Chavigny, P., Brévault, T., Lapchin, L., & Vanlerberghe-Masutti, F. (2009). Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Molecular Ecology*, *18*(10), 2198-2212. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04190.x
- Clark, M. A., Moran, N. A., Baumann, P., & Wernegreen, J. J. (2000). Cospeciation between Bacterial Endosymbionts (*Buchnera*) and a Recent Radiation of Aphids (*Uroleucon*) and Pitfalls of Testing for Phylogenetic Congruence. *Evolution*, *54*(2), 517-525.
- Coeur d'acier, A., Cocuzza, G., Jouselin, E., Cavalieri, V., & Barbagallo, S. (2008). Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Zoologica Scripta*, *37*(2), 175-193. doi:10.1111/j.1463-6409.2007.00317.x
- Emden, H. F. V., & Harrington, R. (2007). *Aphids as crop pests / edited by Helmut F. van Emden and Richard Harrington*. CABI.
- Footitt, R. G., Maw, H. E. L., Havill, N. P., Ahern, R. G., & Montgomery, M. E. (2009). DNA barcodes to identify species and explore diversity in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera: Aphidoidea). *Molecular Ecology Resources*, *9*, 188-195. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02644.x
- Footitt, R. G., Maw, H. E. L., von Dohlen, C. D., & Hebert, P. D. N. (2008). Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, *8*(6), 1189-1201. doi:10.1111/j.1755-0998.2008.02297.x
- Funk, D. J., Helbling, L., Wernegreen, J. J., & Moran, N. A. (2000). Intraspecific Phylogenetic Congruence among Multiple Symbiont Genomes. *Proceedings: Biological Sciences*, *267*(1461), 2517-2521.
- Goldstein, DB, Linares, AR, Cavallisforza, LL, & Feldman, MW. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *GENETICS*, *139*, 463-471.
- Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J.-F., & Gascuel, O. (2009). Estimating Maximum Likelihood Phylogenies with PhyML. Dans David Posada (Éd.), *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis* (Vol. 537, p. 113-137). Totowa, NJ: Humana Press. Consulté de <http://hal.archives-ouvertes.fr/lirmm-00511830/>
- Gupta, P. R., & Thakur, J. R. (1993). Sexual generation and overwintering of the peach leaf curling aphid *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) in Himachal Pradesh, India. *Annals of Applied Biology*, *122*(2). Consulté de http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=CABI&search_mode=GeneralSearch&qid=2&SID=X2P8@IbdhAeCo9lfbBI&page=4&doc=40
- Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. N. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(4), 968-971. doi:10.1073/pnas.0510466103
- Halkett, F., Plantegenest, M., Prunier-Leterme, N., Mieuze, L., Delmotte, F., & Simon, J. C. (2005). Admixed sexual and facultatively asexual aphid lineages at mating sites. *Molecular Ecology*, *14*(1), 325-336. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02358.x
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, p. 95-98).
- Harrison, J. S., & Mondor, E. B. (2011). Evidence for an Invasive Aphid « Superclone »: Extremely Low Genetic Diversity in Oleander Aphid (*Aphis nerii*) Populations in the Southern United States. *PLoS ONE*, *6*(3), e17524. doi:10.1371/journal.pone.0017524
- Harry, M., Solignac, M., & Lachaise, D. (1998). Molecular Evidence for Parallel Evolution of Adaptive Syndromes in Fig-Breeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *9*(3), 542-551. doi:10.1016/j.mpev.1998.0508
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(41), 14812-14817. doi:10.1073/pnas.0406166101
- Heie, O. E. (1991). *The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark: Family Aphididae, part 1-2 of tribe Macrosiphini of subfamily Aphidinae (2 v.)*. BRILL.
- Hendry, A. P., Kinnison, M. T., Heino, M., Day, T., Smith, T. B., Fitt, G., Bergstrom, C. T., et al. (2011). Evolutionary principles and their practical application. *Evolutionary Applications*, *4*(2), 159-183. doi:10.1111/j.1752-4571.2010.00165.x
- Holb, I. J., Fodor, B., Lakatos, P., Abonyi, F., Balla, B., Fazekas, M., & Gall, J. M. (2010). Effect of production system and pruning on *Aphis sambuci* dynamics over time and on elderberry yield. *Journal of Applied Entomology*, *134*(8), 615-625. doi:10.1111/j.1439-0418.2010.01511.x
- Holleley, C. E., & Geerts, P. G. (2009). Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer

- program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques*, 46(7), 511-517.
- Jermiin, L. S., & Crozier, R. H. (1994). The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution*, 38(3), 282-294.
- Jousselin, E., Desdevises, Y., & Coeur d'acier, A. (2009). Fine-scale cospeciation between *Brachycaudus* and *Buchnera aphidicola*: bacterial genome helps define species and evolutionary relationships in aphids. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 276(1654), 187-196. doi:10.1098/rspb.2008.0679
- Jousselin, E., Genson, G., & Coeur d'acier, A. (2010). Evolutionary lability of a complex life cycle in the aphid genus *Brachycaudus*. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 295. doi:10.1186/1471-2148-10-295
- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2), 150-163. doi:10.1093/bib/5.2.150
- Lambers, D. H. R. (1966). Polymorphism in Aphididae. *Annual Review of Entomology*, 11, 47-78.
- Lebouvier, M., Laparie, M., Hullé, M., Marais, A., Cozic, Y., Lalouette, L., Vernon, P., et al. (2011). The significance of the sub-Antarctic Kerguelen Islands for the assessment of the vulnerability of native communities to climate change, alien insect invasions and plant viruses. *Biological Invasions*, 13(5), 1195-1208. doi:10.1007/s10530-011-9946-5
- Lee, W., Kim, H., Lim, J., Choi, H., Kim, Y., Kim, Y., Ji, J., et al. (2011). Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: updating the global data set. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 32-37. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02877.x
- Lerin J, & Badenhausser I. (1995). Influence of the leaf curling plum aphid (*Brachycaudus helichrysi*) on stem diameter, seed yield, and their relationship, in sunflower. *JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE*, 125, 211-221.
- Levy, L., Damsteegt, V., Scorza, R., & Kolber, M. (2000). Plum Pox Potyvirus Disease of Stone Fruits. *APSnet Feature Articles*. doi:10.1094/APSnetFeature-2000-0300
- Maddison, W. P., & Knowles, L. L. (2006). Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. *Systematic Biology*, 55(1), 21-30. doi:10.1080/10635150500354928
- Madsen, H. F., & Bailey, B. J. (1958). Biology and Control of the Leaf Curl Plum Aphid in Northern California. *Journal of Economic Entomology*, 51, 226-229.
- Margaritopoulos, J. T., Tsitsipis, J. A., Zintzaras, E., & Blackman, R. L. (2000). Host-Related Morphological Variation of *Myzus Persicae* (Hemiptera: Aphididae) Populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research*, 90(03), 233-244. doi:10.1017/S0007485300000353
- Margaritopoulos, J. T., Tsurapas, C., Tzortzi, M., Kanavaki, O. M., & Tsitsipis, J. A. (2005). Host selection by winged colonisers within the *Myzus persicae* group: a contribution towards understanding host specialisation. *Ecological Entomology*, 30(4), 406-418. doi:10.1111/j.0307-6946.2005.00700.x
- Miller, G. L., & Foottit, R. G. (2009). The taxonomy of crop pests: The aphids. *Insect biodiversity: science and society*. John Wiley and Sons.
- Miller, G. L., & Stoetzel, M. B. (1997). Aphids Associated with Chrysanthemums in the United States. *The Florida Entomologist*, 80(2), 218-239. doi:10.2307/3495555
- Minks, A. K., & Harrewijn, P. (1987). *Aphids: their biology, natural enemies, and control*. Elsevier.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Anderson, C. M., Aparicio, G. J., Atangana, A. R., Beaulieu, J., Bruford, M. W., Cain, F., et al. (2010). Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 December 2009-31 January 2010. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 576-579. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02851.x
- Mondor, E. B., Tremblay, M. N., & Messing, R. H. (2006). Morphological and ecological traits promoting aphid colonization of the Hawaiian Islands. *Biological Invasions*, 9(1), 87-100. doi:10.1007/s10530-006-9010-z
- Nevo, E., & Coll, M. (2001). Effect of Nitrogen Fertilization on *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae): Variation in Size, Color, and Reproduction. *Journal of Economic Entomology*, 94(1), 27-32. doi:10.1603/0022-0493-94.1.27
- Pamilo, P., & Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5(5), 568-583.
- Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M., & Simon, J.-C. (2009). A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7495-7500. doi:10.1073/pnas.081117106
- Peccoud, Jean, & Simon, Jean-Christophe. (2010). The pea aphid complex as a model of ecological speciation. *Ecological Entomology*, 35, 119-130. doi:10.1111/j.1365-2311.2009.01147.x
- Peck, S., & Ellner, S. (1997). The effect of economic thresholds and life-history

- parameters on the evolution of pesticide resistance in a regional setting. *American Naturalist*, 149(1), 43-63. doi:10.1086/285978
- Pollard, D. A., Iyer, V. N., Moses, A. M., & Eisen, M. B. (2006). Widespread Discordance of Gene Trees with Species Tree in *Drosophila*: Evidence for Incomplete Lineage Sorting. *PLoS Genet*, 2(10), e173. doi:10.1371/journal.pgen.0020173
- Posada, D., & Crandall, K. A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9), 817-818. doi:10.1093/bioinformatics/14.9.817
- Ramakers, P. M. J., & Maaswinkel, R. H. M. (2002). Pest occurrence and control in organic year-round production of chrysanthemums. *Bulletin OILB/SROP* (Vol. 25, p. 221-224). Présenté à Proceedings of the joint IOBC/WPRS Working Group «Integrated Control in Protected Crops, Temperate Climate» and IOBC/NRS «Greenhouse, Nursery, & Ornamental Landscape IPM Working Group», Victoria (British Columbia), Canada, 6-9 May 2002.: International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP), Dijon, France.
- Rannala, B., & Michalakis, Y. (2003). Population genetics and cospeciation: from process to pattern. *Tangled trees: phylogeny, cospeciation, and coevolution* (University of Chicago Press.). Roderic D. M. Page.
- Remaudière, G., & Remaudière, M. (1997). *Catalogue des Aphididae du monde*. Editions Quae.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 19(12), 1572-1574.
- Rosenberg, N. A. (2002). The probability of topological concordance of gene trees and species trees. *Theoretical Population Biology*, 61(2), 225-247. doi:10.1006/tpbi.2001.1568
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete reimplementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103-106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols* (Vol. 132, p. 365-386). New Jersey: Humana Press. Consulté de <http://www.springerlink.com/content/u16755q84278vh5w/#section=94777&page=1>
- Ruiz-Montoya, L., Núñez-Farfán, J., & Domínguez, C. A. (2005). Changes in morphological traits of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) associated with the use of different host plants. *Ecological Research*, 20(5), 591-598. doi:10.1007/s11284-005-0076-3
- Sheffield, C. S., Hebert, P. D. N., Kevan, P. G., & Packer, L. (2009). DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9, 196-207. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02645.x
- Smith, M. A., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., Deans, A. R., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. N. (2008). Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *PNAS*, 105(34), 12359-12364. doi:10.1073/pnas.0805319105
- van Ham, R. C. H. J., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., Fernández, J. M., et al. (2003). Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 581-586. doi:10.1073/pnas.0235981100
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P., & Boulétreau, M. (1999). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1711-1723.
- Verma, K. L., & Singh, M. (1990). Biology of peach leaf curl aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomology (New Delhi)*, 31(2).
- Via, S., Bouck, A. C., & Skillman, S. (2000). Reproductive Isolation between Divergent Races of Pea Aphids on Two Hosts. II. Selection against Migrants and Hybrids in the Parental Environments. *Evolution*, 54(5), 1626-1637.
- Wardlaw, L. R., & Gould, H. J. (1981). Chrysanthemum pests under glass and their control. *Booklet, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*, (2360), ii + 14 pp.
- Wilkinson, T. L., Fukatsu, T., & Ishikawa, H. (2003). Transmission of symbiotic bacteria *Buchnera* to parthenogenetic embryos in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphidoidea). *Arthropod Structure & Development*, 32(2-3), 241-245. doi:10.1016/S1467-8039(03)00036-7
- Wool, D., & Hales, D. F. (1997). Phenotypic Plasticity in Australian Cotton Aphid (Homoptera: Aphididae): Host Plant Effects on Morphological Variation. *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 316-328.
- Wu, C. I. (1991). Inferences of species phylogeny in relation to segregation of ancient polymorphisms. *Genetics*, 127(2), 429-435.
- Zhang, D.-X., & Hewitt, G. M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA

markers. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(6),
247-251. doi:16/0169-5347(96)10031-8

II. Article soumis à Applied Entomology and Zoology : Molecular identification and ecological characteristics of two cryptic species within a cosmopolitan aphid pest, Brachycaudus helichrysi (Hemiptera: Aphididae)

Molecular identification and ecological characteristics of two cryptic species of the cosmopolitan aphid pest *Brachycaudus helichrysi*

Short title: Ecological differentiation within *B. helichrysi*.

J. Piffaretti, J.-P. Rossi, F. Vanlerberghe-Masutti, G. Genson, A. Coeur d'Acier and E. Jousselin.

Joséphine Piffaretti, E-mail: piffaretti@supagro.inra.fr

Jean-Pierre Rossi, E-mail: rossi@supagro.inra.fr

Flavie Vanlerberghe-Masutti, E-mail: Flavie.Vanlerberghe@supagro.inra.fr

Gwenaelle Genson, E-mail: genson@supagro.inra.fr

Armelle Cœur d'Acier, E-mail: coeur@supagro.inra.fr

Emmanuelle Jousselin, E-mail: jousseli@supagro.inra.fr

INRA – UMR 1062 CBGP (INRA, IRD, CIRAD, Montpellier SupAgro), Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet CS 30 016, F-34 988 Montferrier-sur-Lez, France.

Fax: +33 (0) 4 99 62 33 45

Abstract

The leaf-curl plum aphid, *Brachycaudus helichrysi*, is a polyphagous cosmopolitan aphid. This serious pest of plum and peach orchards affects the growth of its host plants by curling infested leaves and can transmit viruses, such as the plum pox virus. Phylogenetic analyses have recently shown that *B. helichrysi* actually comprises two sibling species that are morphologically similar but genetically different. In this study, we developed a PCR-RFLP test for differentiating between these two species, based on a mitochondrial DNA fragment. We used this test to investigate the patterns of host plant association and the geographical distribution of these taxa, with a large sample of individuals collected from numerous host plants and locations worldwide. We found that one of the taxa was never present on plum trees and that individuals from the two *B. helichrysi* taxa coexisted on many secondary herbaceous hosts at almost all the sites studied. However, our analysis did suggest some differences in the herbaceous host-plant range of the two taxa. We then carried out principal component analysis to determine whether the distribution of the two taxa could be explained by climatic features. We found that the taxon absent from plum trees was not found in regions with harsh winters. This suggests that one of the subspecies within *B. helichrysi* may be an obligate parthenogenetic aphid.

Keywords: aphids; asexuality; climate; host plant association; PCA; sibling species.

Introduction

Aphids (Insecta, Hemiptera, Aphididae) encompass about 4700 species (Remaudière and Remaudière 1997; Blackman and Eastop 2000), some of which are important pests on cultivated host plants worldwide. Their effectiveness as crop pests is due to both their capacity to reproduce asexually (rapidly generating very large numbers of individuals) and the broadness of their host-plant ranges. They damage host plants directly, by their feeding behaviour, and indirectly, by transmitting major plant viruses (Blackman and Eastop 2000; Emden and Harrington 2007).

Brachycaudus helichrysi (Kaltenbach, 1843) is a polyphagous, cosmopolitan aphid (Blackman and Eastop 2000). It has been reported to have a heteroecious lifecycle, alternating between several *Prunus* (Rosaceae) species as primary hosts (Bennett 1955; Gupta and Thakur 1993) and numerous herbaceous secondary hosts, mostly from the Asteraceae and Boraginaceae. Holocyclic populations have also been described in mild climates and glasshouses. This species is generally known as the leaf-curl plum aphid and is considered a major pest of sunflower (Lerin and Badenhauer 1995; Badenhauer and Lerin 1998), plum orchards (Madsen and Bailey 1958) and ornamental flowers, such as chrysanthemums (Wardlow and Gould 1981; Miller and Stoetzel 1997; Ramakers and Maaswinkel 2002). *B. helichrysi* colonies cause damage by curling the leaves of their host plants and transmitting viruses, including the plum-pox virus, which causes a very serious viral disease of stone fruits (Bell 1983; Verma and Singh 1990; Levy *et al.* 2000). In a recent phylogenetic study (Piffaretti *et al.* 2012), we showed that *B. helichrysi* actually comprises two sibling species, hereafter called *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2. These analyses, based on the sequencing of four DNA fragments (two mitochondrial markers, one nuclear marker and one DNA fragment from *Buchnera aphidicola*), revealed the existence of two clades separated by a genetic distance similar to that generally found between sister species within the genus *Brachycaudus* (e.g. *p* distance = 0.03 for COI) (Coeur d'acier *et al.*, 2008). Conversely, intraclade distances, even between geographically distant individuals, were almost zero. Similar results were obtained for all the DNA sequences investigated. The existence of two well differentiated subspecies was confirmed by analyses of microsatellite DNA markers. However, *B. helichrysi* H1 could not be distinguished from *B. helichrysi* H2 on the basis of morphological features.

This first study suggested that the two sibling species might differ in terms of their biological features (e.g. host range, life cycle). However, it was based on only 65 individuals and it was not possible to investigate ecological differences between the two species. A disjunction in the host-plant range and/or

geographic range of the two taxa would imply that they do not represent equivalent threats to the surrounding cultivated plants. Furthermore, they might also differ in their capacity to transmit viruses (prevalence or transmission rate). It is, therefore, also important to investigate the ecological and biological differences between *B. helichrysi* H1 and H2 that are relevant to their pest status, to guide informed decisions regarding crop pest management. This could be achieved through the development of a cheap, easy-to-use, species-specific marker.

Molecular tools have proved useful, in several cases, for species identification and delimitation in aphids (Raboudi *et al.* 2005; Carletto *et al.* 2009; Foottit *et al.* 2009; Peccoud and Simon 2010). As the DNA sequences of *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 differ for several markers, it seemed appropriate to use these differences to develop a test distinguishing between H1 and H2. The principal objective of this study was to develop such a discrimination test, based on RFLP (restriction fragment length polymorphism). We chose to work on a well conserved coding region of mitochondrial DNA to avoid the problems associated with the presence of too many mutations or insertion-deletion events that might modify the restriction sites. The second objective of this study was to analyse the geographical distribution of the two taxa in terms of climate characteristics and to investigate their host-plant ranges. We collected a large sample of individuals from numerous host plants (primary woody hosts and secondary herbaceous hosts) from regions with contrasting climatic conditions from all continents.

Materials and methods

Aphid sampling and DNA extraction

B. helichrysi is a truly cosmopolitan and polyphagous aphid species, having been reported on all continents and on more than 120 plant species, with a notable preference for Asteraceae and Boraginaceae. We collected 271 aphid colonies between 1999 and 2011, from numerous host plants (9 plant families, 32 genera) and different parts of the world (10 countries on 5 continents), focusing in particular on three zones: 1) France, where we had easy access to samples, 2) southern Kazakhstan, in Central Asia, where high species diversity has been reported for both *Prunus* (Bortiri *et al.* 2001) and *Brachycaudus* (Coeur d'acier *et al.* 2008) and where *B. helichrysi* has been reported to cause major damage (Berim 2008), and 3) the western coast of the USA, where *B. helichrysi* occurs on a regular basis, from California to Washington State, according to information compiled in the Essig Museum database

(<http://essigdb.berkeley.edu/>: 622 records for *B. helichrysi* specimens with locations, host-plant association and collection date). We tried to maximise the diversity of the host plants and climatic conditions in which the samples were collected (Table 1, and Table S1). Each sampled colony was georeferenced and at the host plant was identified down to the genus level at least and, where possible, to the species level, with a local flora. All colonies were immediately preserved in 90° ethanol for storage. Each colony corresponded to specimens collected from a single host plant or from two neighbouring host plants of the same species if only a very small number of individuals were present on a single plant. A voucher number was attributed to each colony, which was then transferred to the INRA collection (CBGP, Montpellier), from which they are available upon request.

We first examined the colonies under a binocular microscope for rapid initial sorting to remove species other than *B. helichrysi* from the plants. We then took one to ten individuals from each sampled colony for DNA extraction and identification by RFLP.

Total genomic DNA was extracted from a single individual (frequently a larva) with the BioBasics extraction kit (Bio Basic Inc., Ontario, Canada), in a 96-well plate containing 50 µl of extraction buffer, or in 10 % (w/v) Chelex® 100 resin solution (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) in a 96-well plate (see Piffaretti *et al.* (2012) for details). All DNA samples were stored at –20°C.

Restriction site identification

We chose 10 sequences from individuals from each of the two groups, *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2, as identified in our previous study on the basis of several molecular markers (see (Piffaretti *et al.* 2012)). Potential restriction sites were then identified in these sequences with NEBcutter online software (Vincze *et al.* 2003). This program searches each submitted sequence for unique restriction sites for all type II and commercially available type III restriction enzymes. We selected restriction enzymes that met the following criteria: 1) enzyme with a restriction site exclusive to *B. helichrysi* H1 or *B. helichrysi* H2, and 2) the digestion fragment had to be of a size sufficiently different (at least 100 bp) from that of the undigested fragment for easy interpretation of electrophoresis results. We used a 750 bp fragment of the mitochondrial *cytochrome b* gene (*CytB*, amplified with CP1 (5'-GATGATGAAATTTTGGATC-3') (Harry *et al.* 1998) and CB2 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3') (Jermiin and Crozier 1994)) and a 658 bp fragment of the mitochondrial *cytochrome oxidase subunit I* gene (COI, amplified with the LepF (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3') and

LepR (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3') primers (Sheffield *et al.* 2009)). The restriction enzymes retrieved for the COI fragment did not match our criteria, so we selected two restriction enzymes that digested the *CytB* fragment.

RsaI was selected because its restriction site, 5'...GT/AC...3', is present in the *CytB* sequences of *B. helichrysi* H1 but not in those of *B. helichrysi* H2. Digestion generates fragments of about 300 bp and 400 bp in length (Fig. 1A and Fig. 2A, Fig. S1). We then checked that this restriction site was conserved in a batch of 50 *B. helichrysi* H1 sequences and absent from a batch of 50 *B. helichrysi* H2 sequences.

We also used *BstXI* was selected, as its restriction site 5'...CCANNNNN/NTGG...3' is present in the *CytB* sequences of *B. helichrysi* H2 but not in those of *B. helichrysi* H1. The DNA fragments resulting from digestion are approximately 550 bp and 150 bp long (Fig. 1B and Fig. 2B, Fig. S1). We checked that this restriction site was conserved in a batch of 50 *B. helichrysi* H1 sequences and absent from a batch of 50 *B. helichrysi* H2 sequences.

PCR-RFLP test

Sixteen individuals (8 individuals from each group identified in our previous study on the basis of 6 DNA fragments) were subjected to the RFLP test as a control and for the estimation of discrimination error.

A DNA fragment of about 750 bp from the mitochondrial *cytochrome b* gene (*CytB*) was amplified with the CP1/CB2 primers. All PCRs were performed in a final volume of 25 µl containing 1 x reaction buffer (CoralLoad PCR Buffer, Qiagen®, Hilden, Germany), 0.1 mM of each dNTP, 0.7 µM of each primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase and 2 µl of DNA extract, in an Eppendorf thermocycler, as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 48°C and 1 min at 72°C and a final elongation phase at 72°C for 5 min.

We then digested the PCR products with the restriction enzymes *RsaI* and *BstXI* separately: we digested 2 µl of the PCR products with 0.2 µl of *RsaI* enzyme (10 U/µl, Promega, Madison, WI) in 1 µl of 10 x buffer C and 6.8 µl of H₂O. The preparation was incubated at 37°C for 1 hour. We then digested 2 µl of the PCR products with 0.2 µl of *BstXI* (10 U/µl, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) in 1 µl of 10 x buffer 0 and 6.8 µl of H₂O. The preparation was incubated at 55°C for 1 hour.

We added 5 µl of 10X molecular weight ladder to the digestion products in each well and the

Table 1. Colony composition and their associated host plant at the family and genera level. The composition of the sampled colonies according to PCR-RFLP results are given in the first line.

	<i>B. helichrysi</i> H1	<i>B. helichrysi</i> H2	<i>B. helichrysi</i> H1 and <i>B. helichrysi</i> H2
Apocynaceae	2	0	0
<i>Vinca</i>	2	0	0
Asteraceae	106	80	31
<i>Achillea</i>	18	18	5
<i>Anaphalis</i>	1	2	0
<i>Antennaria</i>	0	1	0
<i>Anthemis</i>	5	2	1
<i>Artemisia</i>	2	2	0
<i>Aster</i>	0	2	1
<i>Centaurea</i>	0	2	0
<i>Chrysanthemum</i>	0	0	1
<i>Coryza</i>	56	29	19
<i>Coreopsis</i>	1	0	0
<i>Erechtites</i>	0	1	0
<i>Eupatorium</i>	0	1	0
<i>Euryops</i>	2	1	0
<i>Helianthus</i>	7	1	0
<i>Helichrysum</i>	2	1	0
<i>Inula</i>	0	1	0
<i>Koelipinia</i>	0	1	0
<i>Leucanthemum</i>	0	1	0
<i>Matricaria</i>	6	0	0
<i>Osterospermum</i>	0	1	0
<i>Pallenis</i>	0	2	0
<i>Santolina</i>	0	1	0
<i>Saussurea</i>	1	0	0
<i>Senecio</i>	2	9	3
Boraginaceae	1	1	2
<i>Myosotis</i>	1	0	2
<i>Symphytum</i>	0	1	0
Ericaceae	1	0	0
<i>Arctostaphylos</i>	1	0	0
Goodeniaceae	0	1	0
<i>Stachys</i>	2	1	0
Oenotheraceae	0	1	0
<i>Oenothera</i>	0	1	0
Ranunculaceae	1	0	0
<i>Anemone</i>	1	0	0
Rosaceae	35	0	0
<i>Prunus</i>	35	0	0

mixtures were loaded onto 2% agarose gels containing 5% GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Hayward, CA). DNA fragments were separated by electrophoresis in TAE buffer for 20 min at 100 V. They were then examined under blue light (470 nm). Fragment sizes were compared with a size ladder with bands at 10 000 bp intervals (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) (Fig.1).

The test was then performed on 755 individuals from 271 colonies.

Analyses of ecological data

Each colony was associated with a “class” on the basis of RFLP identification. Class was set to (1) if only H1 individuals were identified in the colony, to (2) if only H2 individuals were identified in the colony, and to (3) for mixed colonies.

We first tested whether *B. helichrysi* H1 and H2 displayed a disjunction in their herbaceous host-plant ranges. We organised our data into a contingency table with two factors: species (2 categories: 1 or 2), with the reallocation of mixed colonies to H1 and H2 colony counts, and herbaceous host-plant genus (7 genera). We checked whether the mixed colonies were found on particular host plants, by determining whether colony class was dependent on herbaceous host plant. We also organised the data into a second contingency table with two factors: colony class (3 categories) and herbaceous host-plant genus (6 genera). For each contingency table, we retained only those host plant categories from which more than five colonies had been collected.

As the data consisted of many small counts, we applied Fisher’s exact test to each contingency table to assess the association between species or colony class and herbaceous host-plant genus. The matrices used were larger than 2x2, so we calculated *p*-values for a Monte Carlo test (Hope 1968) with 2000 replicates. Tests were performed with R software (R Development Core Team 2010).

The geographical distribution of the sampled colonies and their composition were mapped on worldwide maps with the R package programs *maptools* (Lewin-Koh *et al.* 2012) and *raster* (Hijmans and van Etten 2012) (Fig. 2 and 3; for the collection details for each colony, see table S1).

Climate descriptors for each sampling site were retrieved from the Worldclim database (Hijmans *et al.* 2005). These data included variables such as minimum, maximum and mean monthly temperatures and precipitation averaged over the period 1950-2000. We also used 19 global bioclimatic variables derived from monthly temperatures and rainfall values to generate more biologically meaningful variables (see

(Hijmans *et al.* 2005) for details). In total, we collected 67 variables. As we were working with variables describing monthly values, we removed the data points corresponding to sampling locations in the southern hemisphere (4 of 267) from subsequent analyses to prevent confusion due to seasonal effects (Fig. 3).

We carried out a standard principal component analysis (PCA) (Manly 1994), together with a between-class test, with the R package *ade4* (Dray and Dufour 2007). The between-class test was used to determine whether there were significant differences between samples grouped as a function of colony class (i.e. 1, 2 or 3 see above). We simulated 999 between-class analyses (BCA, i.e. PCA constrained to maximise the divergence between the centres of gravity of the classes) on randomised data. For each sample, the values of climatic variable combinations were preserved for each data point, but class attribution was randomised. The real and randomised data were then compared.

We compared the mean values of each climate variable for each class, in one-way ANOVA followed by Tukey’s HSD (honestly significant difference) test. These tests were performed with R software.

Results

PCR-RFLP discrimination between *B. helichrysi* H1 and H2

RsaI digestion of the *CytB* gene fragment amplified from individuals belonging to *B. helichrysi* H1 resulted in two DNA fragments of the expected sizes (8/8 of the PCR products tested), whereas a single fragment the size of the PCR product was obtained for individuals belonging to *B. helichrysi* H2 (8/8 of the PCR products tested) (Fig. 1A). *BstXI* digestion of the *CytB* gene fragment yielded a single DNA fragment the size of the PCR product for individuals belonging to the H1 group (8/8 PCR products tested), and a slightly shorter fragment (550 bp) for individuals belonging to H2 (8/8 of the PCR products tested; the 150 bp fragments are masked by the primer dimers) (Fig. 1B). *RsaI* and *BstXI* gave consistent results (Fig. 1).

Aphid identification

We identified 755 individuals from the 271 colonies: 151 colonies consisted of H1 individuals only, 87 colonies consisted of H2 individuals only and 33 colonies consisted of a mixture of H1 and H2 individuals. Colony composition and host-plant associations are shown in Table 1, and geographical distribution is shown in figures 2 and 3.

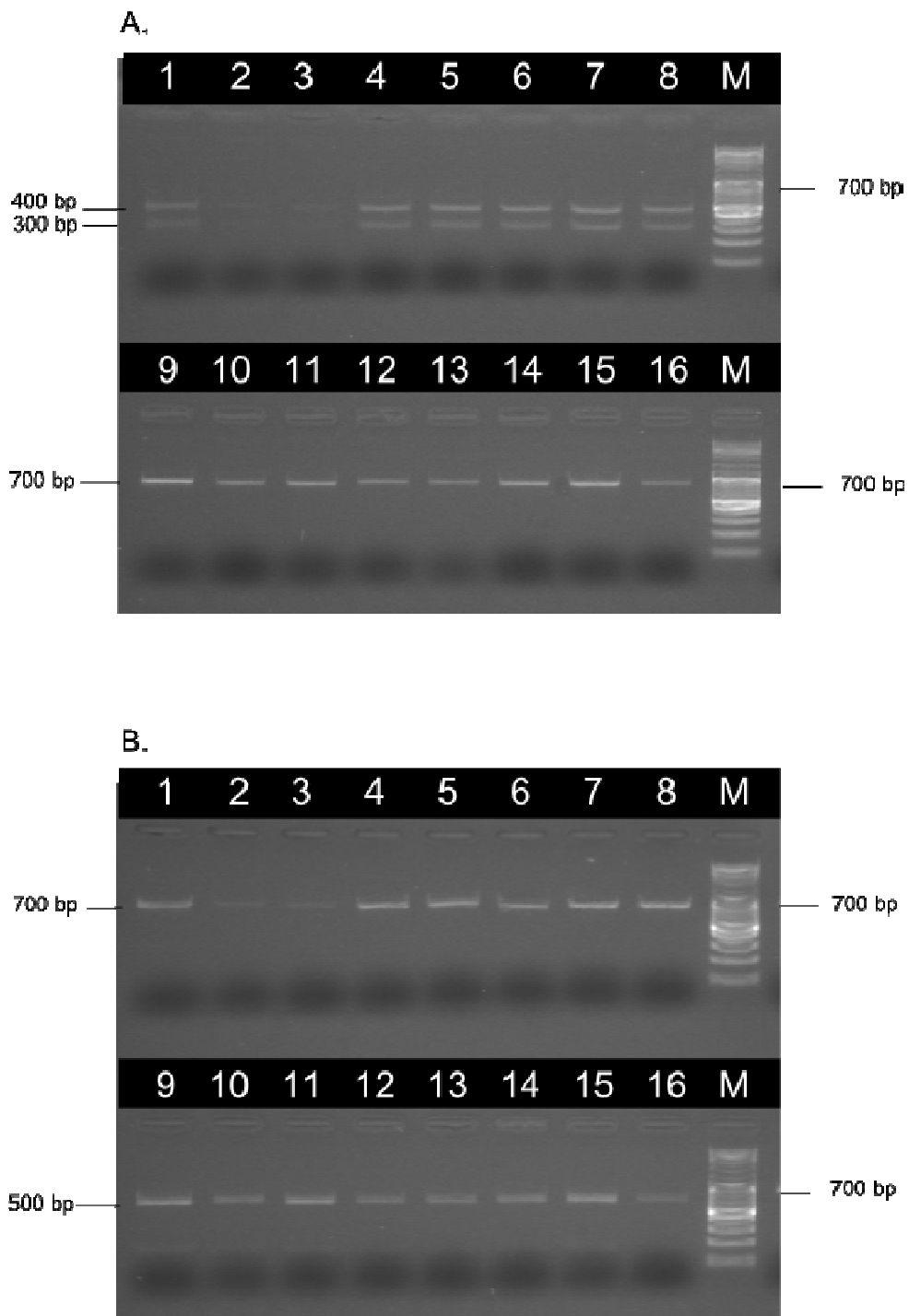


Figure 1. PCR-RFLP profile on an agarose gel of the *CytB* amplicon (750 bp) with the CP1/CB2 primers. A. Digestion with *RsaI*. Lanes 1 to 8: *B. helichrysi* H1, Lanes 9 to 16: *B. helichrysi* H2, and M, the 10,000-bp DNA ladder. B. Digestion with *BstXI*. Lanes 1 to 8: *B. helichrysi* H1, Lanes 9 to 16: *B. helichrysi* H2, and M, the 10,000-bp DNA ladder.

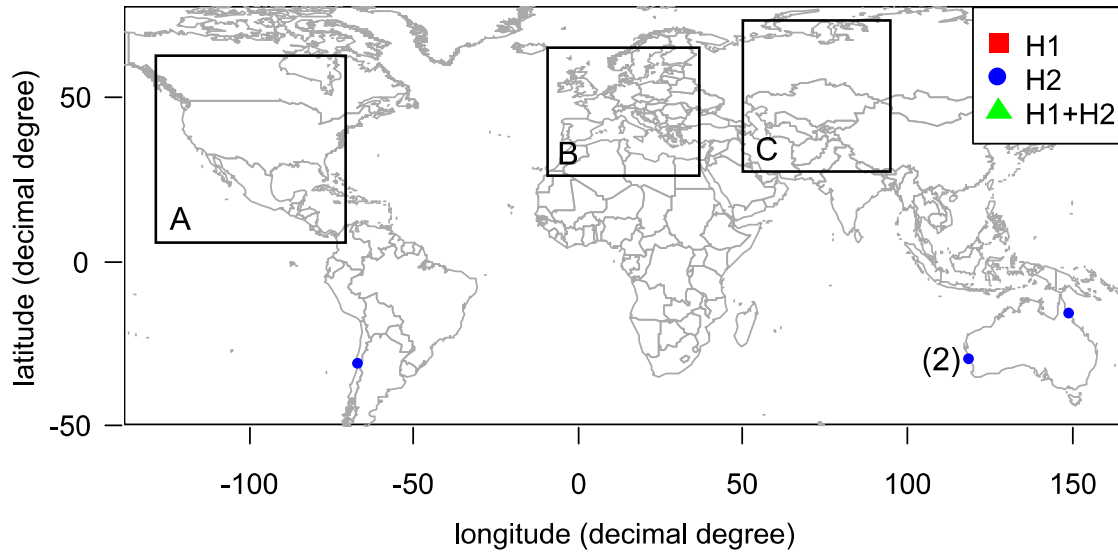
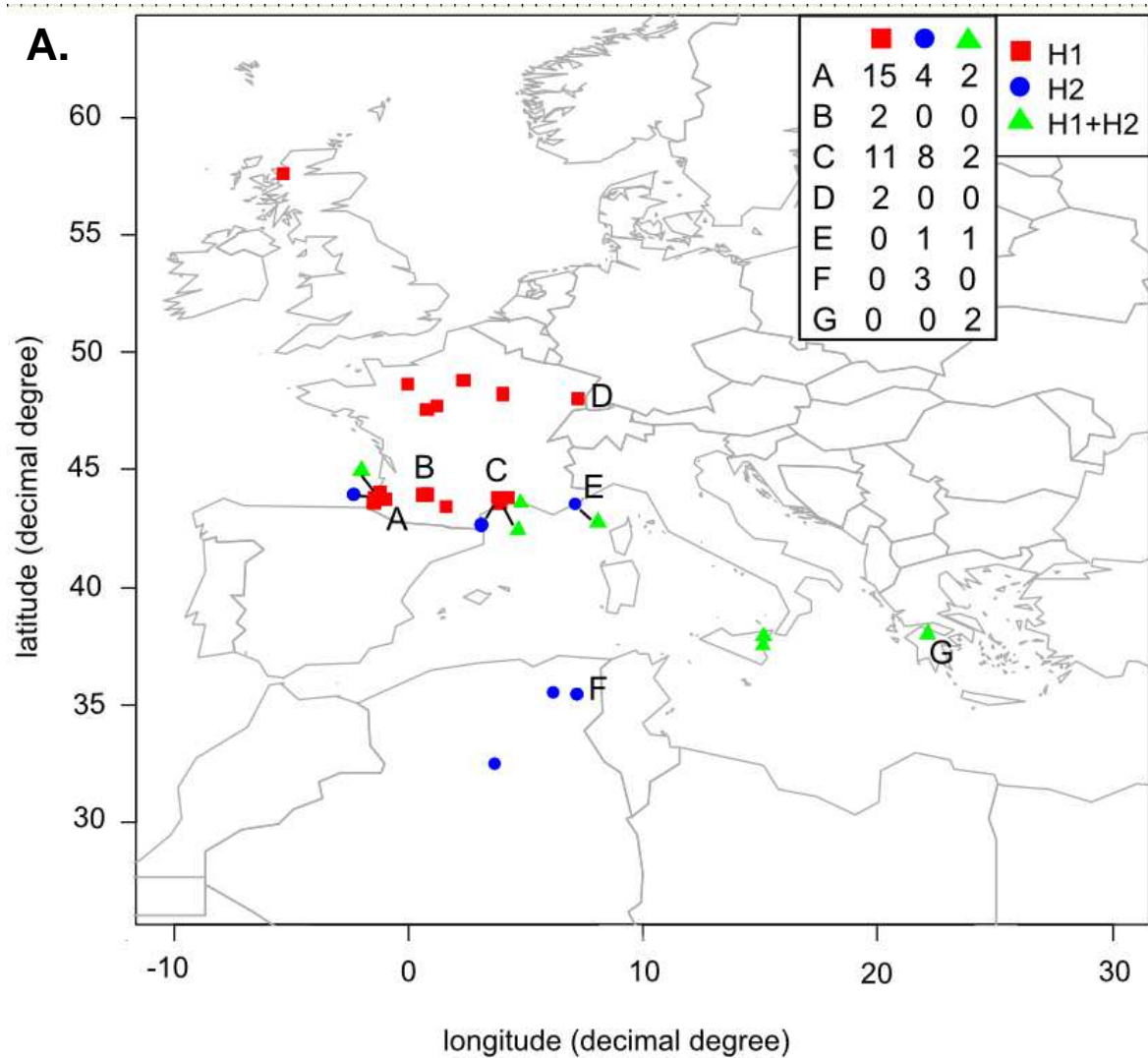
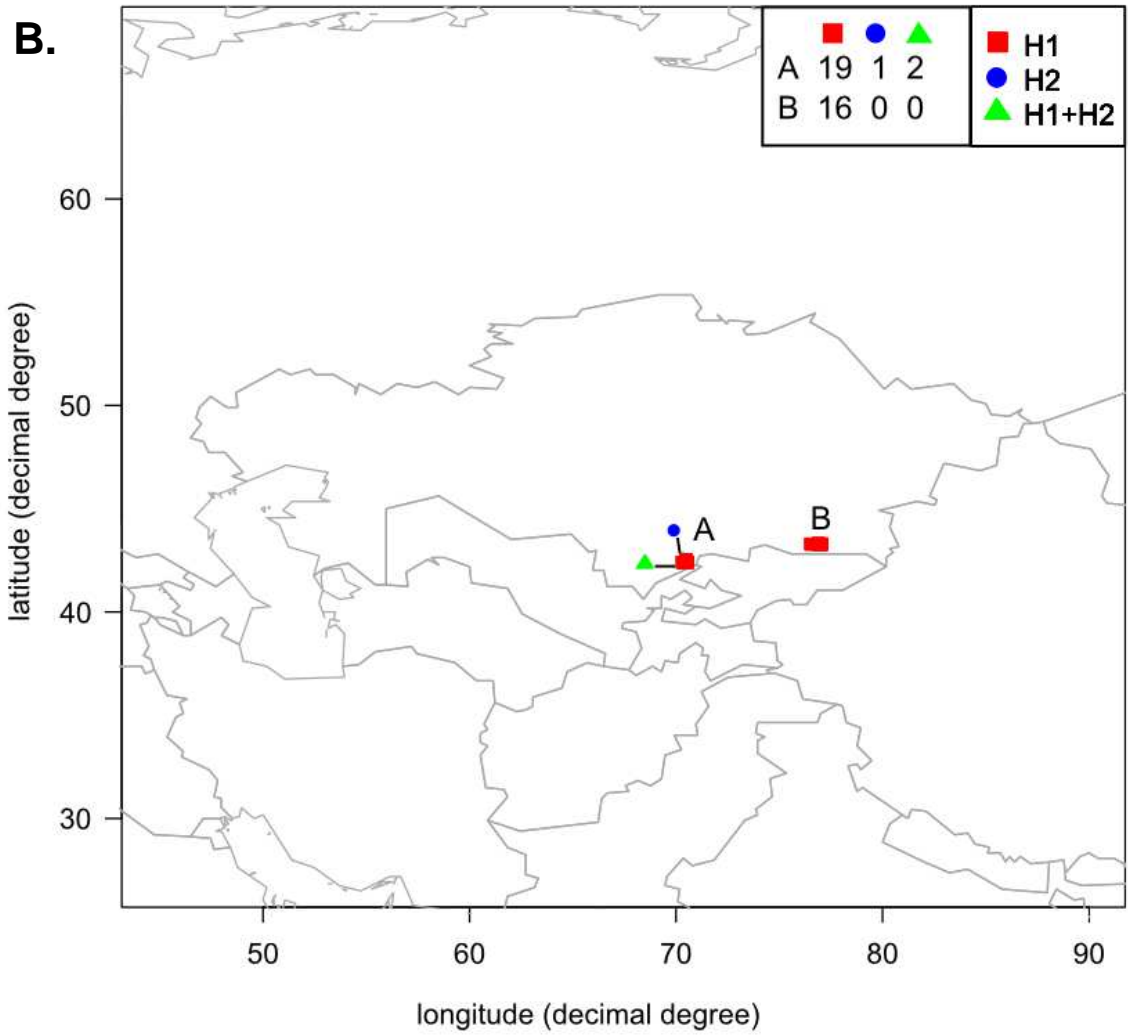
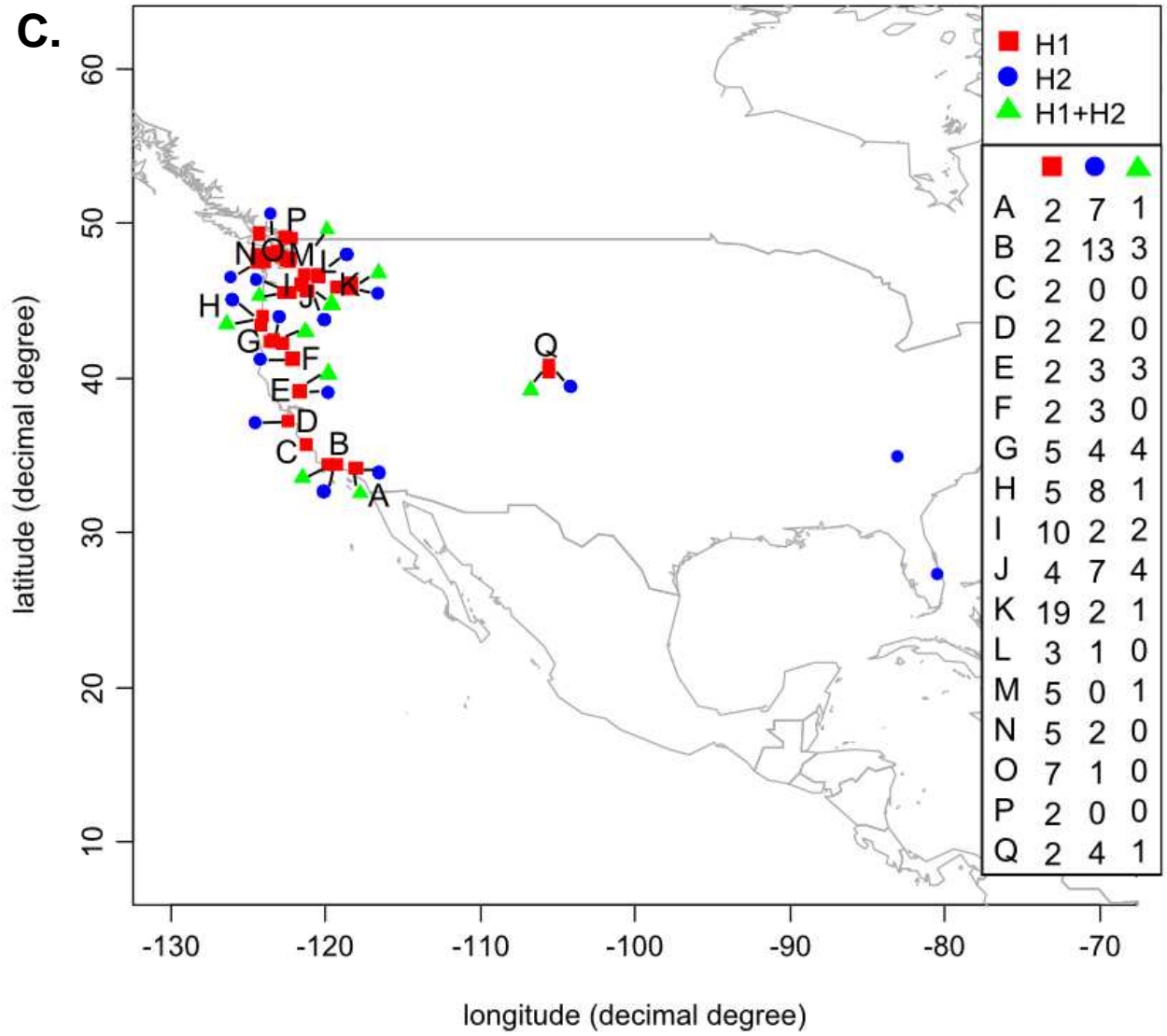


Figure 2. World map showing the regions sampled. Black squares indicate the regions used for the climatic survey in the northern hemisphere. A: Europe, B: Kazakhstan, C: USA. In the southern hemisphere: plots of the sampled colonies in Australia and Chile. Red squares: colonies of *B. helichrysi* H1; blue circles, colonies of *B. helichrysi* H2; green triangles, mixed colonies of *B. helichrysi* H1 and H2. The number in brackets indicates the number of colonies sampled if there were several.

Figure 3. Map of *B. helichrysi* colonies in the northern hemisphere. A. Plotting of *B. helichrysi* colonies on a map of Europe. B. Plotting of *B. helichrysi* colonies on a map of Kazakhstan. C. Plotting of *B. helichrysi* colonies on a map of North America. Red squares, colonies of *B. helichrysi* H1; blue circles, colonies of *B. helichrysi* H2; green triangles, mixed colonies of *B. helichrysi* H1 and H2. Sites at which more than one colony was sampled are indicated by a letter and details of the colonies are given in the box on the right.







Do *B. helichrysi* H1 and H2 have different host-plant ranges?

No *B. helichrysi* H2 individuals were found on plum trees. However, these individuals were found to coexist with H1 individuals on many herbaceous plants (Table 1). Two plant genera from the Asteraceae, *Achillea* and *Conyza*, were repeatedly identified as host plants for both H1 and H2, in pure and mixed colonies. However Fisher's exact tests suggested that the presence of the two species, H1 and H2, and colony class were dependent on the associated host-plant genera (*P*-values of 0.01749 and 0.01649, respectively). The significance of this test resulted principally from the pattern of occurrence of *B. helichrysi* H1 and H2 on two genera (*Helianthus* and *Matricaria*). *B. helichrysi* H2 was never found on *Matricaria* (five colonies in Kazakhstan and one colony in France). When we analysed the occurrence of the two taxa on one of the principal cultivated host plants of *B. helichrysi*, sunflower (*Helianthus annuus*), we found that, for the samples (*n*=7 colonies) included in this study, no H2 colonies were present on cultivated sunflower fields in France. One H2 colony was found on sunflower in Australia.

Both taxa appeared to be highly polyphagous: *B. helichrysi* H1 occurred on at least three *Prunus* species and 21 herbaceous plant genera and *B. helichrysi* H2 occurred on 32 herbaceous plant genera.

Do *B. helichrysi* H1 and H2 occur in locations with different climatic characteristics?

Both H1 and H2 were found on all continents and at many sites. However, H2 seemed to be largely absent from regions with a continental climate, with the exception of three samples from southern Kazakhstan, Central Asia and five samples from Colorado, USA (Figs. 2 and 3).

PCA on the climate variables yielded a first principal component accounting for 41% of the total inertia, accounting principally for temperature patterns, as revealed by the large contributions of mean annual temperature and autumn and spring monthly temperatures (maximum, minimum and mean) (Fig. 4, Table S2). Interestingly, this principal component corresponded to a clear segregation between samples from class 1 (i.e. featuring H1 only) and those from classes 2 and 3 (showing only H2 and mixed colonies, respectively) (Fig. 5). These differences were statistically significant (*p*<0.001) in the between-class test performed with *n*=1000 randomisations. The first axis of the PCA revealed that *B. helichrysi* H2 was absent from the coldest regions, particularly those with cold autumns and springs.

Axis 2 accounted for 32% of the total inertia and revealed differences in precipitation-related variables, such as mean annual precipitation, winter

precipitation, temperature seasonality and the annual temperature range (Fig. 4 and Table S2). Axis 2 mostly expressed differences between samples from class 2 and those from classes 1 and 3 (Fig. 5). The second axis of the PCA revealed that *B. helichrysi* H1 was under-represented in regions with low annual temperature variation and high levels of precipitation.

The one-way ANOVA results were consistent with the PCA results. The factor "class" had a significant effect on the mean values of each climate variable, particularly for variables related to temperature. All the tests for which significant results were obtained involved comparisons with pure H1 colonies. Differences between H2 colonies and mixed colonies were not significant, regardless of the variable considered (the details are given in Table S3). These findings suggest that H1 colonies may occur in climatic conditions incompatible with the occurrence of *B. helichrysi* H2 (in pure or mixed colonies).

Discussion

This study demonstrates the efficacy of an mtDNA PCR-RFLP test for distinguishing between the two sister species found within *B. helichrysi*. In a worldwide sample, we identified 433 individuals belonging to the taxon that we named *B. helichrysi* H1, and 286 individuals belonging to the taxon that we named *B. helichrysi* H2. We carried out control digestions for 16 individuals: no discordance with the results of the *RsaI* and *BstXI* identification method was observed. Our PCR-RFLP identification test is therefore an effective tool for rapid discrimination between *B. helichrysi* H1 and H2. This test is based on four easy steps: DNA extraction, partial *CytB* amplification, digestion and electrophoresis. All these processes are routinely carried out in molecular biology laboratories.

Our survey of a worldwide sample demonstrated that the two sibling species occurred together at almost all the sites studied (Fig. 2 and 3). Furthermore, they were frequently found together on the same herbaceous plants, in mixed colonies of indistinguishable *B. helichrysi* H1 and H2 individuals.

We confirm here that, as suggested by Piffaretti *et al.* (2012), one of the taxa within *B. helichrysi* — *B. helichrysi* H2 — is never found on plum trees. In addition, some H2 colonies were found late in autumn and early in spring on herbaceous plants. These observations suggest that *B. helichrysi* H2 never occurs on woody hosts. This lack of occurrence of H2 on woody host plants, which generally serve as primary hosts in the life cycle of *B. helichrysi*, suggests that H2 is either

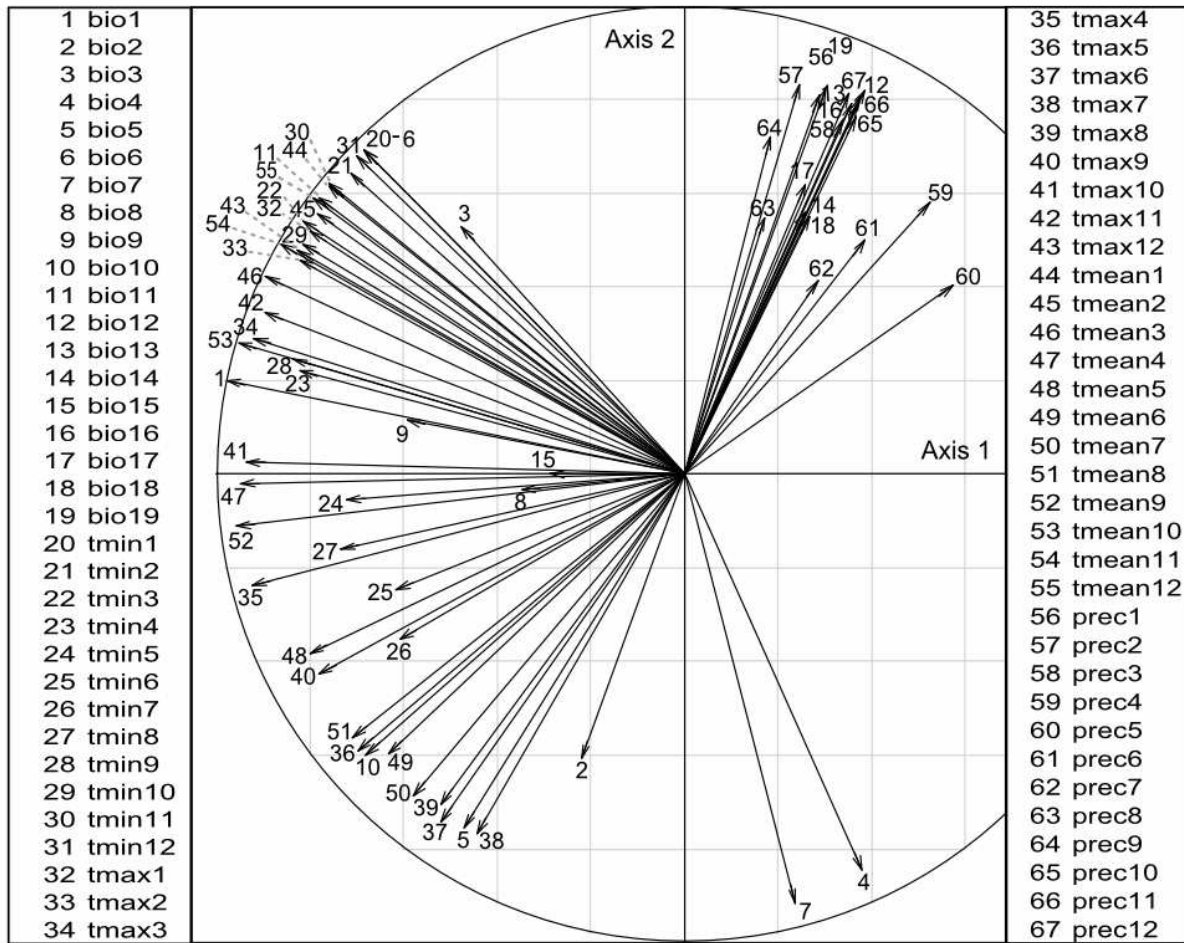


Figure 4. Correlation circle showing the contribution of the climatic variables to the first two axes of the PCA. Each climatic variable corresponds to a number following the correspondence table on either side of the circle. bio1, annual mean temperature; bio2, mean diurnal range (mean monthly temperature (max temp - min temp)); bio3, isothermality (bio2/bio7) (* 100); bio4, temperature seasonality (standard deviation *100); bio5, maximum temperature of warmest month; bio6, minimum temperature of coldest month; bio7, temperature annual range (bio5-bio6); bio8, mean temperature of wettest quarter; bio9, mean temperature of driest quarter; bio10, mean temperature of warmest quarter; bio11, mean temperature of coldest quarter; bio12, annual precipitation; bio13, precipitation of wettest month; bio14, precipitation in driest month; bio15, precipitation seasonality (coefficient of variation); bio16, precipitation in wettest quarter; bio17, precipitation in driest quarter; bio18, precipitation in warmest quarter; bio19, precipitation in coldest quarter; tmin1 to tmin12, minimal temperature of January to minimal temperature of December in degrees Celsius *10; tmax1 to tmax12, maximal temperature of January to maximal temperature of December in degrees Celsius *10; tmean1 to tmean12, mean temperature of January to mean temperature of December in degrees Celsius *10; prec1 to prec12, mean precipitation of January to mean precipitation of December in millimetres.

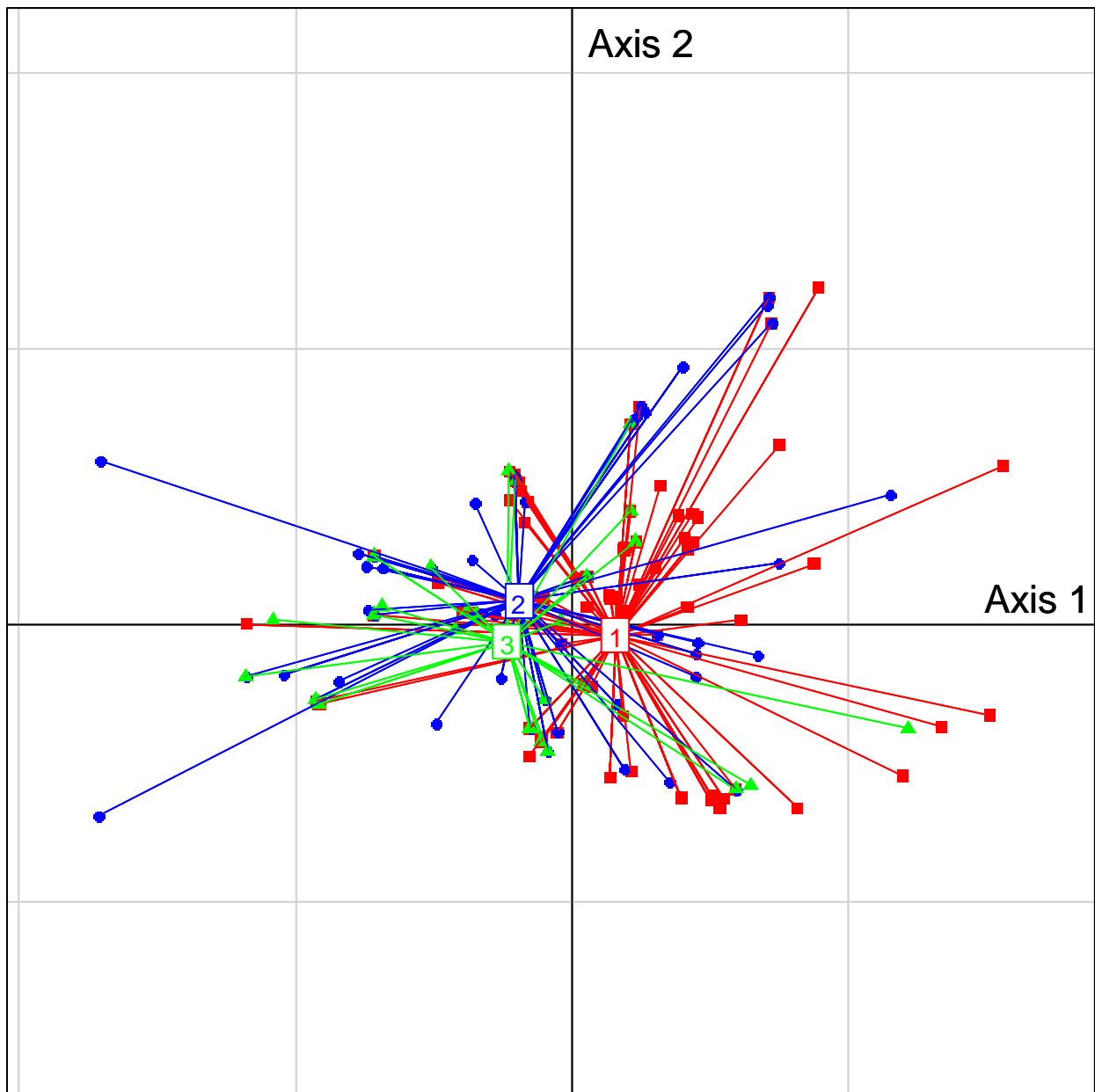


Figure 5. Climatic spaces for each colony class on the first two axes. 1, *B. helichrysi* H1 colonies; 2 *B. helichrysi* H2 colonies; 3, mixed colonies of *B. helichrysi* H1 and H2.

monoecious on herbaceous hosts (i.e. *B. helichrysi* H2 does not shift onto a woody host plant for the sexual phase of its life cycle) or anholocyclic (i.e. there has been a transition to obligate parthenogenesis in this taxon, with loss of the sexual generation).

Principal component analyses of the climatic variables associated with the sites from which samples were taken showed that: 1) *B. helichrysi* H2 was absent from the coldest regions sampled, particularly those with cold autumns and springs and that 2) *B. helichrysi* H1 was under-represented in regions with low annual temperature variation and high levels of precipitation. These results are consistent with the hypothesis that *B. helichrysi* H2 is an asexual aphid lineage (Rispe *et al.* 1998; Vorburger *et al.* 2003). Indeed, aphid colonies cannot withstand freezing conditions. Only eggs (the product of sexual reproduction) can survive harsh winter conditions (Strathdee *et al.* 1995), and anholocyclic lineages cannot persist from year to year in regions with harsh winters. The regions from which H2 was absent were those with harsh dry winters. We sampled many H2 individuals from the northern part of the western coast of the USA, where winter temperatures fall sufficiently for snow to occur, but this snow does not preclude the occurrence of parthenogenetic lineages, as it may protect the aphid colonies. No such protection can occur in harsh, dry winter conditions. Nevertheless, we found a small number of H2 individuals in Kazakhstan and Colorado (USA), where the climatic conditions preclude the maintenance of a purely anholocyclic aphid lineage. This does not necessarily mean that H2 is not anholocyclic in these areas. These colonies may have settled on their host plants after a dispersion event (by wind or by human activities) from an area in which climatic conditions were more favourable to a parthenogenetic *B. helichrysi* H2. Indeed four of the five colonies from Colorado containing H2 were found in cities, on ornamental flowers (botanical gardens, house fronts). The presence of anholocyclic H2 in Colorado may easily have resulted from the human transport of ornamental flowers produced in greenhouses. Alternatively, the H2 populations found in Kazakhstan and Colorado may be holocyclic. If this is the case, we can draw no firm conclusions about the type of life cycle they display (heteroecious or monoecious on herbaceous hosts plants). However, if they are heteroecious, the primary host of these populations has yet to be identified, as we have sampled *Brachycaudus* species extensively from various *Prunus* species in previous studies (Jousselin *et al.* 2010) and we have never found *B. helichrysi* H2.

There may be several explanations for the apparent under-representation of pure H1 colonies in regions with low levels of temperature variation and high levels of precipitation. Firstly, *Prunus* may be less well adapted in some of these regions, providing

B. helichrysi H1 with fewer opportunities to find its primary host plant, resulting in a lower abundance of this aphid (Vorburger *et al.* 2003). Alternatively, the two sibling species may be in competition in these regions, and H2 may outcompete H1 due to higher levels of fecundity linked to its asexuality (Rispe *et al.* 1998; Nespolo *et al.* 2009).

Hypotheses about the life cycle of H2 should now be tested explicitly in population genetic studies using microsatellite markers, for example, and aiming to identify the clonal lineages that form the signature of an anholocyclic species (Delmotte *et al.* 2002; Wilson *et al.* 2003; Figueroa *et al.* 2005; Halkett *et al.* 2005). Attempts could also be made to induce sexual phases experimentally in *B. helichrysi* H2, as a means of determining its life cycle (Lees 1959; Voegtlin and Halbert 1998).

In addition, experiments could be carried out to assess the competition between the two species (Rochat *et al.* 1999; Brevault *et al.* 2011). The discrimination test that we have developed would provide a useful tool for such studies.

Our sampling scheme was designed to maximise the diversity of the host-plant genera sampled, to provide a general overview of the feeding behaviour of *B. helichrysi* H1 and H2. We did not conduct intensive surveys of a few host plant taxa to investigate the host-plant preferences of H1 and H2. Many plant genera were thus sampled only once and we cannot draw any firm conclusions as to whether there are real disjunctions in the host-plant ranges of H1 and H2 (i.e. whether there are some plants on which H1 can feed but H2 cannot and *vice versa*). However, this initial survey revealed that *B. helichrysi* H1 and H2 were both highly polyphagous and that they were frequently found together on diverse herbaceous host plants, including ornamental plants, such as *Chrysanthemum* and *Achilleae*, which are commercially important. Nevertheless, our data revealed some differences in host-plant distribution between H1 and H2: only *B. helichrysi* H1 was found on *Matricaria*. However, five of the six samples included in our study were collected in Kazakhstan, where *B. helichrysi* H2 was found to be very rare. The observed distribution of the two aphid species on this host plant genus may therefore be due to geographical biases in sampling. Our findings confirmed that only H1 was a potential pest of plum orchards. We have extensively sampled diverse *Brachycaudus* species on other cultivated *Prunus* species previously reported to serve as hosts for *B. helichrysi* (Blackman & Eastop, 1994) (i.e. *Prunus dulcis*, *P. armeniaca*, *P. cerasus*) and *P. tianshanica*, a wild *Prunus* species native to Central Asia (Jousselin *et al.* 2010). In none of these samplings have we found either H1 or

H2, suggesting that H1 is a threat only to plums, in the sampled regions. It seems to occur more rarely on other *Prunus* species. By contrast, as described above, both H1 and H2 are potential pests on ornamental Asteraceae. We did not focus specifically on cultivated plants, but we noticed that H2 seemed to be absent from sunflower fields in France (in the north or south) and additional data confirmed this trend (10 additional colonies on sunflowers in France were found to consist entirely of H1 individuals (unpublished data.)). The exclusive occurrence of *B. helichrysi* H1 on plum orchards and sunflower suggests that the colonisation of plum trees regularly treated with large amounts of insecticide to control aphids may have resulted in the acquisition of resistance in this species, allowing it to develop on other cultivated host plants. H2, which does not use plum trees during its life cycle, may not be subjected to the same selective pressure and may therefore be more sensitive to preventive treatments applied to cultivated fields. This hypothesis could be tested by looking for differences in resistance genes between these two species. In any case, additional studies of host-plant preference (empirical and experimental) are required to improve our understanding of the host-plant association patterns of these two taxa, and their associations with cultivated host plants in particular.

In conclusion, in a worldwide sample, the DNA-based discrimination of *B. helichrysi* H1 and H2 showed that individuals of both clades frequently coexist on secondary herbaceous host plants. This highlights the need for methods for discriminating between species before conducting ecological, epidemiologic or population genetic studies of the cosmopolitan pest *B. helichrysi*. The PCR-RFLP test developed here is the perfect tool for this purpose: it can be carried out rapidly and easily by almost all molecular laboratories. This rapidity also makes it possible to plan management strategies, within only a few days if necessary, in response to pest outbreaks.

Acknowledgements

This work was funded by an ANR JCJC-05 (*Brachycaudus*) grant to EJ and AC, the SPE Department of INRA (“SDIPS project”) and a PhD grant to JP from INRA-SPE and the Languedoc Roussillon region. We thank R. Footit, O. Le Gall, the staff of CETIOM, and S. Halbert, for generously providing specimens. We thank Anne-Laure Clamens for laboratory support and for field work support in the USA. We thank Justine Pochon and Emilie Bertanpetit for laboratory support during their training. We also thank the Worldclim platform for collecting and providing the climatic data.

References

Badenhausser I, Lerin J, 1998. Comparison of population dynamics of *Brachycaudus helichrysi*

- and damage symptoms in four sunflower cultivars. In: Aphids in Natural and Managed Ecosystems. Proceedings of the Fifth International Symposium on Aphids, Leon, Spain, 15-19 September, 1997. Ed. by J. M. Nieto Nafria and A. F. G. Dixon Universidad de Leon Secretariado de Publicaciones, Leon Spain. 513–518.
- Bell AC, 1983. The life-history of the leaf-curling plum aphid *Brachycaudus helichrysi* in Northern Ireland and its ability to transmit potato virus Yc(AB). *Ann. Appl. Biol.* 102.
- Bennett SH, 1955. The biology, life history and methods of control of the leaf curling plum aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt). *J. Hortic. Sci* 30, 252–259.
- Blackman RL, Eastop VF, 2000. Aphids on the world’s crops: an identification and information guide, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd., England.
- Bortiri E, Oh S-H, Jiang J, Baggett S, Granger A, Weeks C, Buckingham M, Potter D, Parfitt DE, 2001. Phylogeny and Systematics of *Prunus* (Rosaceae) as Determined by Sequence Analysis of ITS and the Chloroplast trnL-trnF Spacer DNA. *Syst. Bot.* 26, 797–807.
- Brevault T, Carletto J, Tribot J, Vanlerberghe-Masutti F, 2011. Insecticide use and competition shape the genetic diversity of the aphid *Aphis gossypii* in a cotton-growing landscape. *Bull. Entomol. Res.* 101, 407–413.
- Carletto J, Blin A, Vanlerberghe-Masutti F, 2009. DNA-based discrimination between the sibling species *Aphis gossypii* Glover and *Aphis frangulae* Kaltenbach. *Syst. Entomol.* 34, 307–314.
- Coeur d’acier A, Cocuzza G, Jousselin E, Cavalieri V, Barbagallo S, 2008. Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Zool. Scr.* 37, 175–193.
- Delmotte, F, Leterme, N, Gauthier, J-P, Rispe, C, & Simon, J-C (2002). Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. *Mol. Ecol.*, 11(4), 711–723.
- Dray S, Dufour A-B, 2007. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22, 1–20.
- Emden HFV, Harrington R, 2007. Aphids as crop pests. Ed. by Helmut F. van Emden and Richard Harrington. CABI.
- Figueroa, C C, Simon, J-C, Le Gallic, J-F, Prunier-Leterme, N, Briones, L M, Dedryver, C-A, & Niemeyer, H M (2005). Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Heredity*, 95(1), 24-33.

- Footitt RG, Maw HEL, Havill NP, Ahern RG, Montgomery ME, 2009. DNA barcodes to identify species and explore diversity in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera: Aphidoidea). *Mol. Ecol. Resour.* 9, 188–195.
- Gupta PR, Thakur JR, 1993. Sexual generation and overwintering of the peach leaf curling aphid *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) in Himachal Pradesh, India. *Ann. Appl. Biol.* 122.
- Halkett, F, Plantegenest, M, Prunier-Leterme, N, Mieuze, L, Delmotte, F, Simon, J- C (2005). Admixed sexual and facultatively asexual aphid lineages at mating sites. *Mol. Ecol.*, 14(1), 325–336.
- Harry M, Solignac M, Lachaise D, 1998. Molecular evidence for parallel evolution of adaptive syndromes in fig-breeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 9, 542–551.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A, 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25, 1965–1978.
- Hijmans RJ, van Etten J, 2012. raster: Geographic analysis and modeling with raster data. R package version 2.0-04.
- Hope ACA, 1968. A simplified Monte Carlo significance test procedure. *J. Roy. Stat. Soc. B Met.* 582–598.
- Jermiin LS, Crozier RH, 1994. The cytochrome *b* region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *J. Mol. Evol.* 38, 282–294.
- Jousselin E, Genson G, Coeur d’acier A, 2010. Evolutionary lability of a complex life cycle in the aphid genus *Brachycaudus*. *BMC Evol. Biol.* 10, 295.
- Lees AD, 1959. The role of photoperiod and temperature in the determination of parthenogenetic and sexual forms in the aphid *Megoura viciae* Buckton–I: The influence of these factors on apterous virginoparae and their progeny. *J. Insect Physiol.* 3, 92–117.
- Lerin J, Badenhausser I, 1995. Influence of the leaf curling plum aphid (*Brachycaudus helichrysi*) on stem diameter, seed yield, and their relationship, in sunflower. *J. Agr. Sci.* 125, 211–221.
- Levy L, Damsteegt V, Scorza R, Kolber M, 2000. Plum Pox Potyvirus Disease of Stone Fruits. APSnet Features.
- Lewin-Koh NJ, Bivand R, contributors, 2012. mapproj: tools for reading and handling spatial objects. R package version 0.8-14.
- Madsen HF, Bailey BJ, 1958. Biology and control of the leaf curl plum aphid in northern California I. *J. Econ. Entomol.* 51, 226–229.
- Manly BFJ, 1994. *Multivariate Statistical Methods - CRC Press Book.* Chapman and Hall/CRC.
- Miller GL, Stotzel MB, 1997. Aphids associated with chrysanthemums in the United States. *Fla Entomol.* 80, 218–239.
- Nespolo RF, Halkett F, Figueroa CC, Plantegenest M, Simon J-C, 2009. Evolution of trade-offs between sexual and asexual phases and the role of reproductive plasticity in the genetic architecture of aphid life histories. *Evolution* 63, 2402–2412.
- Peccoud J, Simon J-C, 2010. The pea aphid complex as a model of ecological speciation. *Ecol. Entomol.* 35, 119–130.
- Piffaretti J, Vanlerberghe-Masutti F, Tayeh A, Clamens A, Coeur d’acier A, Jousselin E, 2012. Molecular phylogeny reveals the existence of two sibling species in the aphid pest *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae). *Zool. Scr.* 41, 266–280.
- R Development Core Team, 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing {ISBN} 3-900051-07-0.
- Raboudi F, Mezghani M, Makni H, Marrakchi M, Rouault JD, Makni M, 2005. Aphid species identification using cuticular hydrocarbons and cytochrome *b* gene sequences. *J. Appl. Entomol.* 129, 75–80.
- Ramakers, P. M. J., Maaswinkel, R. H. M., 2002. Pest occurrence and control in organic year-round production of chrysanthemums. In: Bulletin OILB/SROP. Presented at the Proceedings of the Joint IOBC/WPRS Working Group “Integrated Control in Protected Crops, Temperate Climate” and IOBC/NRS “Greenhouse, Nursery, & Ornamental Landscape IPM Working Group,” International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP), Dijon, France, Victoria (British Columbia), Canada, 6-9 May 2002. 221–224.
- Remaudière G, Remaudière M, 1997. *Catalogue des Aphididae du monde.* Editions Quae.
- Rispe C, Pierre J-S, Simon J-C, Gouyon P-H, 1998. Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints. *J. Evol. Biol.* 11, 685–701.
- Rochat J, Vanlerberghe-Masutti F, Chavigny P, Boll R, Lapchin L, 1999. Inter-strain competition and dispersal in aphids: evidence from a greenhouse study. *Ecol. Entomol.* 24, 450–464.
- Sheffield CS, Hebert PDN, Kevan PG, Packer L, 2009. DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 196–207.
- Strathdee AT, Howling GG, Bale JS, 1995. Cold hardiness of overwintering aphid eggs. *J. Insect Physiol.* 41, 653–657.

- Verma KL, Singh M, 1990. Biology of peach leaf curl aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) (Homoptera: Aphididae). Bulletin of Entomology (New Delhi) 31.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ, 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res. 31, 3688–3691.
- Voegtlin DJ, Halbert SE, 1998. Variable morph production by some North American clones of *Rhopalosiphum padi* in response to reduced photoperiod and temperature. In: Aphids in Natural and Managed Ecosystems. Proceedings of the Fifth International Symposium on Aphids, Leon, Spain, 15-19 September, 1997. Ed. by J. M. Nieto Nafria and A. F. G. Dixon Universidad de Leon Secretariado de Publicaciones, Leon Spain. 309–315.
- Vorburger C, Lancaster M, Sunnucks P, 2003. Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two “superclones” in Victoria, Australia. Mol. Ecol. 12, 3493–3504.
- Wardlow, L. R., Gould, H. J., 1981. Chrysanthemum pests under glass and their control. Booklet, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food ii + 14 pp.
- Wilson, ACC., Sunnucks, P, Hales, DF (2003). Heritable genetic variation and potential for adaptive evolution in asexual aphids (Aphidoidea). Biol. J. Linn. Soc., 79(1), 115–135.

III. Recherche d'allèles privés H1/H2.

Nous avons montré que la divergence génétique entre les deux espèces sœurs H1 et H2 s'exprimait au niveau des séquences de plusieurs gènes, chacune portant des mutations propres. Dans cette partie nous étudierons la fréquence de chaque allèle des 14 locus microsatellite chez H1 et H2 afin de mettre en évidence, s'ils existent, des allèles privés à chaque espèce sœur qui pourraient être utilisés comme allèles diagnostiques. Le jeu de données comprend 442 génotypes d'individus H1 et 224 génotypes d'individus H2, l'ensemble des individus correspond à des échantillons collectés En Europe, Asie Centrale, Amérique du Nord, Chili, Australie, Algérie sur de nombreuses espèces plantes hôtes.

Du fait du fort polymorphisme de certains marqueurs, la fréquence des allèles au sein de chaque espèce est généralement faible. Afin de mettre en évidence des allèles privés à chaque espèce qui pourront être utilisés comme diagnostiques, nous avons sélectionné les allèles absents chez une des deux espèces et présents à plus de 10% chez l'autre (Tableau 1). Chez H1, trois allèles privés appartenant à trois locus différents ressortent mais à des fréquences faibles (entre 10 et 15%). Chez H2, par contre 7 allèles privés appartenant à 6 locus différents se dégagent, cinq de ces allèles sont présents en fortes fréquences (autour de 50%). Il est à noter que les allèles privés relevés dans le sous-jeu de données (Piffaretti et al. 2012) ne le sont plus dans l'étude globale. Ces résultats sont à prendre avec précaution. Cependant, les cinq allèles présents en forte fréquence chez H2 et absents chez H1 semblent pouvoir être utilisés à titre indicatif. Dans tous les cas, cette recherche d'allèles privés souligne la forte proportion d'allèles partagés entre H1 et H2 qui, couplé à un taux de mutation élevé, rend les marqueurs microsatellites peu fiables pour distinguer les deux espèces à eux seuls. Cette observation renforce l'idée de l'importance d'un test robuste pour distinguer les deux espèces sœurs comme le test de PCR-RFLP qui se base sur des marqueurs moléculaires à évolution lente. On peut noter que les faibles fréquences alléliques chez H1 peuvent s'expliquer par son mode de reproduction sexué qui tend à homogénéiser les fréquences alléliques, tandis que chez H2 qui est majoritairement constitué de lignées clonales, la fixation d'un allèle est favorisé.

Tableau 1. Résultats de la recherche d'allèles privés chez H1 et H2. nb = nombre ; la colonne « allèle privé >10% » donne la taille des allèles privés présents à plus de 10% chez une espèce, sa fréquence est donnée entre parenthèses.

locus	H1				H2			
	nb allèles	gamme de taille	nb allèle privé	allèle privé > 10%	nb allèles	gamme de taille	nb allèle privé	allèle privé > 10%
Bh_CT3H7	15	263-284	6	264 (0.104)	19	256-293	4	-
Bh_CT2B4	8	121-143	5	-	5	129-149	2	-
Bh_GT3D5	3	177-181	1	-	6	165-179	4	165 (0.536)
Bh_CT4B9	19	330-386	10	-	15	330-378	6	-
Bh_GT3B5	22	102-155	12	-	11	104-140	1	104 (0.502)
Bh_GT3F8	23	343-399	12	353 (0.117)	24	335-413	13	-
Bh_GT3D8	29	309-368	18	-	12	318-354	1	-
Bh_CT3H5	22	203-237	15	-	8	201-234	1	201 (0.522)
Bh_GT3G9	17	163-205	11	177 (0.15)	10	143-179	4	153 (0.527)
Bh_GT3C9	18	186-227	4	-	17	186-225	3	-
Bh_GT3A1	14	160-210	8	-	9	160-174	3	171 (0.491)
Bh_GT3E11	4	133-139	3	-	11	122-153	10	-
Bh_GT2E6	9	96-111	5	-	10	73-102	6	73 (0.179) & 92 (0.249)

IV. Note sur la différenciation morphologique

Comme souligné plus haut (Introduction, partie II), *B. helichrysi* est un puceron de petite taille ce qui rend sa manipulation délicate pour les études morphologiques. De plus, du fait de la récurrence de colonies mixtes, une étude morphologique sur H1 et H2 nécessite d'abord d'identifier génétiquement les individus avant toute préparation microscopique, c'est-à-dire d'extraire l'ADN avec des techniques non destructives et de récupérer la carcasse pour la monter entre lame et lamelle et procéder aux mesures morphologiques. De plus les mesures de caractères morphologiques se font sur des femelles vivipares aptères, et sur un grand nombre de répliquats par plante afin d'estimer la variabilité intraspécifique. Notre échantillonnage actuel est souvent constitué à partir de colonies de petites tailles comprenant seulement quelques adultes. Un tel travail nécessiterait donc de faire un nouvel échantillonnage dans ce but précis.

Deux études morphologiques sur *B. helichrysi* sont intéressantes à relever :

1/ Tayeh (2007) a montré qu'il n'existait pas de différences significatives entre une centaine d'individus H1 et H2 sur l'ensemble des caractères morphologiques étudiés. Il faut cependant noter que la classification des individus a été définie par rapport, non pas aux individus eux-mêmes, mais en identifiant génétiquement (COI et CytB) un individu de la

même colonie... Il se peut donc que la classification des individus soit fautive et qu'une partie des mesures soient mal attribuées. Par contre, cette étude morphologique a mis en évidence une forte plasticité phénotypique en fonction de la famille de plante hôte (primaire : Rosaceae, et secondaires : Asteraceae, Boraginaceae et Scrophulariaceae) et de la zone géographique d'origine (France, Grèce, Australie), ce qui renforce la nécessité de travailler sur un très grand nombre d'individus issus d'un échantillonnage sur hôtes secondaires variés et provenant de diverses localités aux conditions environnementales distinctes.

2/ L'importance agronomique de *B. helichrysi* sur vergers de fruits à noyaux durs a conduit à la parution de plusieurs études morphologiques sur hôte primaire. Gupta *et al.* (1993) ont publié une étude morphologique sur *B. helichrysi* sur pêchers en Inde, et compare ses résultats avec ceux de deux études similaires sur pruniers au Royaume-Uni (Bennett 1955; Bell 1983). Suite aux résultats de cette thèse, nous pouvons suggérer que les individus récoltés sur pêchers en Inde sont des individus H2 alors que ceux étudiés sur pruniers appartiennent à l'espèce H1. Les colonies ont toutes été échantillonnées sur hôtes primaires ce qui diminue fortement la probabilité que les auteurs aient travaillé sur des colonies mixtes H1/H2 (il est en tous cas peu probable, d'après nos résultats, que les colonies sur pruniers au Royaume-Uni contiennent des individus H2). La comparaison de différents morphes met en évidence quelques différences morphologiques : 1/ chez les gynopares et les mâles, la longueur du *processus terminalis* (dernière partie du dernier segment antennaire) est plus courte chez les individus retrouvés sur pêchers (probablement H2) que ceux retrouvés sur pruniers (probablement H1) ; 2/ Les femelles ovipares ont des corps plus longs sur pêchers que sur pruniers, et des antennes possédant 6 et 5 segments respectivement. Il n'est pas exclu que cette différence morphologique puisse être attribuée à la plante hôte comme on l'a observé sur plantes hôtes secondaires (Tayeh 2007). Cependant Gupta *et al.* (1993) suggèrent que *B. helichrysi* sur pruniers aux Etats-Unis et au Royaume-Uni pourrait être une race différente de ceux sur pêchers en Inde.

Chapitre 2. « L'attaque des clones » : mise en évidence de différents modes de reproduction et cycle de vie chez H1 et H2.

Introduction du chapitre

Le chapitre précédent fait état d'une forte divergence génétique entre deux taxa, délimitant deux espèces sœurs au sein de *B. helichrysi*. Les conditions écologiques auxquelles elles sont associées divergent. H1 occupe la niche écologique classiquement décrite pour *B. helichrysi* (Bennett 1955; Bell 1983; Blackman et Eastop 2006b) : nous avons retrouvé H1 associé aux pruniers et à une large gamme d'herbacées, et il est largement présent dans les régions échantillonnées. Il semblerait donc que H1 ait un cycle de vie hétéroécique, utilisant plusieurs espèces de pruniers comme hôtes primaires. Au contraire, H2 est fortement sous-représenté dans les régions aux hivers rudes, et n'est jamais retrouvé associé aux pruniers. Ces informations suggèrent que H2 aurait un cycle de vie anholocyclique : en effet les cycles anholocycliques se déroulent sur un seul type de plante hôte, ici des herbacées, et sa répartition climatique est typique des lignées anholocycliques (Rispe et al. 1998; Vorburger, Lancaster, et Sunnucks 2003).

Dans ce chapitre, nous allons déterminer les cycles de vie des populations des deux espèces H1 et H2. Afin de définir les populations, nous utiliserons les génotypes (basés sur 14 locus microsatellites) d'un très grand nombre d'individus, qui seront analysés avec les outils classiques de la génétique des populations. Les individus sélectionnés correspondent à des colonies échantillonnées dans les régions déjà présentées dans le chapitre précédent, auxquels s'ajoutent des échantillons provenant d'Inde sur pêchers, et d'Algérie sur herbacées, obtenus fin 2011 grâce à des collaborations. La détermination du mode de reproduction se fera principalement grâce à l'étude de la signature génétique laissée au sein de chaque population. Nous avons également testé de manière expérimentale si une lignée de H1 et une lignée de H2 sont capables de produire des formes sexuées en condition contrôlées, mimant les conditions automnales induisant le changement de mode de reproduction. Les données d'associations aux plantes hôtes nous informeront sur le type

d'hôte exploité et sur la capacité d'alternance d'hôtes de chacune des populations. En compilant toutes ces informations, nous pourrons ainsi définir les cycles de vie de chaque population rencontrée au sein des deux espèces sœurs.

Ce chapitre se divise en deux parties : une première partie qui correspond à l'article n°3 et qui reprend la méthodologie présenté ci-dessus ; et une deuxième partie qui présentera en détails la mise en place des tests d'induction des morphes sexués, et illustrera les morphes obtenus chez *B. helichrysi* H1.

I. Article n°3 en préparation pour Molecular Ecology. Regular sex versus covert sex discriminates two sibling species and 8 superclones within the leaf curl plum aphid (Brachycaudus helichrysi)

Regular sex versus covert sex discriminates two sibling species and 8 superclones within the leaf curl plum aphid (*Brachycaudus helichrysi*)

Piffaretti, J., Clamens, A.-L., Vanlerberghe-Masutti, F., Gupta, R. K., Call, E., Jousselein, E.

Abstract

Asexual reproduction is widely distributed among plants and animals, particularly in insects. Aphid species usually reproduce via cyclical parthenogenesis (i.e. alternation of sexual and parthenogenetic phases) but many species encompass obligate asexual lineages that have sometimes spread rapidly throughout continents. We recently showed that the leaf curl plum aphid *Brachycaudus helichrysi* actually encompasses two sibling species named *B. helichrysi* H1 and H2; ecological data suggest that they exhibit different life cycles as H2 seems restricted to areas with mild winters, which is symptomatic of asexual aphid lineages and has never been found on any *Prunus* species (generally hosting the sexual phase of *B. helichrysi*). Here, we conduct a large population genetic study of H1 and H2 in order to infer their respective life cycles and investigate their population structure and geographic distribution. We conducted a world-wide sampling over several years and on numerous host plants, and used population genetic analyses based on 14 microsatellite loci. *Brachycaudus helichrysi* H1 exhibits the genetic signature of a lineage undergoing regular sexual reproduction (cyclical parthenogenesis), using plum trees as primary hosts for sexual reproduction, as classically described in the literature for *B. helichrysi*. This global survey shows that the Central Asian population is clearly differentiated from American and European populations that seem connected. In contrast, *B. helichrysi* H2 showed the typical signature of obligate asexual reproduction, H2 gathered at least 8 highly successful genotypes or superclones, 4 of them can be found on several continents over several years. This lack of ability to undergo sexual reproduction was confirmed for one of the superclones by sex induction experiments. We found a single *B. helichrysi* H2 population that undergoes sexual reproduction; it was collected on peach trees, in Northern India. This suggests that *B. helichrysi* H1 using plum trees as primary hosts and *B. helichrysi* H2 using peach trees as primary hosts are two very different species. This study also demonstrates that *B. helichrysi* H1 populations and *B. helichrysi* H2 superclones exhibit great dispersal ability as evidenced by their widespread distributions, whereas *B. helichrysi* H2 sexual lineages remain more elusive as they seem to have a restricted distribution.

Keywords: microsatellite, parthenogenesis, superclones, plum orchards, peach orchards.

Introduction

Asexual reproduction is widely distributed among plants and animals (G. Bell 1982), and has evolved independently in various taxa. While sexual reproduction seems to be ancestral, obligate asexual reproduction has appeared recently (Normark, Judson, et Moran 2003). Asexual reproduction is very common in Hexapoda and can be achieved through various mechanisms (Meeûs, Prugnolle, et Agnew 2007). It was while studying aphids' embryology that parthenogenesis was first described in 1745 by Charles Bonnet (1745). Asexual reproduction in aphids is achieved by apomitosis that ensures the genetic identity of mother and daughter. This trait was acquired very early in the Aphidoidea (Moran 1992) and conserved until now. Aphids' life cycles are complex: they often consist in an alternation of sexual and asexual reproduction phases. The typical annual life cycle of an aphid consists in several parthenogenetic generations during the growing season, followed by sexual morphs production to generate one sexual generation during the winter (only sexually produced diapausing eggs can survive harsh winters). Most aphid species have conserved a sexual reproduction phase in their life cycle: some species encompass asexual lineages but these are closely related to cyclical parthenogenetic lineages as they do not show any clear genetic divergence with their sexual conspecifics suggesting that they are continuously formed (Dedryver et al. 2001; Halkett et al. 2005; Sandrock, Razmjou, et Vorburger 2011). Only 3% of all aphid species seem to be true obligate asexual species (Simon, et al. 2002). The diversity of aphids' life cycles makes them an ideal model to study the evolution of asexuality, its causes and consequences (Delmotte et al. 2001; Simon, Risper, et Sunnucks 2002; Simon et al. 2003; Wilson, Sunnucks, et Hales 2003) .

Lynch (1984) suggested that, over evolutionary times, selection will favour asexual lineages exhibiting lower temporal variance in fitness, in other words, he suggested that highly generalized genotypes were more susceptible to evolve during transition towards asexuality. Asexual reproduction combined with high reproductive rates in aphids can rapidly lead to the emergence of such generalized superclones and their dissemination throughout continents. Recent studies on aphid populations confirmed this propensity to widespread and persistent clonal lineages. The grain aphid, *Sitobion avenae*, gathers two main asexual generalist genotypes, favoured by agricultural practices and they are widespread over different continents (Haack et al. 2000; Figueroa et al. 2005). Some generalist clonal lineages of the Oleander aphid, *Aphis nerii*, were detected throughout the USA during two successive years (Harrison et Mondor 2011). However, successful superclones are not always generalist. For instance, in

Myzus persicae, the peach-potato aphid, persistent asexual lineages in Scotland exhibits two strategies: Kasprovicz et al. (2008) showed the existence of widespread asexual lineages and a couple of locally adapted clones. Further, widespread asexual lineages in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii*, are specialized to host plant species, constituting host races (Carletto et al. 2009). The generalist superclone genotype of Lynch's theory is therefore not always confirmed by empirical studies. Nevertheless, superclones exhibit great dispersal abilities and have the great advantage that they do not depend on mating site findings for their long term survival. Because of both these abilities, they can constitute an important threat to agricultural resources, when they have acquired characteristics that allow their adaptation to crops. For instance, the study by (Peccoud et al. 2008) shows how host-adapted clones of *Acyrtosiphon pisum* have invaded Chile from the Old World and established on legumes local cultures

Brachycaudus helichrysi (Kaltenbach, 1843), the leaf curl plum aphid, is a cosmopolitan and polyphagous aphid (Blackman and Eastop 2000) that represents a serious pest for its cultivated host plants: the most notable being sunflowers (Lerin and Badenhausser 1995; Badenhausser and Lerin 1998), plum orchards (Madsen and Bailey 1958), and ornamental flowers, such as chrysanthemums (Wardlow and Gould 1981; Miller and Stoetzel 1997; Ramakers and Maaswinkel 2002), primarily affecting the growth of its host-plants by curling infested leaves. In plum and peach trees orchards, it transmits viruses like the Plum Pox Virus which causes the most serious viral disease of stone fruits, (Bell 1983; Verma and Singh 1990; Levy et al. 2000). It is also known as a potential vector of the cucumber mosaic cucumovirus, the Dahlia mosaic *Caulimovirus* and a mosaic disease of cineraria (Blackman et Eastop 2000), and the potato virus Y C(AB) (A. C. Bell 1983). Its life cycle is classically described as heteroecious, alternating between several species of *Prunus* (mainly plum *Prunus domestica*) and peach trees (*Prunus persica*) as primary hosts for its sexual phase (Bennett 1955; Gupta and Thakur 1993) and various secondary herbaceous host plant mainly belonging to Asteraceae and Boraginaceae families. Though it is considered as a serious pest, with a cosmopolitan distribution and though anholocyclic populations have been reported at least on ornamental flowers in glasshouses (Blackman et Eastop 2000), there have been no studies aimed at understanding the population structure of this aphid. In addition, we previously showed that *B. helichrysi* actually encompasses two distinct sister species that we named *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 (Piffaretti et al. 2012). These two taxa are genetically well differentiated on several DNA

markers (nuclear, mitochondrial and bacterial DNA markers), showing genetic distance equivalent to the one found between species in the *Brachycaudus* genus on all these markers but they are morphologically indistinguishable. Ecological data reveals that *B. helichrysi* H2 is never found on plum trees, and that H2 is dominant in regions with mild winters and with soft climatic variation all year round (Piffaretti et al. 2012, Piffaretti et al. *submitted*). *B. helichrysi* H1 and H2 are both polyphagous and share the same range of herbaceous host plants. These ecological and genetic data suggest that *B. helichrysi* H2 has a different life cycle from *B. helichrysi* H1: its geographic distribution (restricted to mild climates) and patterns of host plant association (i.e; the lack of association with a woody host) suggest that it might be an obligate asexual lineage.

Genetic studies allow investigating aphids life cycles, as alternative reproductive modes leave different genetic signatures due to different genomic re-organization after reproduction events (Meeûs, Prugnolle, et Agnew 2007; Schurko, Neiman, et Logsdon Jr 2009). Even if modeling the genetic consequences of asexuality in complex organisms is difficult, three predictions can be made on the genetic consequences of asexual reproduction (Halkett, Simon, et Balloux 2005). First, clonal reproduction creates high occurrence of identical genotypes and therefore generates low genotypic diversity (Balloux, Lehmann, et de Meeûs 2003). Second, mutation accumulation leads to heterozygote excess that results in negative Fis estimates, and high allelic diversity in ancient asexual lineages (this is called the “Meselson effect” (Welch et Meselson 2000)). Finally clonal reproduction generates non-random association between loci, which can be detected by studying linkage disequilibrium between pairs of loci. Except for genotypic diversity, all these estimates are significantly affected when the frequency of sexual reproduction is very low, additionally variance in Fis is high when sex occurs very rarely (cryptic sex) (Balloux, Lehmann, et de Meeûs 2003; de Meeûs et Balloux 2004). So these indexes are only conclusive when clonal reproduction is predominant, i.e. for purely clonal lineages or “cryptic sex”, but it is difficult to discern sexual lineages from lineages exhibiting intermediate reproductive modes. In aphids, some of these predictions were supported by population genetic studies in several species, for instance: *Rhopalosiphum padi* (Delmotte et al. 2002), *Myzus persicae* (Vorbürger, Lancaster, et Sunnucks 2003), *Sitobion avenae* (Papura et al. 2003), *Acyrtosiphon pisum* (Kanbe et Akimoto 2009), *Aphis fabae* (Sandrock, Razmjou, et Vorbürger 2011), *Aphis gossypii* (Thomas, Boissot, et Vanlerberghe-Masutti 2012), *Tuberolachnus salignus* (Aradottir et al. 2012). Aphids reproductive mode can also be studied by

experimental induction of sexual phases (Lees 1959; Voegtlin and Halbert 1998). Although the physiological mechanisms of sexual morphs induction are not well known yet (Jean-Christophe Simon, Stoeckel, et Tagu 2010), the environmental factors leading to a shift from production of viviparous parthenogenetic females to sexual morphs are well established. The critical factor is the photoperiod (Marcovitch 1924); additionally low temperature can enhance the production of sexual forms (Lees 1959; Voegtlin et Halbert 1998; Vaz Nunes et Hardie 2000). Studies on different lineages within aphid species have revealed that there is only a very small number of truly obligate parthenogenetic aphid species. Rather than clear-cut life cycles, a continuum between cyclical parthenogenesis to obligate asexuality exists with different investment in sexual reproduction and sex-ratios. For instance, some lineages thought purely clonal are able to produce males, and these males can mate with the females of closely related sexual lineages and participate to gene flow (Dedryver et al. 1998). Therefore, if one wants to precisely define the life cycle of an aphid species, it is necessary to study several populations. Population genetics constitute useful tools to address such questions but experimental approaches might help catching some events that can escape genetic studies and have biological relevance for understanding the life cycle of these lineages.

In this study, using population genetic tools, we aimed at determining the life cycle of both *B. helichrysi* sister species H1 and H2. As the two species exist in mixed colonies on many herbaceous host plants, a molecular identification step was necessary to tell apart H1 from H2, before any population genetics investigation. This was achieved by the mean of a PCR-RFLP test on a mitochondrial gene fragment that we have developed in a previous study (Piffaretti et al. *submitted*). We then genotyped individuals at 14 microsatellites markers to analyze the genetic diversity of numerous colonies of *B. helichrysi* H1 and H2 collected over several years, on a world wide scale and on numerous host plants. Doing so we aimed at: 1) identifying the reproductive modes of H1 and H2 with population genetics tools and testg them by sex induction experiments, 2) giving a description of the genetic structure and the geographical distribution of the leaf curl plum aphid populations.

Material and methods

Aphid sampling

We collected 368 aphid colonies between 1999 and 2012, from numerous host plants (10 plant families, 37 genera) and different parts of the world (11 countries on 5 continents) with a focus on three zones: 1) France where we had easy access to samples, 2) Southern Kazakhstan, in Central Asia, where high species diversity of both *Prunus* (Bortiri et al. 2001) and *Brachycaudus* (Coeur d'acier et al. 2008) were reported and where *B. helichrysi* is reported as causing important damages (Berim 2003), and 3) western coast of the USA, where *B. helichrysi* is abundant from California state to Washington state according to information compiled in the Essig Museum database (<http://essigdb.berkeley.edu/>: 622 records for *B. helichrysi* specimens with locations, host plant association and collection date). Through our sampling we aimed at maximizing host plant diversity (*Prunus* sp. and herbaceous hosts) and climatic variation. Each sampled colony was georeferenced and host plants were identified with local Flora at least to the genus level and when possible to the species level. Collection details are given in Table S1 and collection points are mapped on Fig. 1. All colonies were immediately preserved in 90° ethanol for storage. Each sample corresponds to specimens collected from one or sometimes two neighbouring host plants of the same species, when very few individuals were found on a single plant. After a first and rapid sorting with a binocular microscope to filter out species other than *B. helichrysi* that could be present on the same plant, we took one to ten individuals from each sampled colonies for molecular investigation. A voucher number has been attributed to each colony and these are kept in the INRA collection (CBGP, Montpellier).

DNA extraction, mitochondrial identification and genotyping

a) DNA extraction.

Total genomic DNA was extracted from a single individual with the Bio Basics extraction kit (Bio Basic Inc., Ontario, Canada) in 96 well plate in 50 µl of extraction buffer, or in 10 % (w/v) Chelex® 100 resin solution (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) in a 96 wells plate (see Piffaretti et al. (2012) for details). All DNA samples were stored at – 20°C.

b) Mitochondrial identification.

An approximately 750 bp long DNA fragment of the mitochondrial *cytochrome B* gene (CytB) was amplified using CP1 (5'-GATGATGAAATTTTGGATC-3') (Harry et al. 1998) and CB2 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3') (Jermiin and Crozier 1994) primers. We redesigned some primers (CytBhelicF (5'-ATCCTAACAGGATTATTTTAGCTT-3') and CytBhelicR (5'-TGAGAATCCTCCTCAGATTCAA-3')) in order to amplify a 375 bp long CytB fragment

in Indian individuals (for details on PCR conditions, see Piffaretti et al. (2012 *submitted*)).

We then digested the PCR products with two restriction enzymes separately. Only *B. helichrysi* H1 CytB fragment exhibits *RsaI* restriction site and only *B. helichrysi* H2 CytB fragment exhibits *BstXI* restriction site. DNA fragments were separated by electrophoresis and were compared with a 10 000 bp size ladder (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) allowing us to discriminate between H1 or H2 individuals (for details on digestion conditions and electrophoresis see Piffaretti et al. (2012 *submitted*)). Geographic distribution of H1 and H2 are given on Fig1.

c) Genotyping.

We used the 14 primers pair previously designed for microsatellite markers and their four associated multiplex PCRs (for details on microsatellites markers and PCR conditions see Piffaretti et al. (2012)). The amplification products were analyzed on an ABI capillary sequencer by the SeqGen platform (CeMEB Labex, Montpellier, France). Alleles were scored by length and genotyping was carried out with GENEMAPPER v4.0 (Applied Biosystems), the results then being checked and corrected by eye.

Genotype Datasets

Each individual was assigned to a genetic clade (H1 or H2) corresponding to the result of the PCR-RFLP and a multilocus genotype (MLG), i.e. the genotype resulting from combining alleles at the 14 microsatellites loci. Due to different handling of missing data by softwares used in further analyses, we kept only individuals with complete MLGs in our dataset.

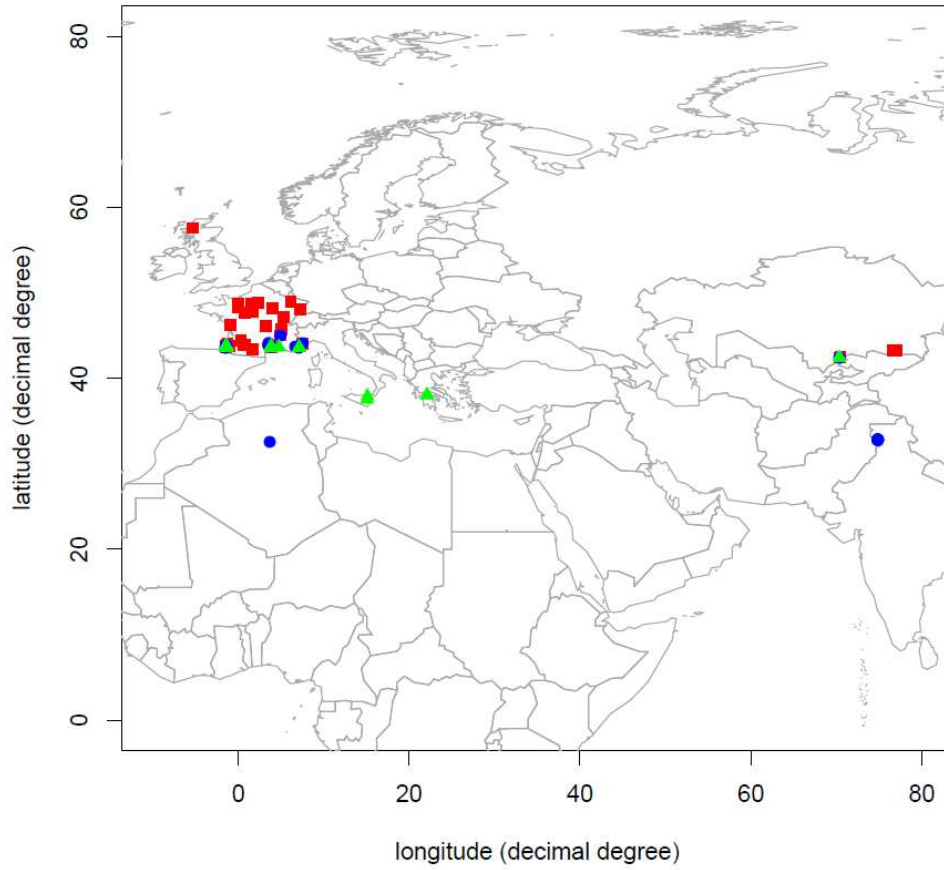
For each sample, we kept a single individual for each detected MLG in the colony (i.e. when two individuals from the same colony had the exact same genotype, we retained only one). We therefore assumed that redundant genotypes in a colony came from parthenogenetic reproduction of the year.

Genetic data analyses

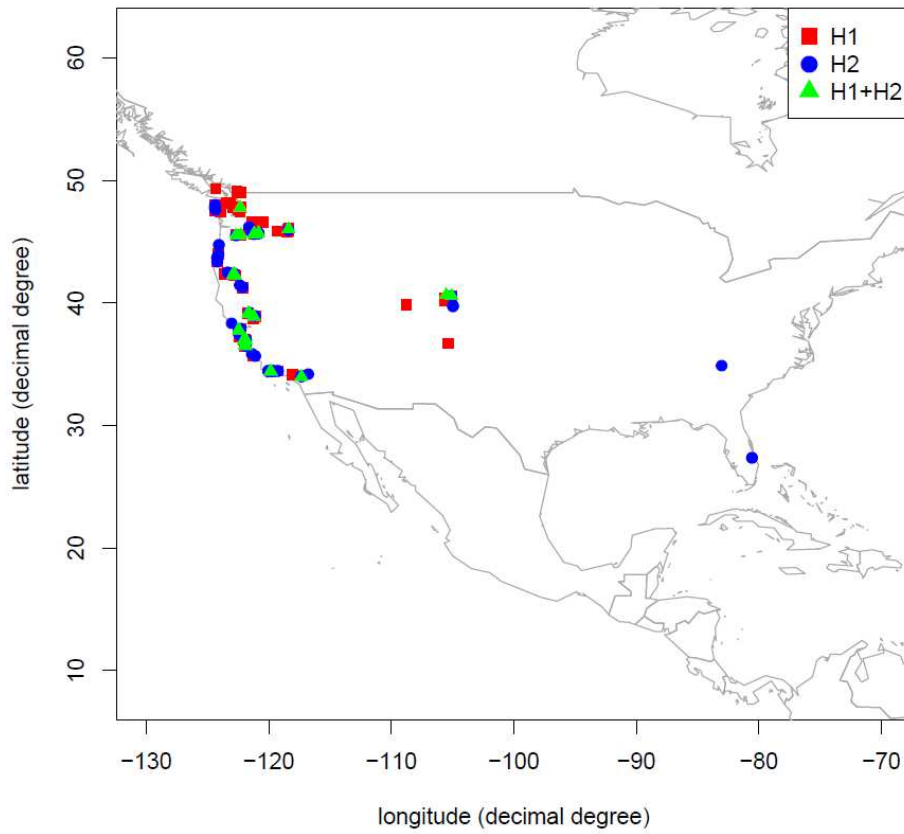
a) MLG diversities.

We used GENCLONE (Arnaud-Haond et Belkhir 2007) to investigate MLG diversity in H1 and H2 data sets on 13 loci, on global dataset and on defined populations (see paragraph b) below). To avoid problems due to limitations of the program in handling allele size less than 100 bp, we excluded the locus Bh-GT2E6 of GENCLONE analyses because its allele sizes ranged from 73 to 109 bp.

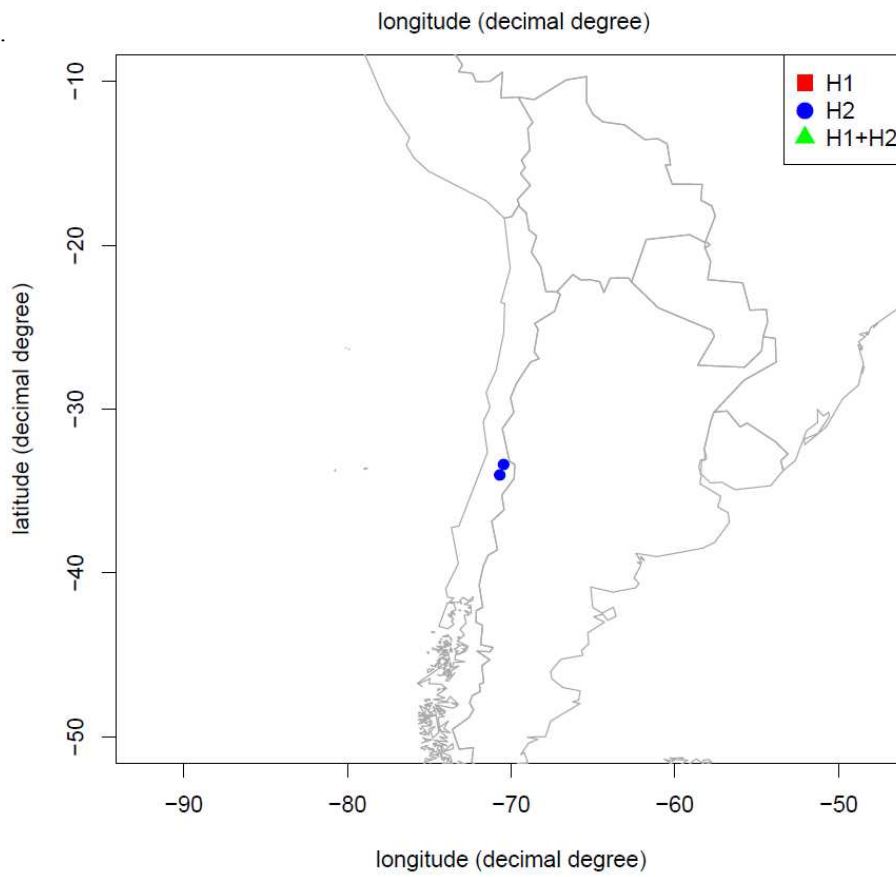
Figure 1. Map of *B. helichrysi* colonies on prospected regions. A. Plotting of *B. helichrysi* colonies on Eurasia map. B. Plotting of *B. helichrysi* colonies on a map of North America map. C. Plotting of *B. helichrysi* colonies on a map of South America. D. Plotting of *B. helichrysi* colonies on a map of Australia. Red square, colony of *B. helichrysi* H1; blue circle, colony of *B. helichrysi* H2; green triangle, mixed colonies of *B. helichrysi* H1 and H2.



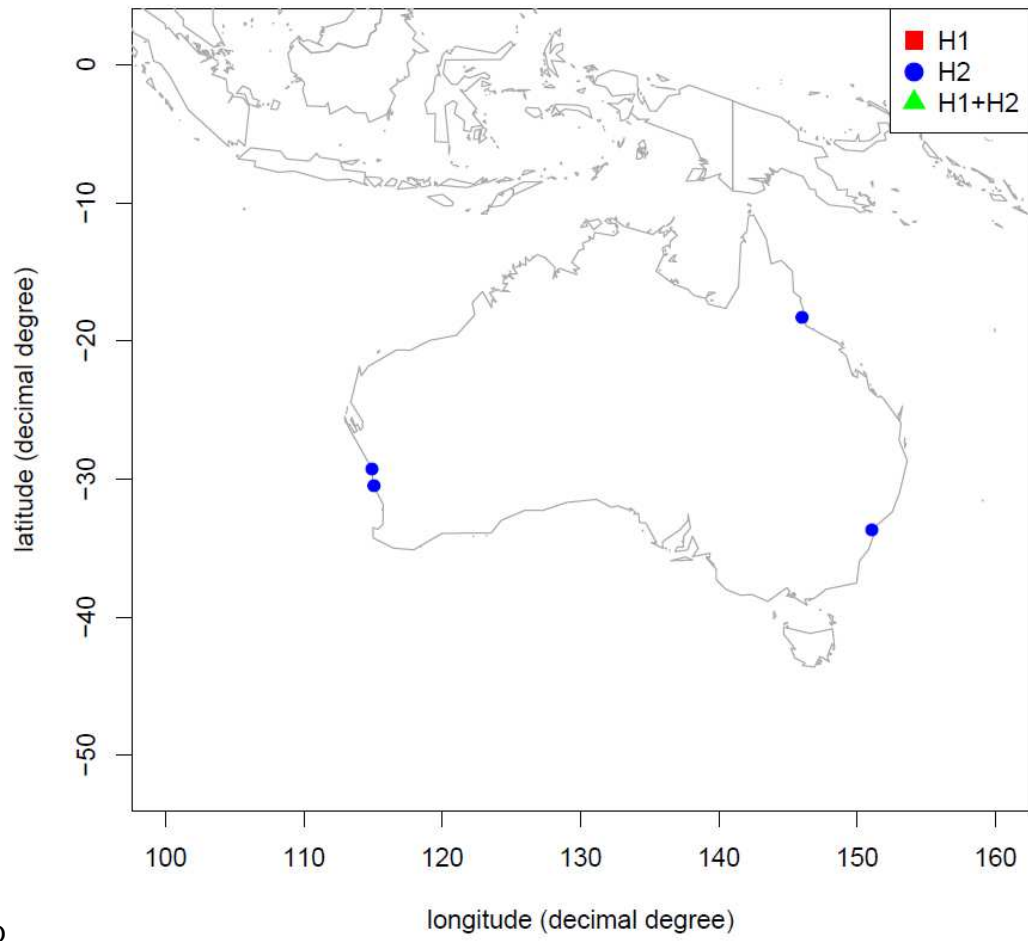
A.



B.



C.



D.

First, GENECLONE was used to detect unique MLGs in each dataset. Then, for all identical MLGs we calculated p_{sex} , the probability that they arose from independent sexual events or that they belonged to the same clone. If the probability was lower than the implemented threshold value ($\alpha = 0.01$), then identical MLGs were considered as belonging to the same asexual lineage or clone.

Additionally, we generated a genetic distance (number of distinct alleles) matrix between each detected MLG. Plotting the frequencies of these genetic distances allowed us to define a threshold under which the observed distance may be due to punctual mutations or scoring errors, i.e. intra-genotypic variation (that is graphically traduced by a bimodal rather than a unimodal distribution) (Arnaud-Haond et al. 2007). This genetic distance matrix allowed us to identify MLGs pairs differing by few distinct alleles under the defined threshold. Then we used p_{sex} on the set of identical loci among those slightly distinct MLGs in order to estimate the likelihood that they would actually be derived from distinct reproductive events. If those slightly distinct MLGs were considered as belonging to the same asexual lineage or clone, we grouped them in the same multilocus lineage (MLL).

We also used three complementary metrics, as recommended by (Arnaud-Haond et al. 2007) to describe clonal diversity. We first investigate global clonal richness in each dataset using the clonal diversity index $R = (G-1)/(N-1)$ proposed by Dorken & Eckert (2001) (where G is the number of unique multilocus genotype and N is the number of genotyped individuals). We distinguished between R_{MLG} using G as the number of MLGs, and R_{MLL} using G as the number of MLLs. Second, clonal evenness index was calculated to estimate the equitability in the distribution of clonal membership among samples. We used the Simpson's complement index V (Hurlbert 1971; Fager 1972), varying from 0 to 1 when all MLLs have equal abundance. Third, clonal heterogeneity was investigated with β pareto index. Arnaud-Haond et al. (2007) proposed to apply the Pareto power law distribution to describe the discrete distribution of individuals, representatives of the occurrence of MLGs, into classes of clonal sizes (sizes correspond to the number of individuals belonging to one clone (MLL)). The β pareto index indicates the scaling of the partitioning of the representatives among MLL size classes. The Pareto distribution is influenced both by richness and evenness and provides graphical depiction of the heterogeneity in the distribution of replicates among lineages as the slope of the log-log reverse cumulative distribution.

We applied these procedures on global H1 and H2 datasets and on populations defined within H1 and H2 (we only conduct detection of MLLs and

estimate the genotypic diversity R for the population datasets).

b) Population genetic analyses.

As our sampling is very large and at some sites continuous, we used STRUCTURE version 2.3.3 (Falush, Stephens, et Pritchard 2003) to assess population delimitation, in each species within *B. helichrysi*. Parameter estimation assumes panmixia, and that each locus is at Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and independent of the others. Due to annual clonal reproduction of aphids, most of these hypotheses must be violated: although a single generation of random mating is enough to establish HWE, departures from linkage equilibrium are more persistent. Nonetheless, this Bayesian approach is robust to some deviations from these assumptions (Falush, Stephens, et Pritchard 2003; Halkett et al. 2005), and we used it mostly for descriptive purposes. For all simulations, parameters were set to a burning-in period of 10 000 iterations of Markov Chain (MCMC) followed by 60 000 MCMC. Ten independent simulations were performed for each explored number of clusters K , from 1 to 20. In order to establish the optimal number of clusters, we applied Evanno's method to the 10 repeats of each K using STRUCTURE HARVESTER online (Earl et vonHoldt 2012). We then ran 20 additional repeats for the selected optimal numbers of clusters. Then we used CLUMPP (Jakobsson et Rosenberg 2007) to assess the consistency of the results (i.e. to check whether each individual was constantly attributed to the same cluster resulting of each run).

We then used the GENEPOP 4.1 (Rousset 2008) software to estimate population genetics indexes relevant to reproductive mode. For these analyses, we kept only individuals for which genotype attribution to a cluster was higher than 75%, and were included in a population as defined by the genetic cluster found by STRUCTURE. The clonal diversity index R , the allelic diversity $1-Q$ inter (genetic diversity of the individuals within a group), departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), linkage disequilibrium (LD), excess or deficit of heterozygote, and F_{IS} were estimated and their significance calculated. P-values for genetic differentiation between populations were computed using G test and F_{ST} values were estimated by a weighted analysis of variance (Cockerham 1973).

Superclone distribution.

In order to study the geographic distribution of the *B. helichrysi* H2 MLLs, we

plotted pie-charts on a world map graphically traducing the relative proportion of each MLL per prospected country or state.

We then tested whether *B. helichrysi* H2 MLLs showed differences in their herbaceous host plant range. Overall differences in the distribution of *B. helichrysi* H2 MLLs were analysed using Generalized Linear Model (GLM), testing the effect of host plant genus, MLL and their interaction on the counts of MLL's representative in each colony per host plant genus. We used a Poisson distribution function and the log associated link. We only kept genera for which we recorded more than five individuals (5 genera: *Achillea*, *Anaphalis*, *Conyza*, *Helichrysum* and *Senecio*), and MLLs for which we had altogether more than 5 individuals distributed among those 5 genera (5 MLLs: MLL-A, MLL-B, MLL-C, MLL-F and MLL-G). Tests were performed with R software (R Development Core Team 2010).

Experimental sex induction.

For each species, several aphid clones were obtained from a single viviparous female taken from the field and reared on *Achillea millefolium* sprout in cages at 16:8 (L:D) photoperiod and 20°C to ensure parthenogenetic reproduction for several generations in growth chambers. After several generations, we took several individuals from each clone for PCR-RFLP discrimination and genotyping (see Materials and Methods above). We reared two clones: one *B. helichrysi* H1 clone obtained from a colony collected on *Prunus domestica* in Montpellier (France) in May 2010, and one *B. helichrysi* H2 clone obtained from a colony collected on *Conyza canadensis* in Prades-le-Lez (France) in July 2011 belonging to a H2 MLL very common in South of France.

Experiments were carried out in growth chambers with photoperiod reduction to 8:16 (L:D) at 20°C. First, six viviparous females (P) were taken from the stock colony and placed on a new plant for 24h to let them laid first instar nymphs (G0) under 16:8 (L:D) and 20°C. After 24h, the six females P were removed and the first instar nymphs (G0) let on the same plant. This plant and their G0 were immediately placed under 8:16 (L:D) at 20°C until they matured and began to reproduce (13 days). Then the viviparous females G0 were transferred every 3 days on a new plant and the produced first instar nymphs (G1) were let to mature 13 days on the plants they were born. As the G1 nymphs matured, the morph of each adult was recorded. Apterous morphs were considered as viviparous, and then they were transferred as previously in order to produce G2 nymphs (the morph of each G2 adult was consequently recorded). Alatae were first collected and conserved in 70° ethanol then investigated under a binocular microscope to separate males from winged female (no morphological characteristics were available to distinguish between winged viviparous females and

gynoparae in *B. helichrysi*). In a second repeat of the experiment, the alates were transferred on a *Prunus spinosa* branch, preserved on water and sand, to let them laid. Alates that settled on *Prunus spinosa* and produced oviparae were considered as gynoparae. Viviparous females were transferred until they stopped laying, then the day of their death was recorded. Transfers were continued until matured G3 were recorded but we did not continue the experiment for further generations.

The same experimental protocol was applied to each clone. One additional experiment at 16:8 (L:D) and 15°C was applied to the *B. helichrysi* H2 clone.

Results

Datasets

After PCR-RFLP discrimination and microsatellite genotyping, our H1 dataset contained 441 individuals from 238 colonies, and our H2 dataset contained 224 individuals from 175 colonies, all with complete MLGs and mitochondrial assignment. These were data set with unique representatives of MLG per colony.

Genetic and clonal diversity.

We detected 408 unique MLGs among the 441 H1 individuals, and only 71 unique MLGs among the 224 H2 individuals. The repeated MLGs in H1 had a $p_{sex} < 0.01$ and corresponded to colonies sampled the same year and in the same region. These repeated MLGs in H1 must be mainly due to clonal reproduction of the year and dispersion events of viviparous females. Conversely, among the H2 repeated MLGs, some correspond to colonies sampled different years and from very distant geographical sites.

Among the 408 H1 MLGs, the number of distinct alleles followed a unimodal distribution. Only 15 MLGs pairs differed by one distinct allele. It corresponded to individuals from the same colony or belonging to colonies that were very close. P_{sex} calculated on the set of identical loci among those slightly distinct MLGs were always < 0.01 , so it may be due to clonal reproduction of the year and dispersion events followed by spontaneous mutation or scoring errors on these individuals. On the other hand, among the 71 H2 MLGs, the number of distinct alleles followed a bimodal distribution, with relatively frequent differences from one to seven alleles between MLGs pairs. We re-calculated p_{sex} on the set of identical loci among those MLGs that differed by at most seven alleles, p_{sex} values were < 0.01 . In H2, the high frequencies of MLGs differing by few alleles may be due to clonal reproduction throughout several years, and

Table 1. H2 unique MultiLocus Genotypes within each MultiLocus Lineages

MLL	Bh-CT3H7	Bh-CT2B4	Bh-GT3D5	Bh-CT4B9	Bh-GT3B5	Bh-GT3B4	Bh-GT3F8	Bh-GT3D8	Bh-CT3H5	Bh-GT3G9	Bh-GT3C9	Bh-GT3A1	Bh-GT3E11	Bh-GT2E6
MLL-A														
Bh163_1	270 / 270	133 / 135	165 / 179	340 / 376	104 / 134	268 / 268	359 / 395	318 / 345	201 / 209	153 / 169	190 / 207	170 / 171	135 / 135	73 / 96
Bh168_5	270 / 270	133 / 135	165 / 179	340 / 376	104 / 134	268 / 268	359 / 397	318 / 345	201 / 209	153 / 169	190 / 207	170 / 171	135 / 135	73 / 96
Bh177_2	270 / 270	133 / 135	165 / 179	340 / 376	134 / 134	268 / 268	359 / 393	318 / 318	201 / 209	153 / 169	190 / 207	170 / 171	135 / 135	73 / 96
Bh190_3	270 / 270	133 / 135	165 / 179	340 / 376	104 / 136	268 / 268	359 / 393	318 / 345	201 / 209	153 / 169	190 / 207	170 / 171	135 / 135	73 / 96
Bh313_3	268 / 270	133 / 135	165 / 179	340 / 376	104 / 134	268 / 268	359 / 395	318 / 345	201 / 209	153 / 169	190 / 207	170 / 171	135 / 135	73 / 96
Bh314_1	268 / 270	133 / 135	165 / 179	340 / 376	104 / 134	268 / 268	359 / 393	318 / 345	201 / 209	153 / 169	190 / 207	170 / 171	135 / 135	73 / 96
Bh331_1	270 / 270	133 / 135	165 / 179	340 / 376	104 / 134	268 / 268	359 / 393	318 / 318	201 / 209	153 / 169	190 / 207	170 / 171	135 / 135	73 / 96
Bh445_3	270 / 270	133 / 135	165 / 179	340 / 376	104 / 134	268 / 268	359 / 393	318 / 345	201 / 209	153 / 169	190 / 207	170 / 171	135 / 135	73 / 96
MLL-B														
2408_8	268 / 278	133 / 135	165 / 177	368 / 368	132 / 132	234 / 268	355 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 173	198 / 213	170 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh152_10	268 / 280	133 / 135	165 / 177	368 / 368	132 / 132	234 / 268	355 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 173	198 / 213	170 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh162_5	268 / 280	133 / 135	165 / 177	368 / 368	104 / 132	234 / 234	355 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 173	198 / 213	170 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh186_1	268 / 280	133 / 135	165 / 177	368 / 368	104 / 132	234 / 268	355 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 173	198 / 213	170 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh446_3	268 / 282	133 / 135	165 / 177	368 / 368	104 / 132	234 / 268	355 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 173	198 / 213	170 / 171	135 / 135	92 / 100
MLL-C														
2973_2	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 136	244 / 258	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 209	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh175_5	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	136 / 136	244 / 258	357 / 369	318 / 318	217 / 217	153 / 171	196 / 209	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh226_3	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	113 / 136	244 / 258	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 209	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh263_2	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 138	244 / 258	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 209	160 / 171	135 / 135	92 / 100
2976_1	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 136	242 / 257	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 211	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh200_2	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 378	104 / 136	244 / 258	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 211	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh200_3	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 136	244 / 258	359 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 211	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh205_2	268 / 276	129 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 136	244 / 258	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 211	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh214_2	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 136	244 / 258	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 211	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh227_1	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 136	244 / 258	357 / 369	318 / 318	203 / 218	153 / 171	196 / 211	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh284_3	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 136	242 / 244	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 211	160 / 171	135 / 135	92 / 100
Bh355_3	268 / 276	133 / 133	165 / 179	340 / 376	104 / 138	244 / 258	357 / 369	318 / 318	201 / 217	153 / 171	196 / 211	160 / 171	135 / 135	92 / 100
MLL-D														
1828_4	268 / 280	133 / 149	165 / 173	336 / 362	104 / 122	260 / 260	337 / 337	330 / 330	201 / 234	153 / 153	215 / 217	171 / 173	142 / 142	78 / 88
1828_8	268 / 280	133 / 149	165 / 173	336 / 362	104 / 122	260 / 260	337 / 337	330 / 330	201 / 201	153 / 153	216 / 216	171 / 173	142 / 142	78 / 88
RF5_5	268 / 280	133 / 149	165 / 173	336 / 362	104 / 122	260 / 260	337 / 399	330 / 330	201 / 234	153 / 153	217 / 217	170 / 172	142 / 142	78 / 88
Bh439_3	268 / 280	133 / 149	165 / 173	336 / 362	104 / 122	260 / 260	337 / 399	330 / 330	201 / 234	153 / 153	217 / 217	171 / 173	142 / 142	78 / 88
MLL-E														
1987_4	268 / 271	133 / 135	165 / 177	368 / 371	104 / 134	244 / 244	363 / 363	318 / 318	201 / 215	153 / 173	190 / 213	166 / 170	135 / 135	73 / 102
2407_12	270 / 270	133 / 135	165 / 177	340 / 376	104 / 134	244 / 283	363 / 363	318 / 318	201 / 215	153 / 173	190 / 213	166 / 171	135 / 135	73 / 102
MLL-F														
2976_2	268 / 268	133 / 133	165 / 177	330 / 368	126 / 126	268 / 268	365 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 175	188 / 223	166 / 174	135 / 135	76 / 100
1946_6	268 / 291	133 / 133	165 / 177	330 / 368	104 / 126	268 / 268	365 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 175	188 / 188	166 / 174	135 / 135	76 / 100
Bh246_3	268 / 291	133 / 133	165 / 177	330 / 368	104 / 126	268 / 268	365 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 175	188 / 221	166 / 174	135 / 135	76 / 100
Bh225_3	268 / 291	133 / 133	165 / 177	330 / 368	104 / 128	268 / 268	365 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 175	188 / 221	166 / 174	135 / 135	76 / 100
1946_11	268 / 291	133 / 133	165 / 177	330 / 368	126 / 126	268 / 268	365 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 175	188 / 221	166 / 174	135 / 135	76 / 100
1946_9	268 / 291	133 / 133	165 / 177	330 / 368	126 / 126	268 / 268	365 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 175	188 / 221	166 / 174	135 / 135	76 / 100
2970_3	268 / 291	133 / 133	165 / 177	330 / 369	126 / 126	268 / 268	367 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 175	188 / 221	166 / 174	135 / 135	76 / 100
Bh152_8	268 / 293	133 / 133	165 / 177	330 / 368	104 / 126	268 / 271	367 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 179	188 / 225	166 / 174	135 / 135	76 / 100
1600_12	268 / 293	133 / 133	165 / 177	330 / 368	126 / 126	268 / 268	367 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 179	188 / 223	166 / 174	135 / 135	76 / 100
1608_13	268 / 293	133 / 133	165 / 177	330 / 368	126 / 126	268 / 271	367 / 367	318 / 318	201 / 203	153 / 179	188 / 223	166 / 174	135 / 135	76 / 100
MLL-G														
Bh388_1	268 / 270	135 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 128	260 / 268	359 / 378	318 / 318	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
Bh388_3	268 / 270	135 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 128	260 / 268	359 / 378	318 / 344	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
2391_3	268 / 270	135 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 128	260 / 268	359 / 380	318 / 318	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
Bh346_2	268 / 270	135 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 126	260 / 268	359 / 380	318 / 318	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
Bh339_2	270 / 270	133 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 128	260 / 268	359 / 378	318 / 318	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
RF2_2	270 / 270	135 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 128	260 / 268	359 / 378	318 / 318	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
2398_1	270 / 270	133 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 128	260 / 268	359 / 380	318 / 318	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
Bh202_1	270 / 270	135 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 128	260 / 268	359 / 380	318 / 318	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
Bh345_1	270 / 270	135 / 135	165 / 177	340 / 374	104 / 128	260 / 268	359 / 384	318 / 318	201 / 209	153 / 165	188 / 213	170 / 171	135 / 135	73 / 98
MLL-H														
Bh188_2	258 / 268	133 / 142	165 / 171	338 / 338	104 / 128	268 / 268	335 / 386	342 / 342	201 / 219	143 / 153	194 / 194	161 / 171	129 / 129	78 / 96
Bh232_2	258 / 268	133 / 142	165 / 171	338 / 357	104 / 128	268 / 268	335 / 386	342 / 342	201 / 219	143 / 153	194 / 194	161 / 171	129 / 129	78 / 96
2980_3	258 / 258	133 / 142	165 / 171	338 / 338	104 / 128	268 / 268	335 / 386	342 / 342	201 / 219	143 / 153	194 / 194	161 / 171	129 / 129	78 / 96

dispersion events over large distances, followed by spontaneous mutations or scoring errors on these individuals. After grouping MLGs differing by less than seven alleles, we revealed the existence of only 8 MLLs (for detailed MLGs see tab 1) and 19 unique MLGs in our worldwide dataset of 224 H2 individuals. We further identified each MLL by a letter from A to H (tab1).

Among H1 MLGs, global clonal richness was high as measured by $R_{MLG}=0.925$. The clonal evenness index is $V=0.926$ which revealed that all MLGs were represented equally within the H1 dataset. The β pareto index is 2.182 ($r^2=1$) describing a good homogeneity among the representatives of the 408 H1 MLGs. Conversely, among H2 MLGs, global clonal richness was low as measured by $R_{MLG}=0.314$ (on the 71 MLGs) and $R_{MLL}=0.117$ (on the 8 MLLs and 19 MLGs). The clonal evenness index was $V=0.864$ revealing good evenness among all MLGs. The β pareto index was 0.349 ($r^2=1$) describing the heterogeneity among the representatives of the 71 H2 MLGs.

H1 standard population genetic

The results of STRUCTURE runs indicated that the posterior distribution of the allele frequencies among clusters was best explained when the number of clusters in H1 dataset, K , equals 2. Individuals into these two clusters belonged respectively to samples from Kazakhstan (cluster KZ) and from samples from all the other prospected area (cluster USA-EU). We further explored clustering results for higher numbers of clusters. When K equaled 3, the cluster KZ was conserved, a second cluster (cluster EU-CA) grouped individuals from Europe, Mediterranean countries, and interestingly some individuals from California and Oregon (USA), and a third one (cluster USA-UK) grouped individuals sampled from USA (some samples from the West coast of USA and Colorado) and one individual from the United Kingdom. When K equals 4, the cluster KZ was still retrieved, a new fourth cluster (cluster CA-FR) grouped individuals from France (west coast only) and California, remaining individuals were grouped in clusters EU-CA and USA-UK as previously for K equals 3 (Fig. 2). For K equals 5 and higher, no clear additional clusters appeared.

We studied population's genetics indicators on three H1 MLGs datasets without multicopies: with individuals grouped into populations defined as the genetic clusters found for K equals respectively 2, 3 and 4, to investigate the relevance of the clustering results and assess genetic properties of the clusters.

Genic differentiation between the two populations KZ and USA-EU was significant but not very strong ($F_{ST}=0.129$). When additional populations were defined in the USA-EU populations, the F_{ST} between these populations (EU-CA, USA-UK, CA-

FR) dropped to very small values but remained significant. Genic differentiation between KZ and any other populations remained significant and exhibited the highest values of F_{ST} between population pairs (ranging from 0.138 to 0.217, TabS2).

When the H1 dataset was divided into two populations, the KZ population exhibited high genotypic diversity and was at HWE, the F_{IS} was close to zero and only few loci linkage were at disequilibrium (1% of the 91 combinations) (Tab S3). Conversely, the USA-EU population showed high genotypic diversity but was not at HWE and exhibited significant heterozygote deficit and high proportion of loci with linkage disequilibrium (45% of the 91 combinations) (Tab S3). Genotypic and allelic diversities were very high in both populations (tab S3).

When the H1 dataset was divided into three populations, the EU-CA and USA-UK populations showed high genotypic diversities but were not at HWE and exhibited significant heterozygotes deficit and some loci showed linkage disequilibrium (25% of the 91 combinations for the EU-CA population, and 15% of the 91 combinations for the USA-UK population) (Tab S3). Genotypic and allelic diversities were high in the three populations (tab S3).

When the H1 dataset was divided into four populations, the EU-CA and USA-UK populations, composed of the remaining individuals, still exhibited the same trend but there were less loci combinations with disequilibrium (23% of the 91 combinations for the EU-CA population, and 6% of the 91 combinations for the USA-UK population). Genotypic and allelic diversities were still high in the three populations (tab S3). The fourth cluster, CA-FR population, showed a very different signature. First, the genotypic diversity was twice less important than in other H1 populations (but allelic diversity was similar to other H1 populations). Second it was not at HWE and showed significant heterozygote excess and negative F_{IS} and had some loci at linkage disequilibrium (31% of the 78 combinations) (Tab. S3). This suggests that this CA-FR population was mainly under asexual reproductive mode.

H2 standard population genetics

Results of STRUCTURE runs indicated that the posterior distribution of the allele frequencies among clusters was best explained when the number of clusters in H2 dataset, K , equals 16. As expected 8 clusters grouped individuals belonging to the 8 MLLs identified by GENCLONE, one cluster grouped individuals

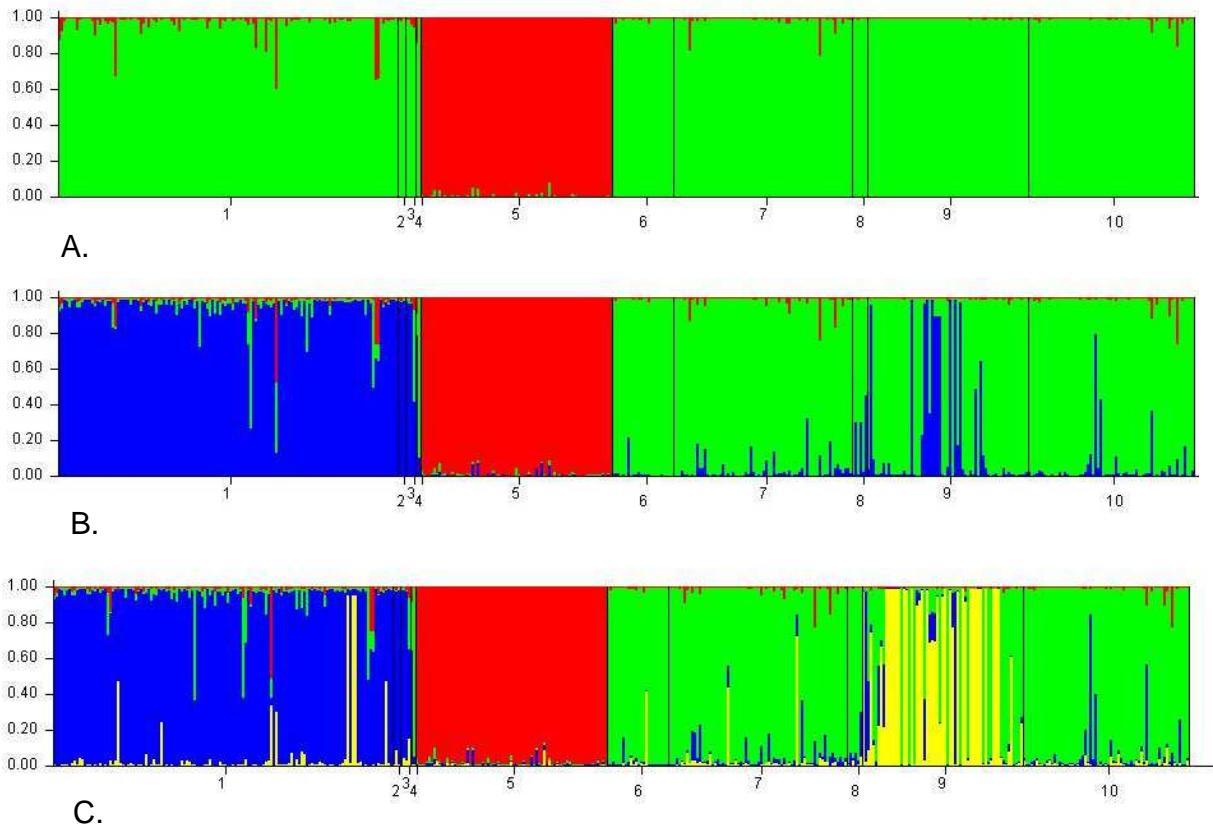


Figure 2. Genetic clustering in H1 dataset by Bayesian Inference. Each individual representative of a unique MLG is represented as a vertical bar partitioned into K segments. The length of each segment is proportional to the estimated membership coefficients of MLG in each of the K clusters, each cluster is symbolized by a colour. MLGs are organized on the x axis according to the country they were sampled: 1: France (n=133), 2: Greece (n=3), 3: Sicilia (n=4), 4: United-Kingdom (n=2), 5: Kazakhstan (n=75), 6: Colorado State (n=24), 7: Washington State (n=70), 8: British Columbia (n=6), 9: California (n=63), 10: Oregon State (n=65). A. for K equals 2, B. for K equals 3, C. for K equals 4.

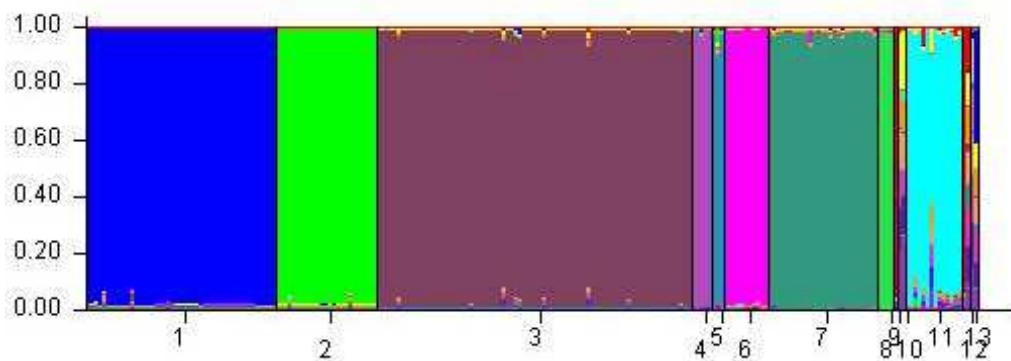


Figure 3. Genetic clustering in H2 dataset by Bayesian Inference. Each individual representative of a unique MLG is represented as a vertical bar partitioned into K equals 16 clusters. The length of each segment is proportional to the estimated membership coefficients of MLG in each of the K equals 16 clusters, each cluster is symbolized by a colour. MLGs are organized on the x axis as following: 1: MLLA (n=47), 2: MLLB (n=25), 3: MLLC (n=78), 4: MLLD (n=5), 5: MLLE (n=3), 6: MLLF (n=11), 7: MLLG (n=27), 8: MLLH (n=4), 9: Algeria (n=1), 10: Kazakhstan (n=2), 11: India (n=14), 12: France (n=2), 13: Greece (n=1), 14: Washington state (n=1).

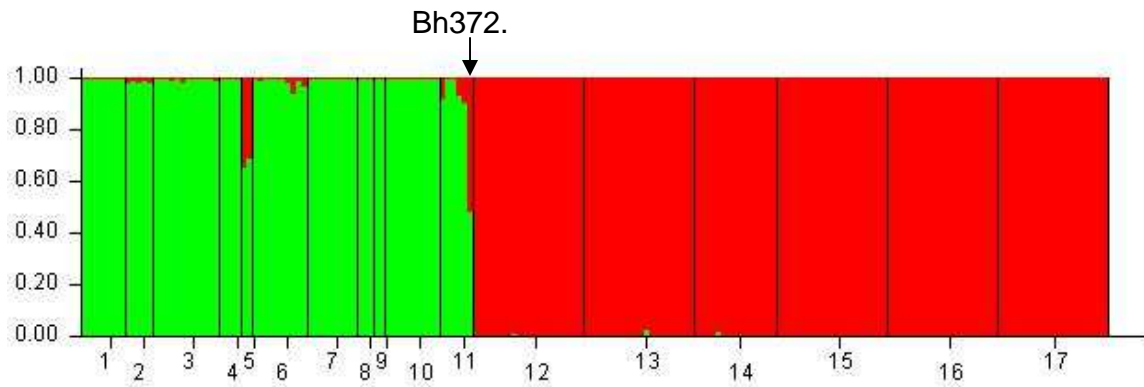


Figure 4. Genetic clustering in *B. helichrysi* (H1 + H2) dataset by Bayesian Inference. Each individual representative of a unique MLG is represented as a vertical bar partitioned into K segments. The length of each segment is proportional to the estimated membership coefficients of MLG in each of the K equals 2 clusters, each cluster is symbolized by a colour. MLGs are organized on the x axis as following: *B. helichrysi* H2: 1: MLLA (n=8), 2: MLLB (n=5), 3: MLLC (n=12), 4: MLLD (n=4), 5: MLLE (n=2), 6: MLLF (n=10), 7: MLLG (n=9), 8: MLLH (n=3), 9: Algeria-France (n=2), 10: India (n=10), 11: H2 non attributed (n=6), *B. helichrysi* H1: 12: France (n=20), 13: Kazakhstan (n=20), 14: Colorado State (n=15), 15: Washington state (n=20), 16: California State (n=20), 17: Oregon State (n=20).

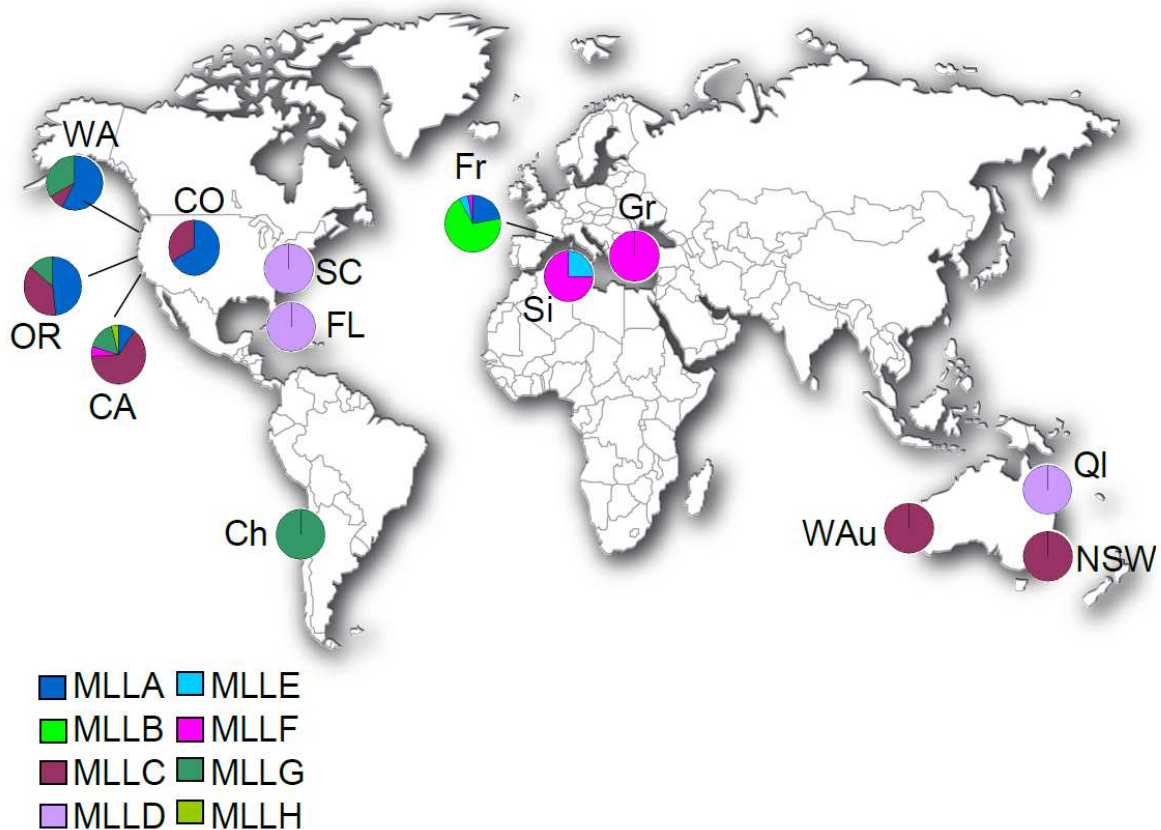


Figure 5. Worldwide distribution of H2 superclones. Frequencies of superclones' genotypes in each prospected country symbolized by pie-chart. Each colour represents a superclone and the size of the pie is not proportional to the size of the sample in each country. Fr: France n = 36, Si: Sicilia n = 4, Gr: Greece n = 2, QI: Queensland n = 2, NSW: New South Wales n = 1, WAu: Western Australia n = 3, Ch: Chile n = 2, CA: California n = 89, OR: Oregon n = 29, WA: Washington n = 21, CO: Colorado n = 6, SC: South Carolina n = 1, FL: Florida n = 2.

sampled on peach trees in India, one cluster grouped one individual from Algeria and one from the west coast of France, and five individuals (two from Kazakhstan, one from France, one from Greece and one from Washington state, USA) were uncertainly attributed to the 6 remaining genetic clusters which did not describe populations (Fig. 3). There was no evidence of a geographic structure for the genetic clusters corresponding to the 8 MLLs.

Genic differentiations between the ten pairs of populations were all significant and strong, F_{ST} ranged from 0.306 to 0.59 for the dataset with multicopies and ranged from 0.281 to 0.583 for the dataset without multicopies (Tab S4).

Due to very low genotypic diversity among the populations corresponding to the MLLs, the number of genotypes was very small and this must affect the robustness of our estimates but this dataset carries evidence for the existence of two different reproductive modes within H2. Populations corresponding to distinct MLLs showed excess of heterozygotes whereas the Indian population showed heterozygotes deficit. Additionally the populations corresponding to distinct MLLs exhibited negative values for F_{IS} whereas the Indian populations exhibited positive F_{IS} . Additionally, for the Indian population, 78 loci combination could be tested for LD, and none were in disequilibrium (tab S5).

Hence the populations corresponding to the 8 MLLs showed a signature of asexual reproduction conversely to the Indian population that showed indications of sexual reproduction.

Host plant association and relationships between H1 and H2 populations.

Our sampling reveals that H1 and H2 shared the same herbaceous host plant range (except for sunflower in France on which we found only H1 colonies ($n=17$) and no H2) (tab 6). On a same host plant, we found individuals from both H1 and H2 species (as previously reported on Piffaretti et al (2012 *submitted*) (tab. S1). All the H2 colonies sampled on *Prunus* were on peach trees (*P. persicae*, from the genus *Prunus*, section *Amygdalus*) in India. Alternatively, all the H1 colonies sampled on *Prunus* were collected on several species of plum trees (3 colonies on *P. spinosa*, 7 colonies on *P. americana*, 7 colony on *P. cerasifera*, 8 colonies on *P. domestica*, 17 colonies on unidentified plum trees), all the identified *Prunus* species belong to the section *Prunus*.

Regarding to the co-occurrence of the two species, we additionally tested whether gene flow still occurs or has recently occurred between H1 and H2, which could be one of the explanations for atypical MLGs among H2 individuals, i.e. those that were not

attributed to any of the 8 MLLs or related to the Indian population. The dataset used for this analysis gathered unique H2 MLGs and a subsample of 20 H1 MLGs from different countries. Structure results indicated that the posterior distribution of the allele frequencies among clusters was best explained when K equals 2. Individuals into these two genetic clusters belonged respectively to the two species H1 and H2. The clustering results were congruent with results of mitochondrial assignation: the H2 MLGs that were not clearly attributed into a genetic cluster by STRUCTURE in the H2 dataset for K equals 16, were clearly attributed to H2. Some admixed MLGs appeared (1.6%) in H2 species: the 2 MLGs representative of MLL-E were attributed to H1 MLG at approximately 30%, and one individual sampled in Washington state exhibited 50% probability to belong to *B. helichrysi* H1 (Fig 4).

H2 superclones distribution

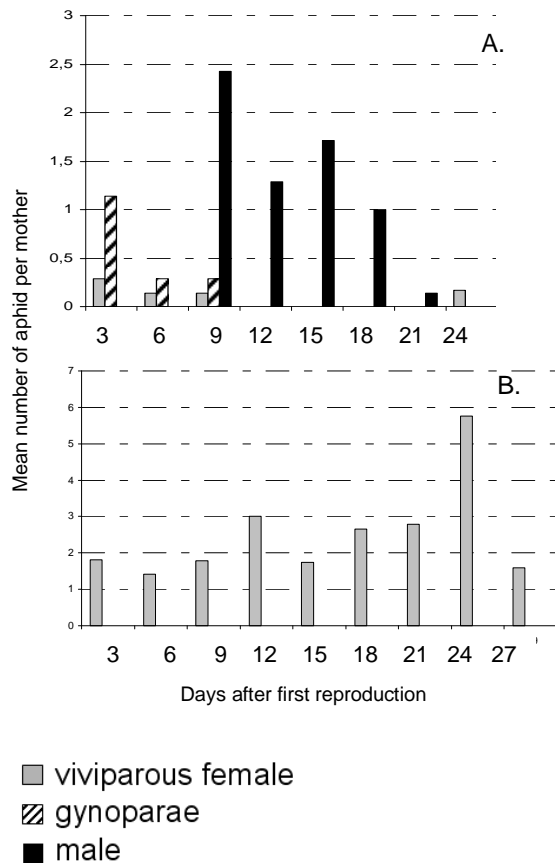
Most H2 MLLs were present in several countries, and sometimes on several continents, over many years (Fig 5). MLL-A was found on the West coast of the United States and in the Colorado State, and on the West coast of France between 2000 and 2011. MLL-B was present only in South of France (Western coast and Mediterranean French regions) between 2000 and 2012. MLLC was collected along the west coast of the United States, in Colorado State in 2011, and in Australia between 2005 and 2011. MLL-D was found on the Eastern side of the USA (Florida and South Carolina) and in Australia between 2002 and 2011. MLL-E was found in the Mediterranean area: Sicily and South of France between 2005 and 2008. MLL-F was sampled in the Mediterranean area (South of France, Sicily and Greece) from 2002 to 2011 and in California in 2011. MLL-G was found mainly along the western coast of America between 2006 and 2011: from Chile to the Washington state in the USA. MLL-H was found in California in 2011.

In this study, we show that no particular MLL seemed associated with any specific host plant genus (tab 2) as the interactions between host plant genus and MLL had no significant effect on the observed distribution of MLLs on host plants in our GLMs. Only, two host plant genera (*Anaphalis* and *Senecio*, $p<0.05$) and one MLL (MLL-F, p -value <0.05) had a significant effect, meaning that there were differences in the number of sampled colonies among host plant genera and MLL. Additionally, our sampling reveals that among H2 individuals, individuals belonging to different superclones co-occur on the same host plants (tabS1).

Sex induction experiments.

8:16 (L:D) photoperiod and 20°C rapidly induced sexual morph production in the *B. helichrysi* H1 clone. First viviparous alate and gynoparae were produced by G0 viviparous females. Then many males were produced by G0 viviparous females (Fig 6A). Conversely, under the same conditions, *B. helichrysi* H2 clone never produced any sexual morphs in G1 (Fig 6B), G2 neither G3 generations. The same results were observed for the *B. helichrysi* H2 clone at 8:16 (L:D) photoperiod and 15°C.

Figure 6. Record of morphes production under 20°C and 8:16 (L:D) photoperiod, for the H1 clone (A) and H2 clone (B). X axe: number of days after which the parents G0 became adults and start to lay. Y axe: mean number of each morph produce by G0 parents. In grey: apterae viviparous, in black and white dashes: winged gynoparae, in black: winged males.



Discussion

Variation in *B. helichrysi* life cycles and genotypic diversity.

Using a worldwide sample we show that the two taxa within the leaf curl plum aphid *B. helichrysi*, H1 and H2, differ drastically in their life cycle. H1 exhibits the genetic signature of a mainly cyclical

parthenogenetic clade. Experimental test confirmed that H1 can easily produce winged males and gynoparae, then apterous oviparae. Additionally, H1 samples were found on herbaceous and plum trees over several years. Altogether these results confirm the heteroecious life cycle of *B. helichrysi* H1 species, using plum trees as primary host as classically described for *B. helichrysi*. Conversely, *B. helichrysi* H2 gathered geographically widespread clonal lineages on herbaceous host plants and at least one cyclical parthenogenetic lineage that uses peach trees as a primary host in India. The asexual lineages constituted at least 8 superclones which persistence over years and scattered distribution throughout the world is truly impressive. Sex induction experiment on one of the H2 superclones produced only parthenogenetic viviparous females. The ability to produce sexual morphs needs to be tested on the other superclones but their persistence suggests that they are under long term obligate parthenogenesis. The predominance of obligate asexual reproduction in *B. helichrysi* H2 is in agreement with previous studies showing that *B. helichrysi* H2 is abundant in regions with cool wet winters and is excluded from regions with harsh winters (Piffaretti et al. 2012 *submitted*). We also confirm, as suggested by Piffaretti et al. (2012), that *B. helichrysi* H2 was never found associated with domesticated and wild plums (e.g. *Prunus domestica*, *P. spinosa*).

All these lineages share the same range of herbaceous host plants (except for sunflower in France), confirming observation in Piffaretti et al. (2012 *submitted*)) and they regularly co-occur on the same host plant throughout their distribution range constituting mixed colonies of H1 individuals and various H2 superclones.

Geographic structure of *B. helichrysi* H1 populations.

Population genetic analyses reveal some interesting geographic patterns within *B. helichrysi* H1 populations. A Kazakh population, at HWE, is consistently retrieved through Bayesian clustering methods. The remaining H1 individuals from other sampled regions constitute a single population that does not appear at HWE, exhibiting significant heterozygotes deficit and presenting LD for several loci. Departure from HWE and heterozygotes deficit could be explained by a Wahlund effect, i.e. grouping several independent populations into one population. When we explored higher numbers of genetic clusters, we distinguished sub-populations (mainly distinguishing European and North American samples) but they were not well genetically differentiated as they exhibit low F_{ST} values. This suggests that a Wahlund effect is not the main cause of departure from HWE in the large North American-European cluster. The observed LD could be the consequence of annual

Table 2. Distribution of MLL representatives on host plant genera.

genus	Alg	autre	H1	Inde	MLLA	MLLB	MLLC	MLLD	MILLE	MLLF	MLLG	MLLH
Achillea	0	2	55	0	12	0	12	0	0	2	7	0
Anaphalis	0	0	5	0	1	0	6	0	0	1	3	3
Anthemis	0	0	10	0	2	0	0	0	0	0	1	0
Artemisia	0	0	5	0	0	0	3	0	0	0	1	0
Chrysanthemum	0	0	1	0	0	0	1	0	0	3	0	0
Conyza	0	1	151	0	21	7	37	0	0	2	7	0
Euryops	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Helianthus	0	0	58	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Helichrysum	0	0	2	0	4	1	0	0	0	0	0	1
Matricaria	0	0	16	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Myosotis	0	1	6	0	0	1	2	0	0	1	0	0
Prunus	0	0	85	14	0	0	0	0	0	0	0	0
Senecio	1	0	7	0	3	10	1	0	0	1	0	0
Solidago	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0

parthenogenetic reproduction which creates LD that are not broken by sexual reproduction events and persist over years. Alternatively, the fact that the Kazakh population exhibits nearly no LD and is at HWE, and not the others, could mean that H1 originates from Kazakhstan and that the other populations were founded later by some sub-populations carrying the genetic signature of a bottleneck event and genetic drift. These younger populations might not have had time to restore equilibrium on all loci through recombination events. The Kazakh origin of *B. helichrysi* H1 is suggested by several arguments. First many *Brachycaudus* species are found in Central Asia (Coeur d'acier et al. 2008), which suggests that diversification events in this genus may have occurred there. Second several studies suggest that the origin of the *Prunus* genus may be in Eurasia, even if the origin of some sub-genera from North America is still debated (Bortiri et al. 2001). Interestingly, it seems that *B. helichrysi* H1 is rare in the Eastern part of the United States. Essig's data base (<http://essigdb.berkeley.edu/>) shows no record of *B. helichrysi* in the eastern part of the US, though no such biases are found for other cosmopolitan aphids (namely *Aphis. gossypii*, *A. fabae*, *Myzus persicae*, *Acyrtosiphum pisum*). Though it is reported in USA national collection from 11 states (<http://www.sel.barc.usda.gov/aphid/>) and it is reported occasionally by one study in the Smocky Mountains (Favret et al. 2010), field trips in the eastern part of the USA failed in sampling any H1 colonies (Coeur d'acier, pers com). We only managed to get a couple of H2 colonies from Florida and South Carolina, belonging to a single superclone (samples from S. Halbert and R. Footitt). This distribution pattern is in agreement with the hypothesis that *B. helichrysi* H1 (or actually H2) has recently been introduced in North America probably on the West coast and did not have time to invade the East part of the USA. These remain hypotheses based on current distribution patterns that deserve to be tested. Approximate Bayesian computational method (Csillery et al. 2010) could be used in order to test the genetic origin of *B. helichrysi* H1 and retrace invasions routes in Europe and North America (see Margaritopoulos et al. 2009; Zepeda-Paulo et al. 2010 for applications on aphids). Additionally the sub-population of French and Californian individuals that appeared in some of the Bayesian clustering analyses, shows some sign of asexual reproduction. The distribution of this sub-population, suggests that H1 might encompass an ancient asexual lineage that has dispersed between France and California. Again, such scenario deserves to be tested by ABC approach.

In any case, these first results highlight the dispersal abilities of this species on a very large scale.

Geographic distribution of *B. helichrysi* H2 superclones.

B. helichrysi H2 also exhibits great dispersal abilities: we found that most H2 superclones were distributed worldwide. Five of the 8 superclones are widely distributed over several continents and the three remaining superclones exhibit a more restricted repartition, two of them occurring in the Mediterranean region and one in California. The various distribution patterns may be explained by unequal adaptive potential: the largely distributed superclones might be highly generalist genotypes (in the sense of Lynch 1984) whereas superclones with more restricted distribution might have more variable fitness that is dependent on environmental conditions. Alternatively, the clones with more restricted distribution might have recently emerged and did not have yet opportunities to disperse. Adaptation of the superclones to various environmental factors could be assessed by experimentations under controlled conditions. This has been investigated on some aphid superclones to demonstrate their adaptation to their host plants (Sunnucks et al. 1998; Fenton et al. 2010). Adaptation to biotic pressures such as competition with other clones or aphid species or resistance towards pathogens or parasitoids could also be measured in controlled conditions as well as the clones fitness under abiotic pressures such as insecticides (Fenton et al. 2010; Brevault et al. 2011). However we do not expect host plant specialization in H2 superclones, as our data does not reveal any host plants genera association with any particular genotype.

We do not know the mechanisms of asexual lineages emergences in H2, more particularly whether H2 superclones have originated from the sexual population on peach trees. We do not know either the number of evolutionary transitions in reproductive modes in H2 (i.e. number of losses or gains of asexuality). Studies on the evolution of asexuality in aphids suggest three main roads towards the loss of sexuality (reviewed in (Simon et al. 2003)): 1/ spontaneous origin by mutations, 2/ hybridization from two sexual lineages leading to viable parthenogenetic hybrids, or from asexual individuals into sexual lineages (contagious parthenogenesis which needs cryptic sex or male production in asexual lineages) and 3/ infectious origin via micro-organism. All these mechanisms are not exclusive. Interestingly, our population genetic survey suggests a couple of hybrid genotypes in H2 asexual population (MLL-E), suggesting that hybridization has occurred between *B. helichrysi* H1 and H2 and therefore suggesting that hybridization could be involved in some evolutionary changes in H2. Evolutionary scenarios behind the loss of asexuality could be assessed through a phylogenetic study aimed at determining the relationship between the asexual and sexual

lineages in *B. helichrysi* H2 and H1 as done in *Rhopalosiphum padi* by Delmotte *et al.* (2003).

Patterns of host plant association of both taxa and consequences for their pest status.

Both *B. helichrysi* H1 and sexual H2 are potential threats for plum and peach orchards. Previous records of *B. helichrysi*, from 1928 to 1956, in Western US and Colorado State on *Prunus* were exclusively sampled from plum trees (Essig's data base (<http://essigdb.berkeley.edu>): 22 colonies and one colony respectively), in agreement with the fact that *B. helichrysi* is uncommon on peach trees in these regions. If we confirm by this study the regular occurrence of H1 on plum trees (wild and domesticated), we failed to find any H1 colonies on peach trees (*Prunus persica*) in prospected areas. Our survey suggests that this taxon does not use peach trees as a regular primary host in Western US, France and southern Kazakhstan.

Regarding H2, the only population recorded from a *Prunus* sp. hosts is the Indian population associated with peach trees. It is also the only population showing signs of sexual reproduction. All the other H2 individuals collected worldwide were found associated with herbaceous hosts only and all but 7 isolated individuals belonged to the 8 superclones. The lack of association of H2 with *Prunus*, enhanced by its evident lack of sexuality in France, western US and its rarity in southern Kazakhstan, suggest that H2 does not represent a threat on *Prunus* species in these areas.

These results also suggest that *B. helichrysi* found in India on peach trees and *B. helichrysi* found on plum trees in other parts of the world actually correspond to two different sibling species. They are associated from *Prunus* sp. belonging to very different sections of the classification. *B. helichrysi* has been widely recorded in India on peach trees (Gupta et Thakur 1993; Verma et Singh 1990) and it is reported to seriously damage peach orchards there. A single *B. helichrysi* colony is reported from peach trees in the Essig's database (<http://essigdb.berkeley.edu>): it was sampled in Pakistan in 1915. Some *B. helichrysi* were also recorded on peach trees in South Africa (Remaudière 1985), in Turkey (Guncan, Yoldas, et Madanlar 2010), and reported as a potential threat to peach trees in the USA (Stoetzel et Gary L. Miller 1998). However we have no way of knowing whether these records referred to H1 or H2 and consequently whether H1 and H2 both occur in all these regions. The hypotheses that H1 and H2 sexual lineages might not use the same set of primary hosts and that sexual reproduction of H2 on peach trees could be geographically limited deserves to be tested by sampling more intensively on peach and plum trees, and more particularly in India where we now know that H2 undergoes sexual reproduction.

B. helichrysi is not only reported as a threat towards orchards, it is also reported as a pest of

sunflowers and ornamental flowers. We show here that *B. helichrysi* H1 and H2 are both very common on weeds (*Conyza Canadensis*, *Senecio vulgaris* and *Matricaria* sp.) and ornamental herbaceous plants (*Artemisia* and *Achillea* sp.) in highly open anthropogenic area. Although our study suggests that none of the H2 superclones occur on sunflowers in France, H2 superclones might be a threat for cultivated ornamental herbaceous plants worldwide. Our worldwide study also highlights that *B. helichrysi* H1 and H2 superclones disperse over long distances. Numerous studies show long-distance migration of aphids species using jet streams to travel all over (Robert 1987). Another way to for phytophagous insects to disperse is via human transport of plants for agricultural or ornamental purposes. Several cases of introduction of species are recorded in aphids such as the worldwide invasion of *Myzus persicae* clones (Margaritopoulos et al. 2009). *Sitobion* aphids species invaded Australasia and it seems that these invasions were accompanied by the loss of sexual reproduction (Sunnucks et al. 1996; Wilson, Sunnucks, et Hales 1999). *Hyalopterus pruni*, that similarly to *B. helichrysi* uses plum trees as a host, was introduced several times in North America from different European sources (Lozier, Roderick, et Mills 2009) and is reported to damagedried plum production in introduction's area. The distribution patterns of H2 superclones and some of the connections between western American and European populations strongly suggest that *B. helichrysi* might easily be transported via human activities. It underlies the fact that this cosmopolitan aphid needs to be monitored as it exhibits high dispersal abilities and adaptability to anthropogenic areas.

Conclusion

We show that the two sister species *B. helichrysi* H1 and H2 have very different life cycles. *Brachycaudus helichrysi* H1 seems mainly heteroecious using regularly plum trees as primary hosts, conversely *B. helichrysi* H2 gathers one heteroecious lineage, using peach trees as a primary host, and at least 8 persistent clonal lineages distributed worldwide. Our worldwide sampling also provides evidence for spatial and temporal movement of both species. It shows that the two species exhibit great dispersal abilities: some of the superclones occur on all continents, *B. helichrysi* H1 is recurrently found throughout the North Hemisphere and we reveal some possible connections between European and American populations, but sexual *B. helichrysi* H2 that use peach trees seem more restricted to India. This is also the first time that we suggest, in light of genetic data, that peach associated *B. helichrysi* H2 and plum associated *B. helichrysi* H1 are two

different species. We also suggest that *B. helichrysi* H2 does not constitute a threat on peach trees in Europe and West of North America where it seems absent for now. Samples from the under-prospected Indian area and from unprospected areas like Africa will be useful to test scenarios for the origin and invasion routes of H1 and H2 sexual lineages and superclones.

Acknowledgments

This work was funded by an ANR JCJC-05 (*Brachycaudus*) grant to EJ, the SPE Department of INRA (“SDIPS project”) and a PhD grant to JP from INRA-SPE and the Languedoc Roussillon region. We thank A. Coeur d’Acier, R. Foottit, S. Halbert, R. Hufbauer, O. Le Gall and the CETIOM’s people for generously providing specimens. We thank A. Coeur d’Acier for aphid expertise and field work support. We thank J. Pochon, E. Bertanpetit for lab support during their training and field work support in France.

References

- Aradottir, G. I., S. J. Hanley, C. M. Collins, K. J. Dawson, A. Karp, S. R. Leather, I. Shield, et R. Harrington. 2012. « Population Genetics of *Tuberolachnus Salignus*, an Obligate Parthenogenetic Aphid ». *Agricultural and Forest Entomology* 14 (2): 197–205. doi:10.1111/j.1461-9563.2011.00559.x.
- Arnaud-Haond, S., C. M. Duarte, F. Alberto, et E. A. Serrão. 2007. « Standardizing Methods to Address Clonality in Population Studies ». *Molecular Ecology* 16 (24): 5115–5139. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03535.x.
- Arnaud-Haond, S., et K. Belkhir. 2007. « Genclone: a Computer Program to Analyse Genotypic Data, Test for Clonality and Describe Spatial Clonal Organization ». *Molecular Ecology Notes* 7 (1) (janvier 1): 15-17. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01522.x.
- Badenhausser, I., et J. Lerin. 1998. « Comparison of population dynamics of *Brachycaudus helichrysi* and damage symptoms in four sunflower cultivars ». In *Aphids in natural and managed ecosystems. Proceedings of the Fifth International Symposium on Aphids, Leon, Spain, 15-19 September, 1997.*, 513-518. Leon Spain: Universidad de Leon Secretariado de Publicaciones.
- Balloux, F., L. Lehmann, et T. de Meeûs. 2003. « The population genetics of clonal and partially clonal diploids. » *Genetics* 164 (4) (août): 1635-1644.
- Bell, A. C. 1983. « The life-history of the leaf-curling plum aphid *Brachycaudus helichrysi* in Northern Ireland and its ability to transmit potato virus Yc(AB). » *Annals of Applied Biology* 102 (1).
- Bell, G.. 1982. *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. University of California Press. Berkeley, CA: CUP Archive.
- Ben Halima, K. M., et M. H. Ben Hamouda. 2005. « A propos des pucerons des arbres fruitiers de Tunisie ». *Notes Fauniques de Gembloux* 58: 11–16.
- Bennett, S. H. 1955. « The biology, life history and methods of control of the leaf curling plum aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt) ». *J. Hortic. Sci* 30: 252–259.
- Berim, M. N. 2003. « AgroAtlas - Pests - *Brachycaudus helichrysi* Kalt. - Leafcurl Plum Aphid ». *Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds*. http://www.agroatlas.ru/en/content/pests/Brachycaudus_helichrysi/.
- Blackman, R. L., et V. F. Eastop. 2000. *Aphids on the world's crops: an identification and information guide*. 2nd éd. John Wiley & Sons Ltd., England.
- Bonnet, C.. 1745. *Traité d'insectologie ou Observations sur les pucerons, par M. Charles Bonnet...* chez Durand.
- Bortiri, E., S.-H. Oh, J. Jiang, S. Baggett, A. Granger, C. Weeks, M. Buckingham, D. Potter, et D. E. Parfitt. 2001. « Phylogeny and Systematics of *Prunus* (Rosaceae) as Determined by Sequence Analysis of ITS and the Chloroplast trnL-trnF Spacer DNA ». *Systematic Botany* 26 (4) (décembre): 797-807.
- Brevault, T., J. Carletto, J. Tribot, et F. Vanlerberghe-Masutti. 2011. « Insecticide use and competition shape the genetic diversity of the aphid *Aphis gossypii* in a cotton-growing landscape ». *Bulletin of Entomological Research* 101 (4) (août): 407-413. doi:10.1017/S0007485310000635.
- Carletto, J., E. Lombaert, P. Chavigny, T. Brévault, L. Lapchin, et F. Vanlerberghe-Masutti. 2009. « Ecological Specialization of the Aphid *Aphis gossypii* Glover on Cultivated Host Plants ». *Molecular Ecology* 18 (10) (mai 1): 2198-2212. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04190.x.
- Cockerham, C. C.. 1973. « Analyses of Gene Frequencies ». *Genetics* 74 (4) (janvier 8): 679-700.
- Coeur d’acier, A., G. Cocuzza, E. Joussetin, V. Cavalieri, et S. Barbagallo. 2008. « Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes ». *Zoologica Scripta* 37 (2): 175-193. doi:10.1111/j.1463-6409.2007.00317.x.
- Csillery, K., M. G. B. Blum, O. E. Gaggiotti, et O. Francois. 2010. « Approximate Bayesian

- Computation (ABC) in practice ». *Trends in Ecology & Evolution* 25 (7) (juillet): 410-418. doi:10.1016/j.tree.2010.04.001.
- Dedryver, C.-A., M. Hullé, J.-. Le Gallic, M. Caillaud, et J.-C. Simon. 2001. « Coexistence in space and time of sexual and asexual populations of the cereal aphid *Sitobion avenae* ». *Oecologia* 128 (3) (août 1): 379-388. doi:10.1007/s004420100674.
- Dedryver, Le Gallic, Gauthier, et Simon. 1998. « Life Cycle of the Cereal Aphid *Sitobion avenae* F.: Polymorphism and Comparison of Life History Traits Associated with Sexuality ». *Ecological Entomology* 23 (2): 123-132. doi:10.1046/j.1365-2311.1998.00113.x.
- Delmotte, F., N. Leterme, J. Bonhomme, C. Rispe, et J.-C. Simon. 2001. « Multiple Routes to Asexuality in an Aphid Species ». *Proceedings of the Royal Society of London Serie B* 268 (1483): 2291-2299. doi:10.1098/rspb.2001.1778.
- Delmotte, F., N. Leterme, J.-P. Gauthier, C. Rispe, et J.-C. Simon. 2002. « Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers ». *Molecular Ecology* 11 (4) (avril): 711-723. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01478.x.
- Delmotte, F., B. Sabater-Muñoz, N. Prunier-Leterme, A. Latorre, P. Sunnucks, C. Rispe, et J.-C. Simon. 2003. « Phylogenetic Evidence for Hybrid Origins of Asexual Lineages in an Aphid Species ». *Evolution* 57 (6) (juin): 1291-1303.
- Dorken, . E., et C. G. Eckert. 2001. « Severely Reduced Sexual Reproduction in Northern Populations of a Clonal Plant, *Decodonverticillatus* (Lythraceae) ». *Journal of Ecology* 89 (3): 339-350. doi:10.1046/j.1365-2745.2001.00558.x.
- Earl, D., et B. vonHoldt. 2012. « STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method ». *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359-361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7.
- Fager, E. W. 1972. « Diversity: a sampling study ». *American Naturalist*: 293-310.
- Falush, D., M. Stephens, et J. K. Pritchard. 2003. « Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. » *Genetics* 164 (4) (août): 1567-1587.
- Favret, C., J. J. Duggan, N. J. Sanders, et L. R. Phillippe. 2010. « Actual and Inferred Checklist of the Aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Great Smoky Mountains National Park, with Attendant Ant and Host Plant Associations ». *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 112 (3) (juillet 1): 381-403. doi:10.4289/0013-8797.112.3.381.
- Fenton, B., L. Kaspruwicz, G. Malloch, et J. Pickup. 2010. « Reproductive performance of asexual clones of the peach-potato aphid, (*Myzus persicae*, Homoptera: Aphididae), colonising Scotland in relation to host plant and field ecology ». *Bulletin of Entomological Research* 100 (4) (août): 451-460. doi:10.1017/S0007485309990447.
- Figueroa, C C, J-C Simon, J-F Le Gallic, N Prunier-Leterme, L M Briones, C-A Dedryver, et H M Niemeyer. 2005. « Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae* ». *Heredity* 95 (1) (avril 20): 24-33.
- Guncan, A., Z. Yoldas, et N. Madanlar. 2010. « Studies on the aphids (Hemiptera: Aphididae) and their natural enemies on peach orchards in Izmir ». *Turkiye Entomoloji Dergisi-Turkish Journal of Entomology* 34 (3) (septembre): 399-408.
- Gupta, P. R., et J. R. Thakur. 1993. « Sexual generation and overwintering of the peach leaf curling aphid *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) in Himachal Pradesh, India. » *Annals of Applied Biology* 122 (2).
- Haack, L., J. C. Simon, J. P. Gauthier, M. Plantegenest, et C. A. Dedryver. 2000. « Evidence for predominant clones in a cyclically parthenogenetic organism provided by combined demographic and genetic analyses ». *Molecular Ecology* 9 (12) (décembre): 2055-2066. doi:10.1046/j.1365-294X.2000.01108.x.
- Halkett, F., M. Plantegenest, N. Prunier-Leterme, L. Mieuze, F. Delmotte, et J. C. Simon. 2005. « Admixed sexual and facultatively asexual aphid lineages at mating sites ». *Molecular Ecology* 14 (1) (janvier): 325-336. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02358.x.
- Halkett, F., J.-C. Simon, et F. Balloux. 2005. « Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms ». *Trends in Ecology & Evolution* 20 (4) (avril): 194-201. doi:10.1016/j.tree.2005.01.001.
- Harrison, J. S., et E. B. Mondor. 2011. « Evidence for an Invasive Aphid “Superclone”: Extremely Low Genetic Diversity in Oleander Aphid (*Aphis nerii*) Populations in the Southern United States ». *PLoS ONE* 6 (3) (mars 9): e17524. doi:10.1371/journal.pone.0017524.
- Harry, M., M. Solignac, et D. Lachaise. 1998. « Molecular Evidence for Parallel Evolution of Adaptive Syndromes in Fig-Breeding *Lissocephala* (Drosophilidae) ». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9 (3) (juin): 542-551. doi:10.1006/mpev.1998.0508.
- Hurlbert, S. H. 1971. « The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters ». *Ecology* 52 (4): 577-586. doi:10.2307/1934145.
- Jakobsson, M., et N. A. Rosenberg. 2007. « CLUMPP: a Cluster Matching and

- Permutation Program for Dealing with Label Switching and Multimodality in Analysis of Population Structure ». *Bioinformatics* 23 (14) (juillet 15): 1801-1806. doi:10.1093/bioinformatics/btm233.
- Jermiin, L. S, et R. H Crozier. 1994. « The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraoponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content ». *Journal of Molecular Evolution* 38 (3): 282-294.
- Kanbe, T., et S.-I. Akimoto. 2009. « Allelic and Genotypic Diversity in Long-term Asexual Populations of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum* in Comparison with Sexual Populations ». *Molecular Ecology* 18 (5): 801-816. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.04077.x.
- Kasprovicz, L., G. Malloch, J. Pickup, et B. Fenton. 2008. « Spatial and Temporal Dynamics of *Myzus persicae* Clones in Fields and Suction Traps ». *Agricultural and Forest Entomology* 10 (2): 91-100. doi:10.1111/j.1461-9563.2008.00365.x.
- Lees, A. D. 1959. « The role of photoperiod and temperature in the determination of parthenogenetic and sexual forms in the aphid *Megoura viciae* Buckton-I.: The influence of these factors on apterous virginoparae and their progeny ». *Journal of Insect Physiology* 3 (2): 92-117.
- Lerin J, et Badenhauer I. 1995. « Influence of the leaf curling plum aphid (*Brachycaudus helichrysi*) on stem diameter, seed yield, and their relationship, in sunflower. ». *JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE* 125 (octobre): 211-221.
- Levy, L., V. Damsteegt, R. Scorza, et M. Kolber. 2000. « Plum Pox Potyvirus Disease of Stone Fruits. » *APSnet Feature Articles*. doi:10.1094/APSnetFeature-2000-0300. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/pages/plumpoxpotyvirus.aspx>.
- Lozier, J., G. Roderick, et N. Mills. 2009. « Tracing the invasion history of mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae), in North America: a population genetics approach ». *Biological Invasions* 11 (2): 299-314. doi:10.1007/s10530-008-9248-8.
- Lynch, M. 1984. « Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis ». *Quarterly Review of Biology*: 257-290.
- Madsen, H. F., et B. J. Bailey. 1958. « Biology and Control of the Leaf Curl Plum Aphid in Northern California 1 ». *Journal of Economic Entomology* 51 (avril): 226-229.
- Marcovitch, S. 1924. « The migration of the Aphididae and the appearance of the sexual forms as affected by the relative length of daily light exposure ». *J. agric. Res* 27 (5): 13-522.
- Margaritopoulos, J. T., L. Kasprovicz, G. L. Malloch, et B. Fenton. 2009. « Tracking the Global Dispersal of a Cosmopolitan Insect Pest, the Peach Potato Aphid ». *BMC Ecology* 9 (1) (mai 11): 13. doi:10.1186/1472-6785-9-13.
- Meeûs, T., F. Prugnolle, et P. Agnew. 2007. « Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (11) (mars): 1355-1372. doi:10.1007/s00018-007-6515-2.
- de Meeûs, T., et F. Balloux. 2004. « Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: a simulation study ». *Infection, Genetics and Evolution* 4 (4) (décembre): 345-351. doi:10.1016/j.meegid.2004.05.002.
- Miller, G. L., et M. B. Stoetzel. 1997. « Aphids Associated with Chrysanthemums in the United States ». *The Florida Entomologist* 80 (2) (juin 1): 218-239. doi:10.2307/3495555.
- Moran, N. A. 1992. « THE EVOLUTION OF APHID LIFE CYCLES ». *Annual Review of Entomology* 37: 321-348.
- Normark, B. B., O. P. Judson, et N. A. Moran. 2003. « Genomic Signatures of Ancient Asexual Lineages ». *Biological Journal of the Linnean Society* 79 (1): 69-84. doi:10.1046/j.1095-8312.2003.00182.x.
- Vaz Nunes, M., et J. Hardie. 2000. « The effect of temperature on the photoperiodic clock' and counter' of a Scottish clone of the vetch aphid, *Megoura viciae* ». *Journal of Insect Physiology* 46 (5) (mai): 727-733. doi:10.1016/S0022-1910(99)00161-4.
- Papura, D, J-C Simon, F Halkett, F Delmotte, J-F Le Gallic, et C-A Dedryver. 2003. « Predominance of sexual reproduction in Romanian populations of the aphid *Sitobion avenae* inferred from phenotypic and genetic structure ». *Heredity* 90 (5): 397-404.
- Peccoud, J., C. C. Figueroa, A. X. Silva, C. C. Ramirez, L. Mieuze, J. Bonhomme, S. Stoeckel, M. Plantegenest, et J.-C. Simon. 2008. « Host Range Expansion of an Introduced Insect Pest Through Multiple Colonizations of Specialized Clones ». *Molecular Ecology* 17 (21): 4608-4618. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03949.x.
- Piffaretti, J., F. Vanlerberghe-Masutti, A. Tayeh, A.-L. Clamens, Cœur D'Acier, A, et E. Jousset. 2012. « Molecular Phylogeny Reveals the Existence of Two Sibling Species in the Aphid Pest *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae) ». *Zoologica Scripta, Zoologica Scripta* 41 (3) (mai 1): 266-280. doi:10.1111/j.1463-6409.2012.00531.x.
- R Development Core Team. 2010. « R: A Language and Environment for Statistical Computing » (01/19): {ISBN} 3-900051-07-0.

- Ramakers, P. M. J., et Maaswinkel, R. H. M. 2002. « Pest occurrence and control in organic year-round production of chrysanthemums. » In *Bulletin OILB/SROP*, 25:221-224. Victoria (British Columbia), Canada, 6-9 May 2002.: International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP), Dijon, France.
- Remaudière, G. 1985. *Contribution à l'écologie des aphidés africains*. Food & Agriculture Org.
- Robert, Y. 1987. « Dispersion and migration ». In *Aphids: their biology, natural enemies, and control*, 299-313. Elsevier. W. Helle.
- Rousset, F.. 2008. « Genepop'007: a Complete Re-implementation of the Genepop Software for Windows and Linux ». *Molecular Ecology Resources* 8 (1): 103–106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.
- Sandrock, C., J. Razmjou, et C. Vorburger. 2011. « Climate Effects on Life Cycle Variation and Population Genetic Architecture of the Black Bean Aphid, *Aphis fabae* ». *Molecular Ecology* 20 (19): 4165–4181. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05242.x.
- Schurko, A. M., M. Neiman, et J. M. Logsdon Jr. 2009. « Signs of sex: what we know and how we know it ». *Trends in Ecology & Evolution* 24 (4) (avril): 208-217. doi:10.1016/j.tree.2008.11.010.
- Simon, J.-C., F. Delmotte, C. Rispe, et T. Crease. 2003. « Phylogenetic Relationships Between Parthenogens and Their Sexual Relatives: The Possible Routes to Parthenogenesis in Animals ». *Biological Journal of the Linnean Society* 79 (1): 151–163. doi:10.1046/j.1095-8312.2003.00175.x.
- Simon, J.-C., Claude Rispe, et P. Sunnucks. 2002. « Ecology and evolution of sex in aphids ». *TRENDS in Ecology & Evolution* 17 (1): 34-39.
- Simon, J.-C., S. Stoeckel, et D. Tagu. 2010. « Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids ». *Comptes Rendus Biologies* 333 (6–7) (juin): 488-496. doi:10.1016/j.crvi.2010.03.003.
- Stoetzel, M. B., et G. L. Miller. 1998. « Aphids (homoptera: aphididae) colonizing peach in the united states or with potential for introduction ». *Florida Entomologist* 81 (3) (septembre): 325.
- Sunnucks, P., P. R. England, A. C. Taylor, et D. F. Hales. 1996. « Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic *Sitobion* aphids in Australia ». *Genetics* 144 (2) (octobre): 747-756.
- Sunnucks, P., D. Chisholm, E. Turak, et D. F. Hales. 1998. « Evolution of an Ecological Trait in Parthenogenetic *Sitobion* Aphids ». *Heredity* 81 (6): 638-647. doi:10.1046/j.1365-2540.1998.00444.x.
- Thomas, S., N. Boissot, et F. Vanlerberghe-Masutti. 2012. « What Do Spring Migrants Reveal About Sex and Host Selection in the Melon Aphid? » *BMC Evolutionary Biology* 12 (1) (avril 3): 47. doi:10.1186/1471-2148-12-47.
- Verma, K. L., et M. Singh. 1990. « Biology of peach leaf curl aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) (Homoptera: Aphididae). » *Bulletin of Entomology (New Delhi)* 31 (2).
- Voegtlin, D. J., et S. E. Halbert. 1998. « Variable morph production by some North American clones of *Rhopalosiphum padi* in response to reduced photoperiod and temperature ». In *Aphids in natural and managed ecosystems*, 309–315. Leon: Universidad de Leon: J. M. Nieto Nafria and A. F. G. Dixon (eds).
- Vorburger, C., M. Lancaster, et P. Sunnucks. 2003. « Environmentally Related Patterns of Reproductive Modes in the Aphid *Myzus persicae* and the Predominance of Two 'superclones' in Victoria, Australia ». *Molecular Ecology* 12 (12) (décembre 1): 3493-3504. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01998.x.
- Wardlow, L. R., et Gould, H. J. 1981. « Chrysanthemum pests under glass and their control. » *Booklet, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food* (2360): ii + 14 pp.
- Welch, D. B. M., et M. Meselson. 2000. « Evidence for the Evolution of Bdelloid Rotifers Without Sexual Reproduction or Genetic Exchange ». *Science* 288 (5469) (mai 19): 1211-1215. doi:10.1126/science.288.5469.1211.
- Wilson, A. C. C., P. Sunnucks, et D. F. Hales. 1999. « Microevolution, Low Clonal Diversity and Genetic Affinities of Parthenogenetic *Sitobion* Aphids in New Zealand ». *Molecular Ecology* 8 (10): 1655–1666. doi:10.1046/j.1365-294x.1999.00751.x.
- Wilson, A. C. C., P. Sunnucks, et D. F. Hales. 2003. « Heritable Genetic Variation and Potential for Adaptive Evolution in Asexual Aphids (Aphidoidea) ». *Biological Journal of the Linnean Society* 79 (1): 115–135. doi:10.1046/j.1095-8312.2003.00176.x.
- Zepeda-Paulo, FA, J. C. Simon, C. C. Ramírez, E. Fuentes-Contreras, J. T. Margaritopoulos, A. C. C. Wilson, C. E. Sorenson, et al. 2010. « The invasion route for an insect pest species: the tobacco aphid in the New World ». *Molecular ecology* 19 (21): 4738–4752.

II. Le test d'induction de formes sexuées en conditions contrôlées

A. Estimation de la fécondité, du temps de maturation et contrôle de la densité à 20 °C

Afin de définir le protocole expérimental d'induction des formes sexuées, trois informations sont nécessaires. Ces informations sont estimées sur un clone de *B. helichrysi* H1 conservé en élevage en conditions de jour long (JL: 16h de jour pour 8h de nuit), à 20°C.

Premièrement, il est nécessaire d'avoir une estimation de la fécondité de *B. helichrysi* à 20°C, afin d'estimer la taille des colonies obtenues lors des expérimentations. En effet, les pucerons sont contraints à rester sur une seule feuille d'*Achillea* tout au long de leur développement, cette limitation spatiale a des conséquences sur la densité des colonies et donc sur l'induction de formes ailées de dispersion. Afin d'estimer la fécondité d'une femelle vivipare aptère, nous avons placé dix femelles vivipares aptères par feuille. Toutes les 24 h, les mères sont transférées sur une nouvelle plante et le nombre de larves produites est compté. Les transferts ont lieu jusqu'à la mort des mères, le dispositif a été répété deux fois. En moyenne, une femelle pond une à deux larves en 24h à 20°C.

Deuxièmement, il nous faut connaître le temps de maturation moyen (durée entre la date de naissance d'une larve G0 et la date de première ponte de larves G1) de *B. helichrysi* à 20°C. Pour ce faire, nous avons suivi la maturation des larves produites toutes les 24h par le lot de dix femelles vivipares (cf. ci-dessus). Le temps moyen de maturation de *B. helichrysi* à 20°C est de 12 jours.

Troisièmement, afin d'éviter la confusion entre les formes ailées de dispersion et les ailés sexupares, il faut s'assurer que les conditions de densité rencontrées par les pucerons au cours de l'expérience ne déclenchent pas la production d'ailés de dispersion. Nous avons surveillé le devenir des larves produites toutes les 24h par le lot de dix femelles vivipares (cf. ci-dessus), afin d'observer si des formes ailées apparaissent. Comme ce test est effectué en jour long qui induit une reproduction parthénogénétique, seules une densité trop élevée et une mauvaise qualité de la plante pourraient induire la production d'ailés. A 20°C, la descendance de 10 femelles sur une seule feuille contient un nombre très négligeable d'ailés (en moyenne 0.06 ailés pour chaque ponte).

B. Les clones génétiques étudiés

Les clones sont maintenus en élevage depuis plusieurs générations au CBGP en conditions JL à 20°C.

La réponse d'un clone issu d'une population de *B. helichrysi* H1 récoltée sur *Prunus domestica* à Montpellier en 2010 est étudiée. Comme ce clone a été récolté sur hôte primaire et comme notre étude générale suggère que *B. helichrysi* H1 est hétéroécique, ce clone servira de contrôle positif pour l'induction de formes sexuées dans nos conditions expérimentales.

Un second clone méditerranéen (MLL-B, cf. article n°3) de *B. helichrysi* H2 a été testé. Notre étude suggère que ce clone est purement anholocyclique dans la nature : le même génotype est retrouvé en région méditerranéenne depuis plus de dix ans. Il provient d'une colonie échantillonnée à Prades-le-Lez (Hérault, France) en août 2011 sur *Conyza canadensis*.

C. Détail du protocole expérimental

Chaque pousse d'*Achillea* est maintenue dans un terreau humide et placée dans de petites cages individuelles.

Six femelles adultes vivipares (P), prises dans l'élevage en conditions JL à 20°C, sont déposées sur une même plante. Vingt-quatre heures après les six P sont retirés et placés sur une nouvelle plante (afin de lancer une autre série de transferts qui servira de second réplicat). Les larves qui ont été produites dans les 24h sont laissées sur leur plante, elles appartiennent la génération zéro (G0) et elles ont toutes le même âge à plus ou moins 24h. Cette cohorte de G0 est alors placée en conditions jour court (JC: 8h de jour pour 16h de nuit) à 20°C. Treize jours après avoir été engendrées, les larves G0 sont devenues adultes : elles commencent à produire des larves G1. Les premières larves G1 ont plus ou moins le même âge à quelques jours près : elles forment une première cohorte (C1) de larves « G1.C1 ». Les adultes G0 sont alors transférés sur une nouvelle plante pour qu'ils produisent la cohorte de G1 suivante : « G1.C2 ». Tous les trois jours les G0 sont transférés sur une nouvelle plante afin de différencier les cohortes de G1 au cours du temps t : « G1.Ct ». Treize

jours après le premier transfert des adultes G0, les larves G1.C1 sont devenues adultes. Les individus ailés sont conservés dans l'alcool afin d'identifier leur morphe (mâles ou gynopares). Les adultes G1.C1 vivipares aptères sont transférés sur une nouvelle plante pour produire une première cohorte de G2, et la série de transfert reprend pour étudier les générations G2 et G3. (figure 9).

Afin de s'assurer que les femelles ailées produites correspondent bien aux gynopares, nous devons suivre leur descendance : en effet nous ne pouvons pas nous baser sur des caractéristiques morphologiques car aucune description morphologique des gynopares chez *B. helichrysi* n'est disponible. Si les femelles s'installent sur hôte primaire et produisent des femelles ovipares, ce sont bien des gynopares. Nous avons donc placé quelques ailés obtenus en JC dans une cage contenant un rameau de *Prunus spinosa* et nous avons caractérisé leur descendance (les femelles ovipares sont facilement reconnaissables).

Du fait des générations télescopées chez les pucerons, l'étude de la réponse aux conditions environnementales sur plusieurs générations est nécessaire. Comme les P ont reçu le signal JL, nous ne pouvons être sûrs que tous les G0 aient intégré le signal JC dans leur voie de développement : en effet, les mécanismes déterminant le développement de morphes sexués ou parthénogénétiques ont pu être lancés avant le changement de photopériode (c'est ce que l'on appelle l'effet maternel). À partir de la G1 nous sommes alors certains que toutes les générations suivantes auront bien reçu le signal JC.

De précédentes études ont montré qu'une diminution de température ajoutée à une diminution de la photopériode induit la production de morphes sexués chez de nombreux genres de pucerons (cf. introduction générale). Une répétition de l'expérience a été menée à 15°C sur le clone H2 afin de tester si de plus basses températures engendrent une réponse différente.

PROTOCOLE D'INDUCTION DE LA SEXUALITÉ: JOURS COURTS (JC) À 20°C

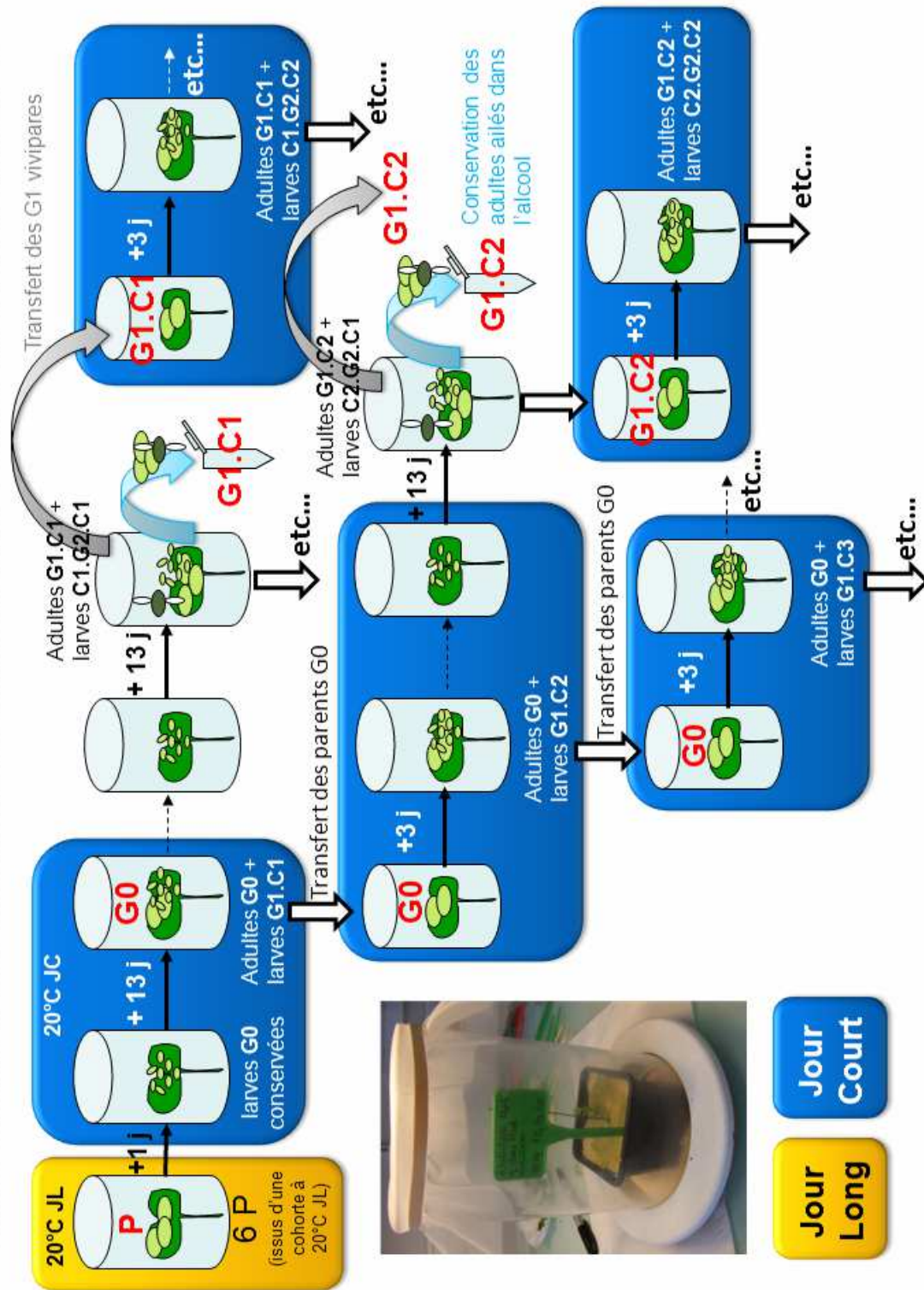


Figure 9. Protocole expérimental d'induction des formes sexuées.

D. Résultats : Seul H1 peut produire des morphes sexués dans ces conditions

Le clone H1 a produit dès la G1 des gynopares dans les premières cohortes, puis des mâles. Une femelle ovipare a pu être observée sur le rameau de *P. spinosa*.

Pour les clones H2 en conditions JC à 20°C, nous avons conduit les transferts jusqu'à la G4. Il n'y a eu aucune production de morphes sexués. Pour les clones H2 en conditions JC à 15°C nous n'avons pu suivre la production des ailés que jusqu'à la G2, là encore il n'y a eu aucune production de morphes sexués. Tous les morphes produits par H2 à 15 et 20°C en JC sont des vivipares aptères quelle que soit la génération.

Le détail de la production des morphes au cours du temps est donné dans l'article n°3 (cf. ce chapitre, partie I). Nous illustrerons ici les différents morphes H1 obtenus au cours de ces expériences : mâle ailé (Figure 10), gynopare (Figure 11) et femelle ovipare (Figure 12).

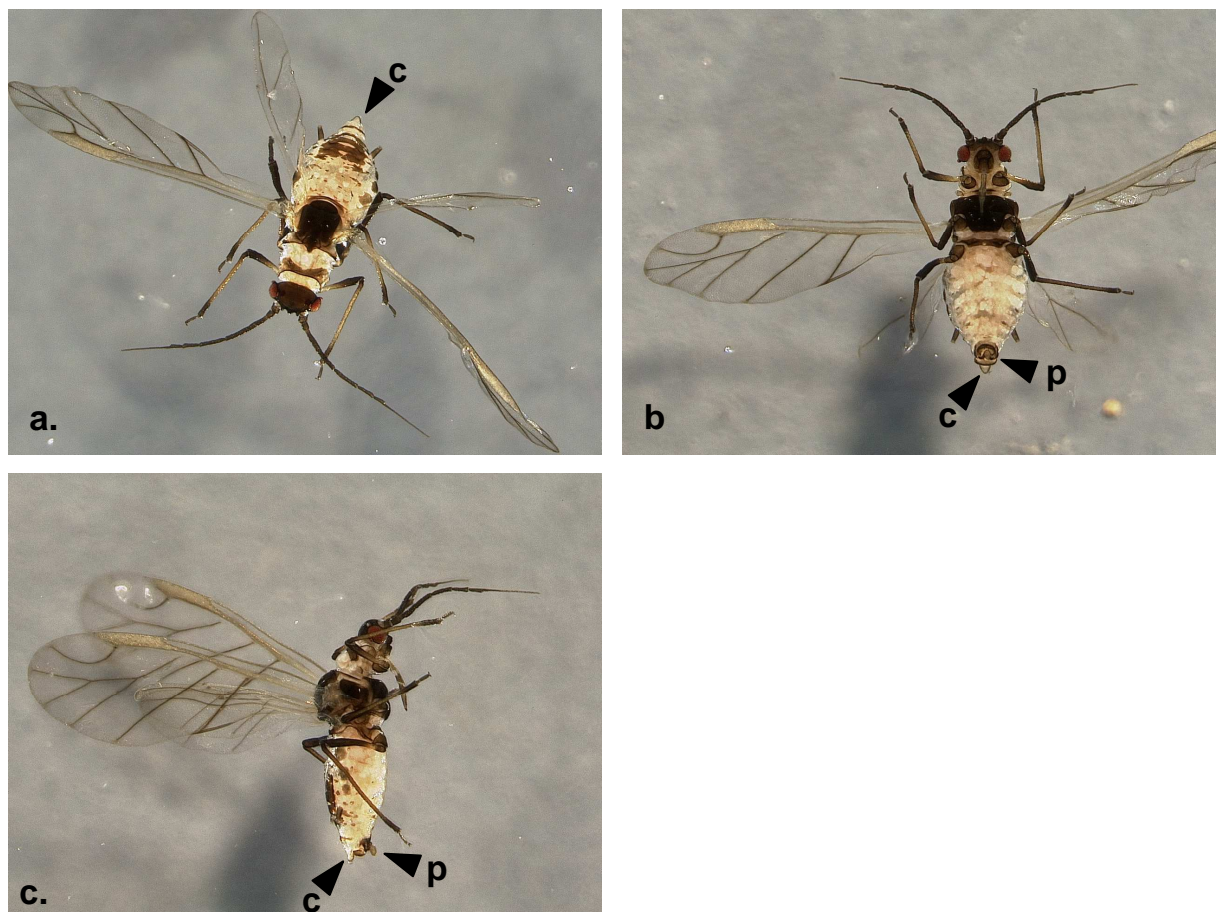


Figure 10. Planche photographique d'un mâle ailé *B. helichrysi*. Les mâles sont ailés, leurs abdomens porte des sclérites sombres sur les bords et des rayures sombres sur la face dorsale. a, vue dorsale ; b, vue ventrale ; c, vue latérale. c, cauda ; p, pénis. photographies © G. Fleck.

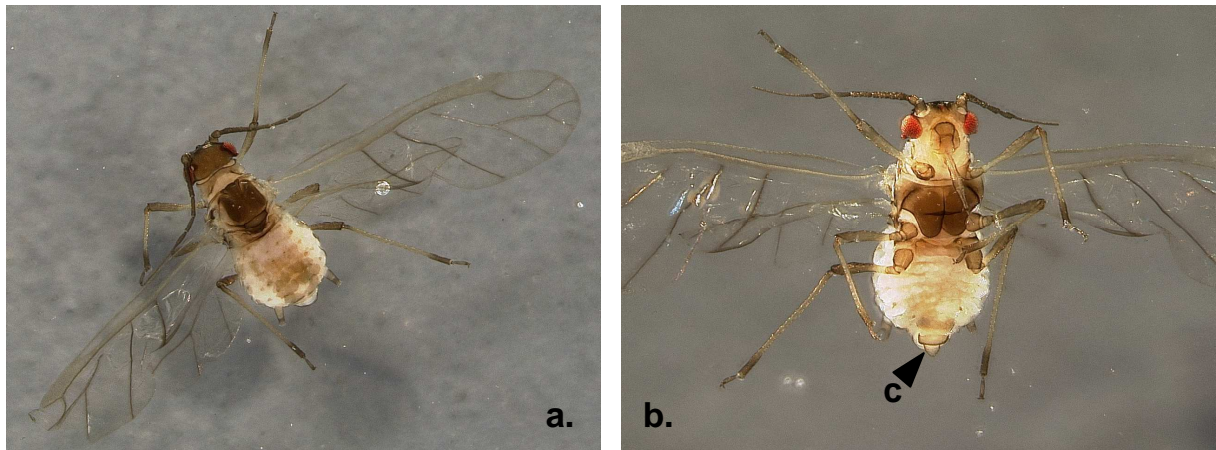


Figure 11. Planche photographique d'une jeune gynopare ailée *B. helichrysi*. La gynopare n'est pas décrite, sa morphologie est très proche de celle des femelles ailées vivipares de dispersion. a, vue dorsale ; b, vue ventrale. c, cauda.. photographies © G. Fleck.

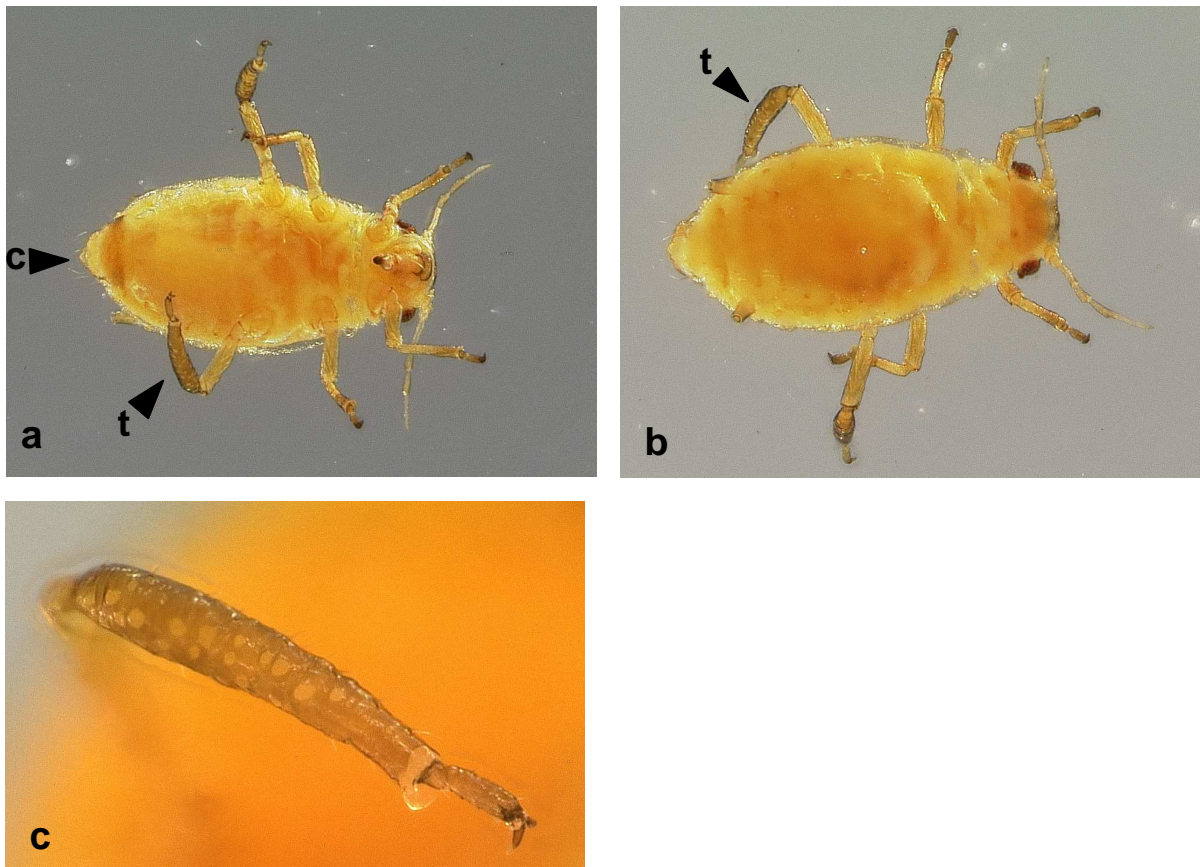


Figure 12. Planche photographique d'une femelle ovipare aptère *B. helichrysi*. Les femelles ovipares ressemblent aux femelles vivipares aptères mais possèdent des antennes plus courtes et un tibia renflé portant des plaques sensorielles caractéristiques. a., vue ventrale ; b., vue dorsale ; c., détail du tibia portant les sensilles. c, cauda ; t, tibia. photographies © G. Fleck.

Chapitre 3. Ecologie des lignées

Introduction du chapitre

Les précédents chapitres ont exposé la diversité génétique interspécifique et intraspécifique des deux espèces sœurs *B. helichrysi* H1 et H2. H1 a été principalement retrouvé dans l'hémisphère Nord, tandis que H2 semble avoir une distribution beaucoup plus large. Les données génétiques, obtenues à partir de notre échantillonnage mondial, nous ont permis de mettre en évidence que H1 rassemble des lignées hétéroéciques utilisant les pruniers comme hôte primaire, tandis que H2 rassemble majoritairement des lignées anholocycliques et au moins une lignée hétéroécique utilisant le pêcher comme hôte primaire en Inde. Nous avons donc montré que les cycles de vie de ces deux espèces sœurs étaient très différents. Dans ce chapitre, nous allons détailler l'écologie de ces lignées, en particulier les caractéristiques climatiques auxquelles elles sont associées, leurs plantes hôtes et les associations bactériennes secondaires, afin de mettre en évidence, si elles existent, des caractéristiques écologiques différentes entre ces lignées et espèces sœurs.

En plus d'avoir une description fine de l'écologie des lignées qui pourront confirmer les hypothèses faites sur les cycles de vie, ces informations pourront nous apporter des pistes pour expliquer les mécanismes de spéciation qui ont pu avoir lieu. Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, on suspecte un rôle important de la spéciation écologique chez les insectes phytophages. De plus les hypothèses concernant l'évolution de lignées asexuées font entrer en jeu des caractéristiques écologiques comme : est-ce que différentes espèces ou lignées partagent des sites de reproduction sexuée ? est ce que la présence de bactéries endosymbiotiques secondaires peut être impliquée dans la manipulation du mode de reproduction ?

D'autre part, avoir une idée précise de l'écologie des lignées asexuées peut apporter des pistes quant au mécanisme de maintien des lignées sexuées et asexuées. Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, il semblerait que la production de formes de résistance à l'hiver (les œufs) explique le maintien des lignées sexuées, du moins dans les régions aux hivers rigoureux. La plupart des hypothèses tentant d'expliquer la persistance des clones dans le monde vivant mettent en avant le rôle des facteurs écologiques, que l'on

suppose qu'il existe ou non une différence qualitative des phénotypes des sexués et asexués. En effet la sélection qui s'exerce sur les lignées sexuées ou asexuées ne se fait pas sans un cadre écologique. Deux hypothèses, supposant une différence qualitative entre phénotypes sexués et asexués, ont été avancées. Elles tentent toutes deux d'expliquer le maintien des lignées asexuées, mais génèrent des prédictions bien différentes. D'une part, Vrijenhoek (1984) suppose que les lignées asexuées évoluent indépendamment à partir de lignées sexuées généralistes. La nouvelle lignée asexuée capture donc avec elle un potentiel adaptatif restreint, lié à la part de variabilité génétique capturée. La coexistence entre sexués et asexués est donc rendue possible en perpétuant des génotypes asexués spécialisés ayant une bonne valeur sélective mais dans une niche écologique étroite qui entre peu en compétition avec les sexués apparentés. Au contraire, Lynch (1984) formule l'idée ancienne que les lignées asexuées généralistes seraient sélectionnées favorablement au cours de l'évolution. Selon cette hypothèse, on devrait donc retrouver ces clones généralistes distribués sur une vaste aire géographique, exploitant une vaste gamme de conditions écologiques. Cette hypothèse rejoint l'idée que les lignées asexuées possèdent une grande capacité colonisatrice. Ces deux hypothèses sont donc à explorer, et il se peut que l'une et l'autre soient vérifiées dans des circonstances différentes au cours de l'évolution des pucerons.

Les données climatiques et d'associations avec les plantes hôtes ont déjà été abordées dans les articles des chapitres précédents, nous allons donc résumer, dans des parties différentes, les informations obtenues et aller plus loin dans l'analyse des données climatiques des différentes lignées clonales. La nouveauté des données de ce chapitre repose sur une tentative de dépistage des bactéries endosymbiotique secondaires, qui sera présentée dans une troisième partie. Puis l'ensemble des résultats sera rassemblé et discuté.

1. Etude des variables climatiques associées à l'occurrence des différentes lignées

L'étude de la distribution de *B. helichrysi* en fonction du climat repose sur la combinaison de données climatiques et l'identification génétique (par RFLP ou génotypage) des individus présents à chaque site d'échantillonnage. Les relations entre entité biologique et valeurs

climatiques sont appréhendées grâce à des analyses en composantes principales (ACP). Les descripteurs climatiques de chaque site ont été récupérés sur la base de données Worldclim (Hijmans et al. 2005). Les descripteurs sont les valeurs mensuelles minimales, maximales et moyennes, des températures et précipitations totales obtenues à partir de la moyenne des valeurs relevées pour chaque mois de 1950 à 2000. Nous avons également utilisé les 19 variables bioclimatiques globales, proposées par Hijmans *et al.* (2005). Ces variables sont composées à partir des températures et des précipitations mensuelles moyennes, ceci afin de proposer des variables ayant un sens plus biologique que de simples relevés. Au total 67 variables sont compilées.

A. La résistance au froid des œufs, un facteur clé dans la distribution climatique et le maintien de sexués.

Seuls les œufs issus de la reproduction sexuée sont capables de résister aux basses températures pendant de longues périodes (Strathdee, Howling, et Bale 1995), et donc, seules les lignées holocycliques peuvent persister dans les régions aux hivers rudes. De nombreuses études, portant sur les effets du froid sur les pucerons, ont montrées que l'intensité du froid a plus d'impact sur les processus biologiques majeurs (développement, reproduction et survie) permettant le maintien des populations que la durée de la période de froid (Hutchinson et Bale 1994; Butts et Schaalje 1997; Howling, Bale, et Harrington 1994). Le seuil de -10°C comme température minimale du mois le plus froid a souvent été choisi pour ce type d'étude chez : différentes lignées holocycliques et anholocycliques de *Myzus persicae* (Howling, Bale, et Harrington 1994; Vorburger 2004), un clone anholocyclique de *Rhopalosiphum padi* (Hutchinson et Bale 1994), un clone anholocyclique de *Diuraphis noxia* en Amérique du Nord (Butts 1992; Butts et Schaalje 1997)).

B. Distribution climatique des deux espèces sœurs H1 et H2 dans l'hémisphère nord.

L'article n°2, présenté dans le chapitre 2, fait état de la distribution H1 et H2 en fonction de variables climatiques dans l'hémisphère nord. Nous avons montré qu'il existe une

différence significative dans la distribution des deux espèces. H2 est absente des régions les plus froides, particulièrement celles aux automnes et printemps froids. H1 est sous-représenté dans les régions à faible amplitude thermique annuelle et aux fortes précipitations .

L'absence de H2 dans les régions les plus froides concorde avec nos résultats concernant les cycles de vie de H2 qui regroupe principalement des lignées anholocycliques, alors que H1 qui est holocyclique, n'est pas restreinte aux régions douces. Le fait que H1 soit sous-représenté dans les régions au climat peu contrasté et relativement humide suggère deux hypothèses principales : soit ces conditions climatiques sont peu favorables aux pruniers ce qui limite le succès reproducteur de H1, et/ou H1 et H2 sont en compétition dans ces régions et, du fait de l'avantage de la reproduction asexuée, H2 domine H1 (du fait d'une fécondité plus élevée (Nespolo et al. 2009), ou simplement de l'augmentation démographique des populations asexuées pendant l'hiver).

C. Distribution climatique des lignées asexuées et sexuées chez *B. helichrysi* H2.

Nous avons montré que les lignées asexuées H2 ont une distribution mondiale, elles sont présentes sur plusieurs continents et persistent au cours des années (figure 5 article n° 3). Afin de déterminer si les différentes lignées asexuées sont associées à des climats différents, et donc de tester si elles sont plutôt généralistes ou spécialistes vis-à-vis du climat, nous allons étudier la distribution des lignées H2. Pour certaines lignées nous n'avons malheureusement que quelques localités. Cette étude est donc préliminaire : nous n'attendons un effet que s'il existe des différences fortes au moins entre les lignées asexuées les plus représentées (MLL-A, MLL-B, MLL-G et MLL-C).

Comme les localités sont distribuées dans le monde entier, nous n'avons pas retenus les 48 variables climatiques mensuelles : en effet les saisons sont inversées entre l'hémisphère nord et sud, rassembler les données leur fait donc perdre leur sens. Il nous reste les 19 variables composés qui sont saisonnières (basées sur les valeurs relevées au cours des mois et trimestres les plus chauds, froids et humides).

Les résultats de l'ACP sur les variables climatiques créent une première composante représentant 34 % de l'inertie totale et qui représente principalement des précipitations et des variations de températures (fortes associations positives avec l'axe 1 des précipitations annuelles, des trimestres les plus froids et humides et du mois le plus humide, associations négatives avec la gamme de température annuelle et la température maximale du mois le plus chaud, figure 13). De façon intéressante, le premier axe sépare clairement le clone D de tous les autres (figure 14). Cette différence est statistiquement significative ($p < 0.001$) comme indiqué par le test de randomisation entre classes sur 1000 randomisations. Le principal résultat de l'ACP sur l'axe 1 montre que le clone D serait plutôt associé aux régions ayant les précipitations les plus élevées, une gamme annuelle de température restreinte et des températures maximales relativement basses. Il faut cependant noter que nous n'avons que 3 localités associées à ce clone dans notre échantillonnage : une en Floride (USA), une en Caroline du Sud (USA) et une au Nord-Est de l'Australie. Ces trois régions sont caractérisées par un climat de type tropical qui correspond à un régime de précipitation élevé et des températures relativement constantes mais élevées. Deux autres lignées se séparent aussi des autres selon l'axe 1 mais moins fortement (figure 14) : les sexués présents en Inde et les H2 du Kazakhstan (probablement sexués), et le clone MLL-I correspondant à des individus collectés en Algérie et dans le Sud de la France. Ces deux lignées semblent associées aux régions plutôt sèches, présentant une large gamme de températures annuelles et une température maximale du mois le plus chaud élevée. Ces caractéristiques climatiques sont cohérentes avec les climats continentaux et méditerranéens. Encore une fois ces résultats sont basés sur un faible nombre de localités.

La deuxième composante, représentant 27 % de l'inertie totale, traduit des variations dans les précipitations et les températures (fortes associations positives avec l'axe 2 du coefficient de précipitations saisonnières, de l'isothermalité (rapport entre la différence moyenne des températures par mois sur la différence des températures annuelles) et de la température moyenne du trimestre le plus froid, figure 13). Ce deuxième axe sépare les sexués (H2 d'Inde et du Kazakhstan) de toutes les autres lignées asexuées (figure 14), cette différence est statistiquement significative. Ce résultat confirme que les sexués seraient plutôt associés aux régions ayant les hivers les plus froids, un faible coefficient de précipitations saisonnières et une faible isothermalité. Ces résultats sont cohérents avec les climats du nord de l'Inde et du Kazakhstan, ainsi qu'avec le fait que seules les lignées holocycliques

peuvent persister sous de tels climats. A l'inverse, une autre lignée se sépare aussi des autres lignées selon l'axe 2 mais moins fortement (figure 14): le clone H correspondant à des individus collectés en Californie (3 localités). Cette lignée semble associée aux régions aux hivers chauds, présentant un fort coefficient de précipitations saisonnières et une forte isothermalité. Encore une fois, pour ces lignées, ces résultats sont basés sur un faible nombre de localités.

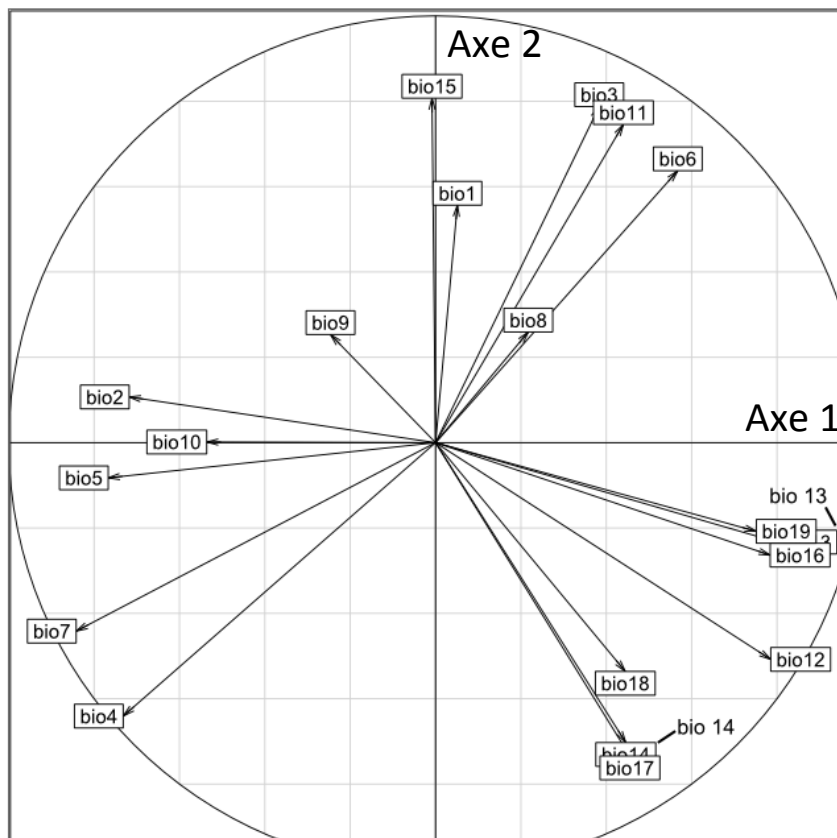


Figure 13. Cercle des corrélations. bio1, température annuelle moyenne; bio2, gamme de température moyenne de la journée (température moyenne mensuelle (max temp - min temp)); bio3, isothermalité ($\text{bio2}/\text{bio7}$) (* 100); bio4, saisonnalité des températures (standard deviation *100); bio5, température maximale du mois le plus chaud; bio6, température minimale du mois le plus froid; bio7, gamme des températures annuelles ($\text{bio5}-\text{bio6}$); bio8, température moyenne du trimestre le plus humide; bio9, température moyenne du trimestre le plus sec; bio10, température moyenne du trimestre le plus chaud; bio11, température moyenne du trimestre le plus froid; bio12, précipitations annuelles; bio13, précipitation du mois le plus humide; bio14, précipitation du mois le plus sec; bio15, saisonnalité des précipitations (coefficient de variation); bio16, précipitation du trimestre le plus humide; bio17, précipitation du trimestre le plus sec; bio18, précipitation du trimestre le plus chaud; bio19, précipitation du trimestre le plus froid.

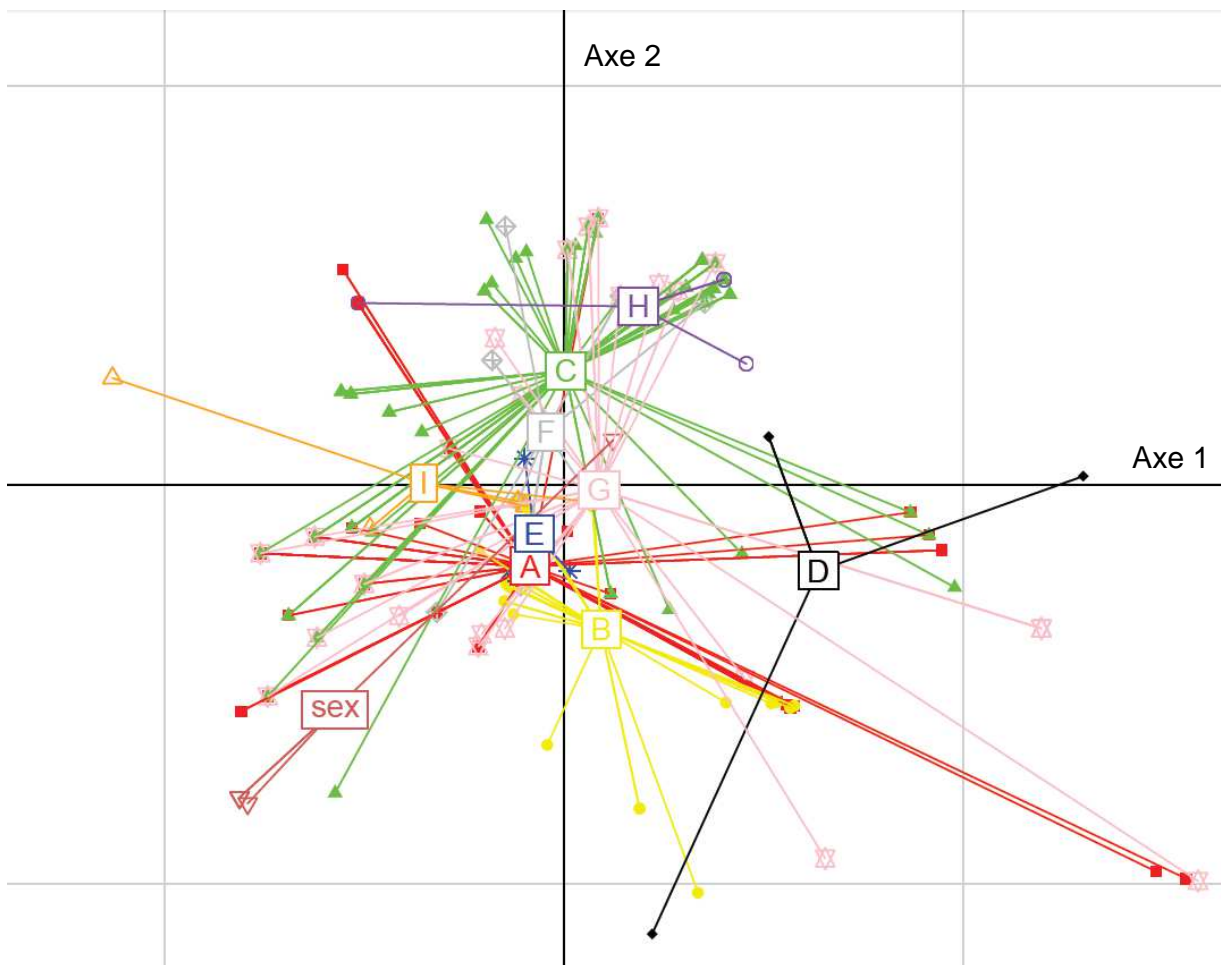


Figure 14. Enveloppes climatiques des lignées *B. helichrysi* H2.

En l'état actuel de nos données (sous-représentation de certains clones), nous ne pouvons pas tirer de conclusions certaines sur la distribution des lignées asexuées. Les superclones les plus abondants dans notre échantillonnage (MLL-A, MLL-B, MLL-G et MLL-C) ne semblent pas différer par leur patron climatique. Cependant, il semblerait que le superclone D soit plutôt associé à des climats humides et que les sexués H2 soient dominants dans les régions aux hivers rigoureux et aux variations climatiques marquées. On peut également noter que le clone B, qui a une distribution géographique restreinte au bassin méditerranéen dans notre échantillonnage, ne semble pas être associé à un climat différent de celui des autres superclones majoritairement distribués.

II. Etude de la gamme de plantes hôte associées aux différentes lignées

La base de données d'Essig (Essig Museum of entomology collection, <http://essigdb.berkeley.edu/>) ainsi que (Blackman et Eastop 2006) font état d'un très grand nombre de plantes hôtes pour *B. helichrysi*, distribuées dans plusieurs familles botaniques. Dans cette partie, nous allons résumer les informations concernant les associations de plantes hôtes avec les différentes espèces et lignées au sein de *B. helichrysi*, afin de mettre en évidence si cette diversité d'associations se retrouve à toutes les échelles ou si des lignées génétiques sont préférentiellement associées à certaines plantes hôtes. En d'autres mots nous allons tester s'il existe des spécialisations des lignées vis à vis de la gamme de plantes hôtes.

Lors de notre échantillonnage, nous avons essayé de récolter les colonies sur des plantes différentes mais il s'avère que la récurrence de *B. helichrysi* sur des plantes très communes comme *Conyza*, *Senecio* et *Matricaria* a pu biaiser notre échantillonnage. Nos campagnes d'échantillonnage avaient pour but premier d'acquérir une bonne représentation de la diversité génétique de *B. helichrysi* et non de caractériser toutes les associations de plantes hôtes (instinctivement nous avons cherché *B. helichrysi* là où nous étions sûres de le trouver).

A. Résumé des associations des deux espèces soeurs avec leurs plantes hôtes

Dans l'article n°2, nous nous sommes intéressés aux associations de plantes hôtes avec les deux espèces soeurs H1 et H2. Nous avons montré, que :

- H2 n'est jamais trouvé associé aux pruniers (35 colonies constituées uniquement de H1, récoltées sur *P. domestica*, *P. spinosa*, *P. cersifera* and *P. sp.*, en France, au Kazakhstan et aux Etats-Unis)
- H2 n'est jamais retrouvé associé aux tournesols en France (7 colonies), mais notre échantillonnage comprend une colonie sur tournesol en Australie.
- A l'aide de test exact de Fisher, nous avons montré que H1 et H2 ne montrent pas de distribution différentielle entre plantes hôtes herbacées. Les deux espèces soeurs co-colonisent parfois une même plante.

B. Résumé des associations des lignées sexuée et asexuées H2 avec leurs plantes hôtes

Dans l'article n°3, nous avons cherché si certaines lignées étaient associées préférentiellement à certains genres de plantes hôtes parmi les genres les plus communs. Au cours de cette étude, nous avons confirmé que :

- H2 n'est jamais trouvé associé aux pruniers (42 colonies uniquement composées de H1 sur *P. spinosa*, *P. americana*, *P. cerasifera*, *P. domestica* et *P. sp*, échantillonnées en France, au Kazakhstan et aux Etats-Unis)
- H2 n'est jamais retrouvé associé aux tournesols en France (17 colonies composées uniquement de H1).

Nous avons également montré que :

- La lignée sexuée H2 est associée au moins aux pêchers en Inde (reste à savoir si cet hôte primaire est exclusif aux H2 sexués et si cette association se limite à l'Inde et aux zones géographiques proches).
- Les lignées asexuées H2 correspondant aux 5 superclones majoritaires (MLL-A, MLL-B, MLL-C, MLL-F, MLL-G) ne montrent pas de distributions disjointes entre les plantes hôtes herbacées les plus colonisées. Différents superclones co-colonisent parfois une même plante.
- Nous avons confirmé que certains genres de plantes étaient préférentiellement choisis par *B. helichrysi*, indifféremment des lignées génétiques. Ces plantes correspondent à des plantes très communes, considérées comme des mauvaises herbes, prépondérantes dans les environnements anthropisés (*Conyza canadensis*, *Senecio vulgaris*, *Matricaria sp.*).

En conclusion, nous n'avons pas mis en évidence de patrons forts de spécialisation des deux espèces et des lignées clonales H2 vis-à-vis des plantes herbacées. La quasi-absence de H2 dans les champs de tournesol en France est tout de même surprenante (une seule colonie constituée du clone MLL-B sur un tournesol d'ornementation à Montpellier).

Ces tournesols cultivés ont été échantillonnés pour certains dans des régions où nous avons trouvé H2 sur d'autres herbacées (Aquitaine, Ile-de-France, Rhône-Alpes), Cette absence de H2 sur tournesol ne résulte donc pas d'un effet confondant du climat. On peut suggérer que les lignées clonales de H2 sont sensibles aux traitements phytosanitaires appliquées sur ces cultures, d'autant plus que ces lignées n'étant jamais associées aux cultures de *Prunus*, contrairement aux populations de H1, elles ne sont pas régulièrement soumises à des traitements insecticides et donc ne subissent pas les pressions de sélection favorisant des lignées résistantes. Il serait donc intéressant de comparer la présence gènes de résistance aux insecticides chez H1 et H2 pour tester cette hypothèse.

En ce qui concerne les plantes hôtes primaires, H1 est associées aux pruniers (sauvages et cultivés) et nous ne l'avons pas récolté sur pêchers, la lignée sexuée H2 semble associée aux pêchers en Inde. Bien sûr, il est toujours difficile de conclure sur des données « d'absence ». Comme relaté dans l'article n°3, une recherche plus poussée de H2 sur pruniers en Inde (où l'on sait que H2 fait de la sexualité), d'échantillons sur pêchers en Afrique du sud (Remaudière 1985) et en Afrique du Nord (Ben Halima et Ben Hamouda 2005) où *B. helichrysi* est noté comme associé aux amandiers (*P. persica* et *P. amygdalis* appartiennent tous les deux au sous-genre *Amygdalus*, contrairement aux pruniers qui appartiennent au sous-genre *Prunus*), est nécessaire avant de conclure définitivement que H1 et H2 utilisent des hôtes primaires différents. Mais en l'état actuel de nos données, cette hypothèse paraît plausible.

III. Etude de la communauté de bactéries secondaires de *B. helichrysi*

Introduction

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction générale, il existe, en plus de l'endosymbionte primaire (obligatoire), des associations bactériennes secondaires (facultatives) avec les hôtes pucerons. Les bactéries sont localisées sporadiquement dans différents tissus, présentes en petite quantité, et sont principalement transmises verticalement mais aussi horizontalement. La diversité des phénotypes exprimés par les hôtes suite à ces associations (tableau 2) nous a paru intéressante à explorer dans un contexte évolutif chez *B. helichrysi*, notamment pour leur rôle potentiel dans l'exploitation de la plante hôte, la manipulation de la reproduction, l'adaptation climatique, ainsi que pour tester s'il existe des associations préférentielles entre superclones et bactéries. Notre jeu de données semblait idéal pour tester de nombreuses hypothèses quant à la communauté de bactéries secondaires associée à des facteurs écologique et génétiques.

Seul un nombre restreint d'« espèces » bactériennes impliqués dans des associations secondaires avec les pucerons ont été mises en évidence à ce jour, bien que leur recherche a fait l'objet de nombreuses études. Plusieurs approches existent pour appréhender la diversité des bactéries secondaires. Une première approche sans *a priori* incluant une étape de clonage puis d'amplification grâce à des amorces universelles de bactéries (souvent 16S) et enfin de séquençage, ou de pyroséquençage (Jones et al. 2011) permet d'estimer la diversité totale des espèces bactériennes (mais on s'attend à ce que les espèces rares soient détectées difficilement). Une autre approche consiste à détecter la présence de bactéries sélectionnées *a priori*, grâce à des amplifications (Fukatsu 2001) ou des digestions enzymatiques spécifiques (Carletto et al. 2008).

Etant donné que les études sans *a priori* ne révèlent pas une très grande diversité bactérienne associée aux pucerons, nous avons choisi une méthode avec *a priori* pour se faire une première idée de la représentation des bactéries endosymbiotiques de pucerons les plus communes chez *B. helichrysi*. Nous avons choisi d'utiliser la méthode de T-RFLP développée par Carletto *et al.* (2008), qui possède l'avantage d'être rapide et permet de

traiter un grand nombre d'échantillons. Brièvement, cette méthode consiste à amplifier de manière aspécifique une portion du gène 16S RNA bactérien, le couple d'amorces utilisé comprend une amorce marquée par un fluorochrome ; puis le produit de PCR est digéré par des enzymes qui ont un site de restriction propre (la taille des fragments digérés sont connus) pour chaque espèce de bactérie recherchée. Le produit de digestion est analysé dans un capillaire afin de détecter la présence et de mesurer la taille des fragments digérés, qui sont ensuite attribués aux bactéries correspondantes. Dans notre étude, afin de vérifier certains résultats ambigus, une double recherche par PCR spécifique a été menée pour certaines bactéries.

Tableau 2. Diversité des phénotypes liés aux associations pucerons-bactéries. *A. pisum*, *Acyrtosiphon pisum* ; *A. fabae*, *Aphis fabae* ; *M. persicae*, *Myzus persicae* ; Souche, souche bactérienne ; puceron, génotype de l'hôte puceron ; plante, espèce de plante hôte.

Bactérie	hôte puceron	phénotype	Effet dépendant	références
défense contre parasitisme				
<i>H. defensa</i>	<i>A. pisum</i>	tue la larve de la guêpe parasitoïde <i>Aphidius ervi</i>	souche	Oliver et al. (2003, 2005)
<i>H. defensa</i>	<i>A. pisum</i>	augmente la fécondité des hôtes parasités		Oliver et al. (2006)
<i>H. defensa</i>	<i>A. pisum</i>	tue la larve de la guêpe parasitoïde <i>Aphidius eadyi</i>		Ferrari et al. (2004)
<i>H. defensa</i>	<i>A. fabae</i>	protection parasitoïde <i>Lysiphlebus fabarum</i>		Vorburger et al. (2009)
<i>R. insecticola</i>	<i>M. persicae</i>	protection contre 2 parasitoïdes : <i>Aphidius colemani</i> et <i>Diaeretiella rapae</i>		von Burg et al. (2008)
<i>R. insecticola</i>	<i>A. pisum</i>	protection contre le champignon entomopathogène <i>Pandora neoaphidis</i>		Ferrari et al. (2004)
				Scarborough et al. (2005)
<i>S. symbiotica</i>	<i>A. pisum</i>	tue la larve de la guêpe parasitoïde <i>Aphidius ervi</i>		Oliver et al. (2003)
Tolérance aux fortes températures				
<i>H. defensa</i>	<i>A. pisum</i>	augmentation de la survie suite à un choc thermique (de 18°C à 37,5°C)		Russell & Moran (2006)
<i>R. insecticola</i>	<i>A. pisum</i>	réduction de la survie suite à un choc thermique (de 18°C à 37,5°C)		Russell & Moran (2006)
<i>Rickettsia</i>	<i>A. pisum</i>	augmentation de la fécondité à 25°C	puceron	Chen et al. (2000)
<i>S. symbiotica</i>	<i>A. pisum</i>	25°C, 39°C via protection des bacteriocytes contenant <i>Buchnera</i>		Chen et al. (2000)
<i>S. symbiotica</i>	<i>A. pisum</i>	augmentation de la fécondité à 25°C	puceron	Montllor et al. (2002)
<i>S. symbiotica</i>	<i>A. pisum</i>	augmentation de la fécondité suite à un choc thermique (de 18°C à 37,5°C)		Chen et al. (2000)
				Russell & Moran (2006)
exploitation des plantes hôtes				
<i>H. defensa</i>	<i>A. pisum</i>	augmentation fécondité sur luzerne		Leonardo & Muir (2003)
<i>R. insecticola</i>	<i>A. pisum</i>	augmentation de la fécondité sur trèfle mort sur luzerne	puceron	Leonardo & Muir (2003)
<i>R. insecticola</i>	<i>A. pisum</i>	augmentation performance sur trèfle blanc		Tsuchida et al. (2004)
<i>R. insecticola</i>	<i>A. pisum</i>	augmentation performance sur trèfle rouge	puceron	Ferrari et al. (2007)
coloration				
<i>Rickettsia</i>	<i>A. pisum</i>	confère une coloration verte aux pucerons (non infectés rouges)		Tsuchida et al. (2010)
baisse de la fécondité				
<i>H. defensa</i>	<i>A. pisum</i>	baisse de la fécondité et de la survie en condition d'induction de la sexualité	puceron	Simon et al. (2011)
<i>R. insecticola</i>	<i>A. fabae</i>	réduction de fécondité sur plante hôte pas optimale	plante	Chandler et al. (2008)
		multiplication bactérie quand azote rare		
<i>Rickettsia</i>	<i>A. pisum</i>	baisse de la fécondité	puceron	Simon et al. (2007)
<i>Rickettsia</i>	<i>A. pisum</i>	baisse de la fécondité	souche	
<i>Rickettsia</i>	<i>A. pisum</i>	baisse de la fécondité	plante	Chen et al. (2000)
<i>S. symbiotica</i>	<i>A. pisum</i>	baisse de la fécondité	plante	Chen et al. (2000)
<i>S. symbiotica</i>	<i>A. pisum</i>	multiplication bactérie quand azote rare		Wilkinson et al. (2007)
<i>S. symbiotica</i>	<i>A. fabae</i>	réduction de fécondité sur plante hôte pas optimale		Chandler et al. (2008)
<i>Spiroplasma</i>	<i>A. pisum</i>	baisse de la fécondité en condition d'induction de la sexualité	puceron	Simon et al. (2011)
mode de reproduction				
<i>Spiroplasma</i>	<i>A. pisum</i>	male killing		Simon et al. (2011)

A. Matériel et méthodes

Sélection des individus testés

Afin de tester s'il existe des associations particulières entre bactéries, lignées génétiques des pucerons hôtes, plantes hôtes, et géographie, nous avons sélectionné 621 *B. helichrysi* appartenant aux deux espèces sœurs H1 et H2, représentants de 9 lignées H2 asexuées et une lignée H2 sexuée, collectés sur 28 genres de plantes différentes (hôte primaire et secondaire), et provenant de 10 pays répartis sur les 6 continents. Chaque individu représente des combinaisons de facteurs écologiques et génétiques variés. (tableau annexe chapitre 3). Notre jeu de données contient 154 réplicats de minimum deux individus appartenant à une même lignée génétique et provenant d'une même colonie (ayant donc en commun tous les facteurs écologiques).

Sélection des bactéries recherchées

Nous avons recherché la présence de *Buchnera aphidicola*, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*, *Serratia symbiotica*, *Rickettsia* sp., *Arsenophonus* sp., et *Wolbachia* sp.. Nous avons utilisé la présence de *B. aphidicola* comme témoin positif de l'amplification bactérienne.

Problèmes rencontrés avec le protocole

La détection d'*Arsenophonus* et de *Serratia* avec le protocole de Carletto (2008) qui propose une seule digestion avec un cocktail de 4 enzymes (*TaqI*, *AluI*, *BfaI* et *BceAI*) nous a posé plusieurs problèmes techniques. En effet, les sites de restrictions de *AluI* et *BfaI* sont très proches pour *Arsenophonus* (respectivement 312 pb et 314 bp), la détection d'*Arsenophonus* se base sur la détection d'un fragment de 312 bp digéré par *AluI*. De même les sites de restrictions de *AluI*, *BceAI* et *BfaI* sont proches pour *Serratia* (312 pb, 309 pb, 314 pb), la détection de *Serratia* se base sur la détection d'un fragment de 309 bp digéré par *BceAI*. D'une part la compétition entre enzymes pour des sites de restrictions aussi proches peut biaiser les résultats. D'autre part la digestion du 16S de *Serratia* et d'*Arsenophonus* par

AluI, *BceAI* et *Bfal* en même temps génère des fragments de taille identiques (312 et 314 bp), qu'on ne peut pas attribuer à l'une ou l'autre bactérie lors de la lecture. Afin d'éviter ce problème nous avons fait deux digestions séparées du produit de PCR 16S avec *AluI* d'une part, et *Bfal*, *BceAI* et *TaqI* d'autre part. L'enzyme *BceAI* étant très couteuse et ne servant qu'à détecter la présence de *Serratia*, nous avons dû abandonner son utilisation. La détection de *Serratia* est remplacée par une PCR spécifique. Pour l'ensemble de ces mises au point, des témoins positifs (ADN de pucerons témoins dont l'infection était connue) et des tests sur des concentrations d'ADN faibles ont été utilisés.

Détection des bactéries

L'ADN génomique total est extrait à partir d'un individu unique.

Un fragment du 16S bactérien est amplifié de manière aspécifique grâce aux amorces universelles 16SB1 et Y2mod*. Nous digérons ensuite 10 µl de produit de PCR dans un mix de digestion contenant *Bfal* et *TaqI*. Une seconde digestion se fait à partir de 10 µl de produit de PCR dans un mix de digestion *AluI*. La lecture de la taille et l'identification des fragments est effectuée avec GENEMAPPER v4.0 (Applied Biosystems) pour détecter *Buchnera*, *Hamiltonella*, *Rickettsia* et *Regiella*. Pour quelques individus positifs en T-RFLP, nous avons également testé la présence de chaque bactérie par PCR spécifique. (pour le détail voir Annexe Chapitre3)

Des PCRs spécifiques ont été utilisées pour détecter *Serratia* et *Wolbachia*.

Plusieurs amplicons ont été séquencés afin de vérifier que les amplifications correspondaient bien à la bactérie recherchée.

Tests statistiques

Afin de tester si la présence ou l'absence de chaque bactérie est statistiquement lié à des facteurs génétiques de l'hôte puceron et/ou écologiques, nous avons utilisé des modèles linéaires généralisés. La valeur à expliquer, Y , correspond à l'absence (0) ou à la présence (1) de la bactérie dans l'individu testé. Pour chaque jeu de données associé à une bactérie, nous avons conservés uniquement les individus associés aux genres de plante les plus représentés (au moins 10 répétitions). Les variables explicatives sont toutes qualitatives : espèce (deux

modalités : H1 ou H2), lignée génétique (8 modalités : H1, les superclones MLL-A, MLL-B, MLL-C, MLL-F, MLL-G, MLL-H (certains superclones sont associés à des genres de plantes sous représentés), et la lignée H2 sexuée indienne), mode de reproduction (2 modalités : sexuée ou asexuée), famille de plante hôte (2 modalités : Asteraceae et Rosaceae), « genre » de plante hôte (7 modalités : *Achillea*, *Anaphalis*, *Anthemis*, *Conyza*, *Senecio*, pêcher, prunier), pays (5 modalités : France, Grèce, Inde, Kazakhstan, Etats-Unis). La loi de distribution est une loi binomiale et la fonction de lien associée est logit. Le seuil de significativité est choisi à $\alpha=0.05$. Nous avons testé un modèle complet avec et sans interactions.

B. Résultats

Efficacité de la T-RFLP

Six cent vingt-et-un individus ont été soumis à la T-RFLP. Pour 469 d'entre-eux, la présence de *B. aphidicola* a été détectée. Nous avons écarté les individus pour lesquels *B. aphidicola* n'a pas été détectée des analyses suivantes.

Les comparaisons entre T-RFLP et PCR spécifiques pour un même individu sont peu concluantes : d'une part nous n'avons qu'un faible nombre d'échantillons sur lesquels nous avons eu assez d'ADN ou de temps pour faire ces comparaisons, et d'autre part tous les résultats de détection ne sont pas concordants entre les deux méthodes utilisées (concordance sur l'absence de bactérie : 6/9 pour *Hamiltonella*, 9/12 pour *Regiella*, 3/5 pour *Rickettsia*, 46/51 pour *Serratia*, 1/33 pour *Wolbachia*).

De nombreux faux-positifs ont été mis en évidence par la comparaison T-RFLP/PCR spécifique. La majorité des individus testés par T-RFLP présentait un pic sur les profils de digestion à la taille attendue pour *Wolbachia* (407/469 des individus testés), or les PCRs spécifique-*Wolbachia* (33 individus positifs en T-RFLP testés en PCR spécifique pour le fragment de gène *wsp*, 10 individus pour le 16S (deux couples d'amorces testés)) se sont toutes révélées négatives pour ces individus (la bonne amplification n'a eu lieu que pour les témoins positifs). De même pour *Arsenophonus* les individus positifs en T-RFLP se sont révélés négatifs en PCRs spécifique-*Arsenophonus*.

Pour plusieurs réplicats, l'absence ou la présence d'une même bactérie n'est pas concordante (incohérences : *Hamiltonella* 58/154, *Regiella* 2/154, *Rickettsia* 65/154).

Présence/absence des bactéries

Les résultats globaux du nombre d'occurrence de chaque bactérie sont présentés dans le tableau 3. D'après les résultats de la T-RFLP, *Hamiltonella* et *Rickettsia* sont majoritaires chez *B. helichrysi*, on retrouve occasionnellement *Regiella* et *Serratia* (Figure 15). *Arsenophonus* et *Wolbachia* sont absentes de notre jeu de données si l'on en croit les résultats des PCRs spécifiques.

Tableau 3. Résultats de la détection des bactéries endosymbiotiques secondaires chez *B. helichrysi*.

bactérie	méthode de détection	Présence détectée/total testé	Proportion de l'infection
<i>H. defensa</i>	T-RFLP	310/462	0,67
<i>R. insecticola</i>	T-RFLP	14/462	0,03
<i>Rickettsia</i>	T-RFLP	188/462	0,41
<i>Arsenophonus</i>	PCR spécifique	0/78	0
<i>S. symbiotica</i>	PCR spécifique	10/437	0,02
<i>Wolbachia</i>	PCR spécifique	0/33	0

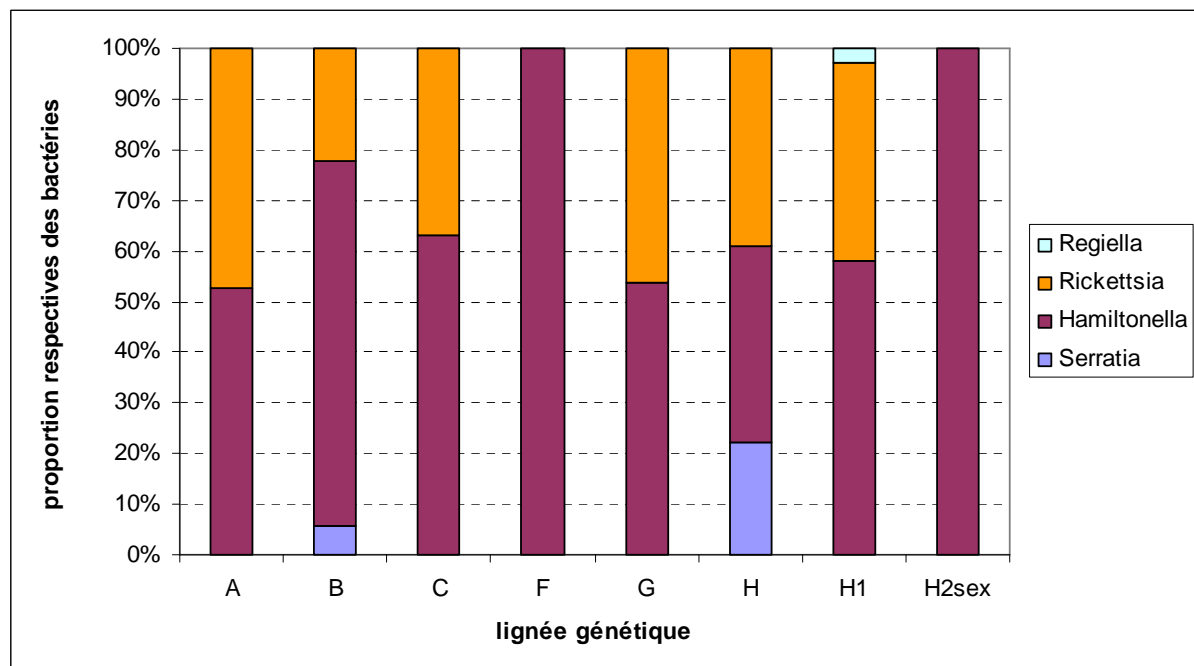


Figure 15. Proportions respectives des bactéries infectant chaque lignée génétique.

Nous n'avons pu mener les tests statistiques que sur le jeu de données *Hamiltonella* et *Rickettsia* dont la présence était suffisante pour avoir une puissance statistique. Dans les deux cas, le modèle complet sans interactions avait le meilleur AIC, les interactions d'ordres 1 à 5 n'étaient jamais significatives. La présence des bactéries montre des résultats plus tranchés selon les facteurs écologiques (Figures 17 & 19) que génétiques (Figures 16 & 18).

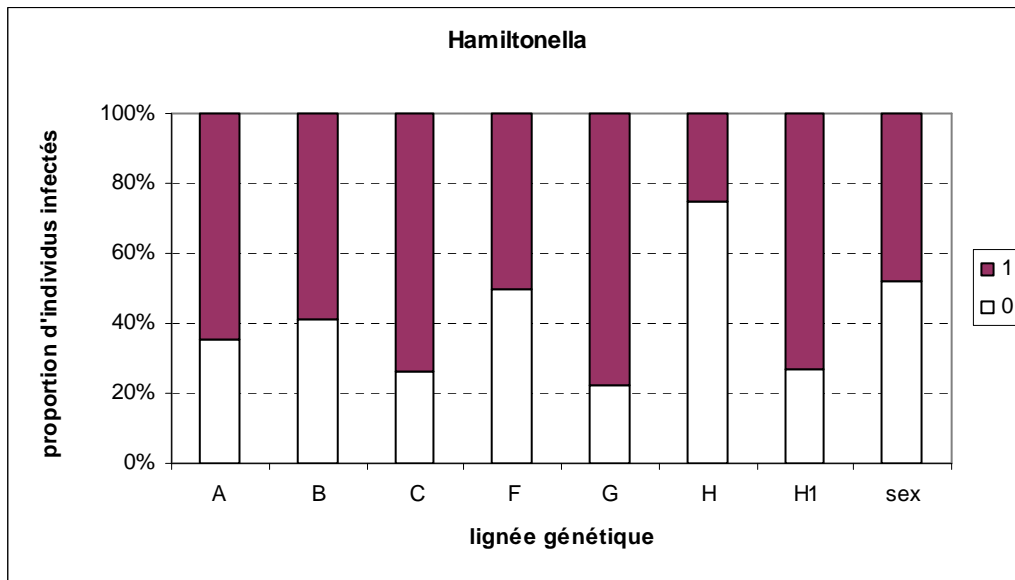


Figure 16. Proportions d'individus infectés par *Hamiltonella* pour chaque lignée génétique. 0, absence ; 1, présence d'*Hamiltonella*.

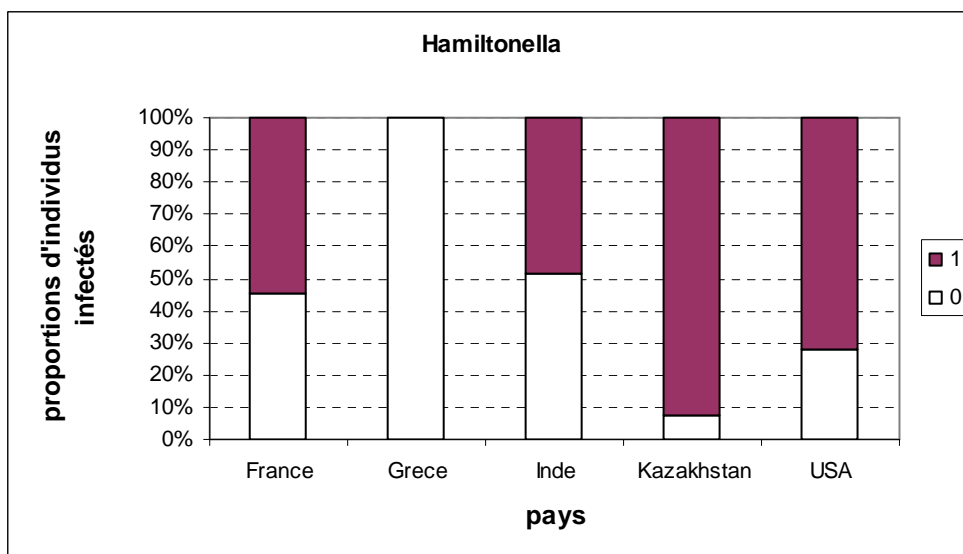


Figure 17. Proportions d'individus infectés par *Hamiltonella* par pays. 0, absence ; 1, présence d'*Hamiltonella*.

L'espèce et le pays ont un effet significatif sur la présence d'*Hamiltonella*. Environ 73% des individus H1 étaient infectés par *Hamiltonella*, alors que 62% des H2 étaient positifs. *Hamiltonella* est sur-représentée au sein des individus échantillonnés au Kazakhstan (26/28 individus positifs) et aux Etats-Unis (178/248 individus positifs), alors que dans les autres pays environ 50% des individus étaient positifs (France 35/64, Grèce 0/2, Inde 14/29).

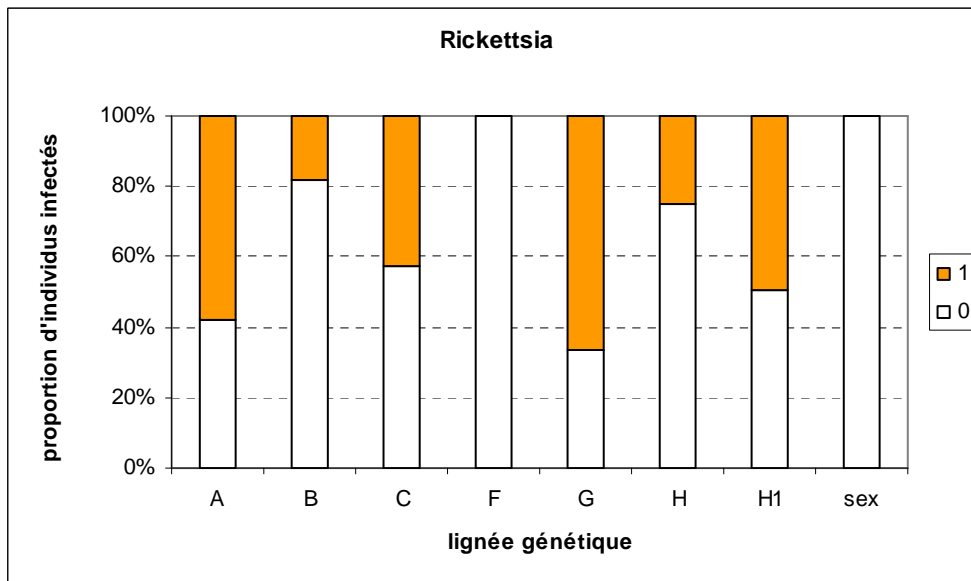


Figure 18. Proportions d'individus infectés par *Rickettsia* pour chaque lignée génétique. 0, absence ; 1, présence de *Rickettsia*.

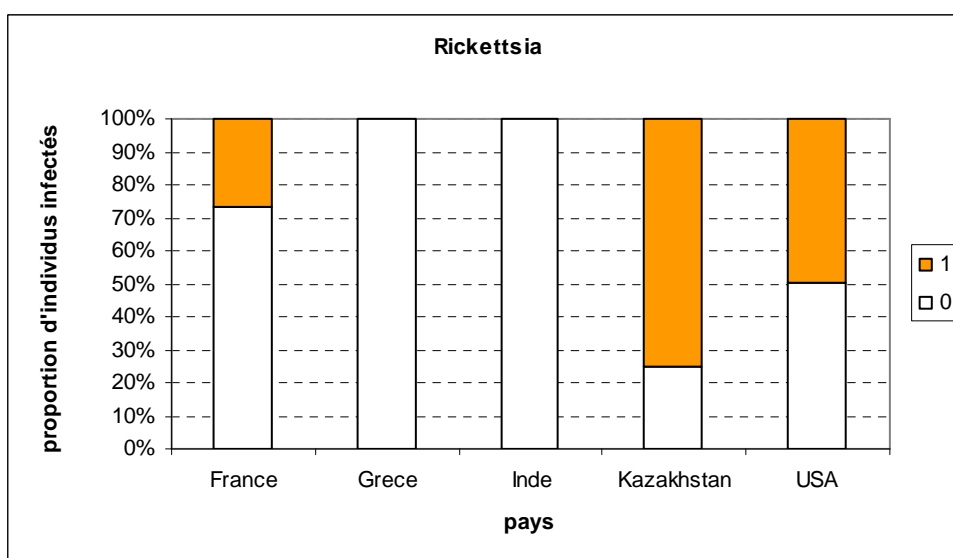


Figure 19. Proportions d'individus infectés par *Rickettsia* par pays. 0, absence ; 1, présence de *Rickettsia*.

L'espèce, la lignée génétique et le pays ont des effets significatifs sur la présence de *Rickettsia*. 50% des individus H1 et 37% des individus H2 étaient infectés par *Rickettsia*. *Rickettsia* est absente au sein des hôtes appartenant aux lignées génétiques MLL-F et aux H2 sexués indiens. L'association est sous-représentée avec les hôtes appartenant aux lignées génétiques MLL-B (18%) et MLL-H (25%). Les pucerons appartenant aux lignées MLL-C (43%), H1 (50%), MLL-A (58%), et MLL-G (67%) semblent plus fréquemment infectés par *Rickettsia*. *Rickettsia* est absente des individus échantillonnés en Grèce et en Inde, seulement 27% des individus échantillonnés en France étaient infectés, 50% de ceux des Etats-Unis et jusqu'à 75% des individus du Kazakhstan.

C. Conclusion, discussion

Il semblerait que *Hamiltonella defensa* et *Rickettsia* soient les deux bactéries endosymbiotiques secondaires le plus fréquemment associées à *B. helichrysi*. L'origine géographique a un effet significatif sur présence de ses deux espèces bactériennes, traduisant probablement des conditions climatiques. *Hamiltonella* et *Rickettsia* sont sur-représentées au Kazakhstan par rapport aux autres régions échantillonnées. Il a déjà été montré que la présence certaines bactéries endosymbiotiques différait selon les localités, et que les conditions climatiques associés pouvait y jouer un rôle (Tsuchida et al. 2002). La situation est moins tranchée quant aux facteurs génétiques des pucerons hôtes. Cependant on peut noter qu'une plus grande proportion de *B. helichrysi* H1 est infectée par chacune des bactéries et que la proportion d'infection par *Rickettsia* diffère selon les lignées génétiques (superclones et lignées sexuées H2, et H1). On retrouve sporadiquement *Regiella* et *Serratia* associées à *B. helichrysi*, mais il ne semble pas que ces associations répondent à des facteurs génétiques ou écologiques. Le modèle étudié n'est pas idéal car il comprend plusieurs facteurs non indépendants (par exemple mode de reproduction et espèce, certaines plantes hôtes et le pays, etc.). Il faudra donc réfléchir à un meilleur plan d'échantillonnage une fois que la technique de détection des bactéries sera améliorée.

Ces premiers résultats sont à prendre avec précautions ; en effet plusieurs limites dues à la technique employée peuvent fausser la détection des bactéries. Le fait qu'une même bactérie ne soit pas toujours détectée chez les différents individus correspondant à

un même réplicat est assez surprenant. En effet il a été montré que la transmission des endosymbiontes secondaires se faisait principalement de façon verticale (Chen et Purcell 1997). Les génotypes identiques présents dans une même colonie sont probablement issus de la reproduction clonale de l'année, on s'attend donc à ce que tous ces individus aient la même communauté d'endosymbiontes secondaires. Cette observation peut avoir plusieurs explications : l'ADN utilisé pouvait être de mauvaise qualité, ou la quantité de bactéries présente était très faible ce qui rend sa détection difficile même après amplification, toutes ses raisons rendent la reproductibilité de la technique de T-RFLP non optimale.

La méthode de T-RFLP est basée sur une identification de bactéries définies *a priori*. La présence de bactéries non recherchées ayant les mêmes sites de restrictions peut conduire à des faux positifs (comme c'est le cas ici pour *Wolbachia* et *Arsenophonus*). Cette technique devrait donc tendre à surestimer la présence des bactéries recherchées.

Si PCR spécifique permet de s'affranchir de l'amplification des bactéries non recherchées, cette technique a ses limites elle aussi. Le génome des bactéries endosymbiotiques évolue rapidement (Mira et Moran 2002; van Ham et al. 2003) et les amorces définies sur un endosymbionte d'une espèce de puceron particulier peuvent perdre leur caractère trans-spécifique si des mutations apparaissent. La détection de *Wolbachia* chez les populations naturelles de pucerons appartenant à plusieurs familles se révèle très aléatoire suivant les gènes amplifiés (Augustinos et al. 2011).

La technique de T-RFLP développée par Carletto (2008) semblait séduisante mais se révèle finalement peu fiable et seules quatre bactéries peuvent être détectées sans trop d'ambiguïté par T-RFLP contre les sept annoncées. La meilleure option serait de passer par une étape de clonage des produits d'amplification du 16S et de les séquencer (Fukatsu 2001), ou d'utiliser les nouvelles techniques de séquençage haut-débit (Costello et al. 2009; Caporaso et al. 2010; Jones et al. 2011). Ces méthodes nous permettraient d'avoir une idée de la diversité bactérienne présente, sans *a priori*. Cependant l'efficacité de toutes ces techniques semblent être limitées par les proportions respectives de bactéries, les plus rares pouvant ne pas être détectées. Une fois la diversité bactérienne établie, les nouveaux candidats peuvent être localisé in-situ (Fukatsu 2001; Koga, Tsuchida, et Fukatsu 2009) afin de s'assurer que les bactéries soient bien impliquées dans des relations endosymbiotiques avec leur hôte puceron. La plupart des bactéries endosymbiotiques secondaires sont localisés dans des cellules spécialisées, et on peut détecter leur présence au sein des

embryons ; ces localisations caractéristiques permettent d'écartier des bactéries pathogènes ou environnementales qui auraient pu être détectées lors de l'amplification du 16S.

Conclusion générale du chapitre, discussion

Nous avons vu qu'au sein du complexe *B. helichrysi*, entre espèces sœurs ou entre lignées, tous partagent la même gamme de plantes hôtes herbacées (mis à part le tournesol cultivé en France auquel seulement H1 semble associé). Ces résultats soulignent le caractère polyphage de *B. helichrysi*, mais également mettent en évidence le caractère généraliste des superclones vis-à-vis de leurs plantes hôtes. L'absence de H2 sur tournesols cultivés en France peut suggérer que les lignées clonales de H2 sont sensibles aux traitements phytosanitaires appliqués sur ces cultures et il serait donc intéressant de les tester en comparant la présence de gènes de résistance aux insecticides chez H1 et H2.

En ce qui concerne les plantes hôtes primaires, notre échantillonnage suggère que H1 et H2 utilisent des hôtes primaires différents. H1 est associée aux pruniers (sauvages et cultivés) dans l'hémisphère Nord appartenant au sous-genre *Prunus*, alors que la lignée sexuée H2 serait associée aux pêchers appartenant au sous-genre *Amygdalus*, en Inde. Ces associations différentielles restent à confirmer par un échantillonnage plus poussé en Inde notamment.

Les lignées sexuées H1 et H2 sont bien dominantes dans les régions aux hivers rudes, ce qui confirme les modèles de contrainte de la reproduction sexuée dans les régions froides (Rispe et al. 1998). Les superclones H2 sont dans l'ensemble retrouvés sous des conditions climatiques communes (MLL-A, MLL-B, MLL-C et MLL-G) sans conditions extrêmes de température ou d'humidité, seuls quelques superclones semblent être dominants sous certains climats particuliers : le superclone MLL-D sous un climat de type tropical, les superclones MLL-H et MLL-I sous des climats de type méditerranéens.

L'association de *B. helichrysi* avec des bactéries endosymbiotiques secondaires peut leur conférer un avantage sélectif. Nous avons retrouvé abondamment *Hamiltonella defensa*, qui peut conférer des défenses aux pucerons face aux parasitoïdes (Oliver et al. 2003; Ferrari et al. 2004; Oliver, Moran, et Hunter 2005; Oliver, Moran, et Hunter 2006;

Vorburger et al. 2009). La moindre prévalence de *Rickettsia* chez H2 pourrait leur conférer un avantage reproductif : en effet il a été montré une baisse de la fécondité chez les pucerons *A. pisum* infectés (Montllor, Maxmen, et Purcell 2002; Sakurai et al. 2005). Cette association ne semble pas conférer d'avantage ou de désavantage sélectif fort chez les pucerons, alors que chez *B. tabaci* elle est impliquée dans des phénotypes thermotolérants (Brumin, Kontsedalov, et Ghanim 2011) et une susceptibilité accrue aux insecticides (Kontsedalov et al. 2008). *Regiella insecticola* est associée à quelques individus, cette bactérie confère des défenses face aux champignons entomopathogènes (Ferrari et al. 2004; Scarborough, Ferrari, et Godfray 2005). *Serratia symbiotica* a également été détectée sporadiquement, son association peut conférer une meilleure résistance aux fortes températures (Chen, Montllor, et Purcell 2000; Montllor, Maxmen, et Purcell 2002).

L'ensemble de ces résultats reste préliminaire car la détection des bactéries secondaires nous a posé des problèmes techniques. Ces problèmes sont peut-être dus aux faibles quantités d'ADN bactérien lié probablement à la très petite taille de *B. helichrysi*.

Par ailleurs notre échantillonnage manque encore de puissance pour mener une analyse statistique solide de l'ensemble des facteurs écologiques qui pourraient influencer sur l'occurrence des bactéries au sein des différentes lignées. Par ailleurs, de nombreux facteurs écologiques ne semblent pas indépendants, par exemple : les variables climatiques ont une influence sur les plantes hôtes disponibles (qu'elles soient cultivées ou sauvages), le mode de reproduction et fortement dépendant de l'espèce, de même que le mode de reproduction est lié aux plantes hôtes (primaires et/ou secondaires), etc. . En l'état, il est donc difficile de tester quels facteurs sont les plus influents.

Enfin, une étude plus approfondie de l'écologie des lignées ainsi que de l'effet des symbiontes sur le phénotype de ces lignées nécessiterait bien sûr des expériences en conditions contrôlées.

Néanmoins, cette étude de l'écologie des superclones H2, souligne leur potentiel ravageur du fait de leur caractère généraliste (plante hôte et climat), et qui devrait persister car sélectionné favorablement d'après Lynch (1984). Cependant il ne semble pas que les superclones H2 soient une menace pour les tournesols cultivés en France, ni pour les vergers de pêchers et de pruniers, mais ils le restent pour les plantes ornementales cultivées sous serres qui offrent des conditions climatiques idéales à leur développement. Nous avons

montré la récurrence de *B. helichrysi* H1 et H2 sur mauvaises herbes dans les zones anthropisées. Ces zones sont souvent caractérisées par des micro-climats tamponnés, ce qui pourrait servir de refuge aux lignées anholocycliques et leur procurer des moyens de dispersion efficace via les activités humaines.

Chapitre 4. Histoire évolutive des espèces, des lignées, et des modes de reproduction

Introduction du chapitre

A. Résumé des résultats précédents

Nous avons montré, au travers des chapitres précédents, que les deux espèces sœurs *B. helichrysi* H1 et H2 rassemblent des lignées aux cycles de vie contrastés. Alors que H1 rassemble des lignées hétéroéciques utilisant des espèces de pruniers comme hôte primaire, H2 rassemble au moins neuf superclones et une lignée hétéroécique retrouvée sur pêcher en Inde. Ces informations suggèrent que les cycles de vie ont évolué au sein de *B. helichrysi*, principalement du fait de la perte de la sexualité.

B. Mécanismes d'évolution du mode de reproduction, perte de la sexualité

L'évolution et le maintien de la reproduction sexuée et asexuée sont des sujets encore grandement débattus. Bien que la sexualité soit le mode de reproduction le plus représenté au sein du vivant (95% des taxa), quelques organismes persistent à se reproduire de manière asexuée. La reproduction asexuée est apparue plusieurs fois indépendamment au sein du vivant, à partir d'un état ancestral sexué. On distingue trois voies principales par lesquelles la perte de la reproduction sexuée peut avoir lieu : la mutation spontanée, l'hybridation, et une origine infectieuse due à des micro-organismes. Ces mécanismes seront détaillés dans ce chapitre.

C. Les marqueurs génétiques pour étudier l'évolution des lignées

Les outils moléculaires sont indispensables pour étudier les relations de parenté entre les différents taxa de pucerons, définir des scénarii de spéciation, comprendre

l'évolution des cycles de vie et des modes de reproduction, ou encore mettre en évidence des évènements de co-spéciation plantes-pucerons ou pucerons-bactéries.

Classiquement, plusieurs marqueurs moléculaires sont utilisés pour des études allant de l'échelle de la famille jusqu'aux populations. Les séquences de fragment de gènes codants ou non codants permettent une amplification interspécifique, apportant plus ou moins d'information au niveau intraspécifique. Le génome bactérien de l'endosymbionte primaire *B. aphidicola* est couramment utilisé car son taux de variation est supérieur à celui du puceron et donc plus informatif pour des études fines au niveau de complexes d'espèces. Au niveau populationnel, les marqueurs les plus couramment utilisés sont les marqueurs microsatellites qui peuvent s'avérer très polymorphiques au sein d'une même espèce.

D. Présentation du chapitre

Dans ce chapitre, nous tenterons de retracer les relations de parentés entre les espèces *B. spiraeae* et *B. helichrysi* H1 et H2, ainsi que les relations entre lignées. Pour ce faire, nous utiliserons des marqueurs moléculaires informatifs aux échelles interspécifique et intraspécifique, et nous utiliserons différentes approches de reconstructions phylogénétiques afin de confronter nos résultats. Les relations de parentés établies nous permettront de comprendre quels sont les mécanismes les plus probables à l'origine de la perte de la sexualité : est-ce que les reconstructions phylogénétiques nous suggèrent des évènements d'hybridation entre espèces ou lignées apparentées, ou plutôt des évènements spontanés de mutations ? Nous tenterons également de dater la divergence du complexe *B. spiraeae-B. helichrysi*. Cette étude sera présentée sous forme d'un article.

I. Article n°4 en préparation pour Molecular Phylogenetics and Evolution. Elucidating the phylogenetic relationships of sexual and asexual lineages in the aphid pest Brachycaudus helichrysi.

Elucidating the phylogenetic relationships of sexual and asexual lineages in the aphid pest *Brachycaudus helichrysi*.

Piffaretti, J., Vanlerberghe-Masutti, F., Clamens, A.-L., Gupta, R. K., Genson, G., Jousselin, E.

Abstract

Reconstructing the evolutionary history of asexual lineages in relation to their sexual relatives is crucial in understanding the origin and maintenance of asexuality. A recent study on the leaf curl plum aphid, *Brachycaudus helichrysi* has shown that it actually gathers two sibling species named *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 differing in their life cycle. *B. helichrysi* H2 is mainly constituted of several obligate asexual lineages and at least one sexual population whereas *B. helichrysi* H1 undergoes regular sexual reproduction in all populations sampled. The number of transitions towards asexuality and the origin of the obligate parthenogenetic lineages remained unelucidated. In this study, using phylogenetic reconstructions based on mitochondrial, nuclear and a *Buchnera* genetic data, on a set of *B. helichrysi* specimens sampled worldwide, we investigate relationships between all *B. helichrysi* lineages, and explore evolutionary scenarios for the loss of sexuality. Phylogenetic trees, haplotype networks and analyses of microsatellite data, suggest that sexual lineages in *B. helichrysi* H2 are not all derived from the sexual one. These phylogenetic hypotheses suggest multiple transitions in the mode of reproduction of *B. helichrysi* H2. The most parsimonious scenario involves one loss of sexuality that could be responsible for the split event between H2 and H1, and one acquisition *de novo*, while alternative scenario implies several independent losses. Comparisons of maternally inherited DNA profiles and nuclear DNA profiles suggest that sexuality losses do not result from hybridization events. Our data favour scenarios in which spontaneous mutations have given rise to *B. helichrysi* H2 asexual lineages, Divergence dating using a *Buchnera* molecular clock suggests that the speciation events in the *B. helichrysi*-complex are quite recent having occurred around 200 000 years ago. We discuss life cycle lability, including host alternation, within this species complex and suggest that these changes are probably involved in the diversification of these taxa.

Key-words: sexuality loss; host plant ; aphids ; molecular clock ; *Buchnera aphidicola*

Introduction

Most eukaryote organisms (more than 95%) reproduce sexually and this mode of reproduction is probably ancestral (Redfield 1999). However obligate asexual reproduction has evolved several times independently through evolutionary times in many taxa (Normark, Judson, et Moran 2003). It is widely distributed among plants, fungi and animals (rotifers, nematodes, arthropods, gastropods, vertebrates except mammals and birds) (G. Bell 1982). So asexual reproduction is common and a derived state from sexuality, but it has never succeeded as a major mode of reproduction in high rank taxa. Asexual reproduction can be achieved through various mechanisms (Meeûs, Prugnolle, et Agnew 2007) leading to a mitotic division of unfertilized gamete (i.e. parthenogenesis) or of a somatic cell (i.e. clonal or vegetative reproduction).

There are at least three ways in which parthenogenetic lineages may arise from sexual ones (Innes et Hebert 1988; Simon et al. 2003) and the mode of origins of these parthenogenetic lineages have important consequences for their level of genetic diversity and ecological adaptability (G. Bell 1982). First, loss of sex may arise via spontaneous origin by mutations of genes underlying the production of sexual forms or affecting mating behaviour. The mutant becomes parthenogenetic and generates an asexual lineage that could be further positively selected. This route is suspected to be at the origin of the spread of asexuality in some genera of gastropods (Johnson et Bragg 1999; Johnson 2005), ostracods (Butlin, Schön, et Martens 1998; Rossi et al. 2007), *Daphnia* (Paland, Colbourne, et Lynch 2005), some *Drosophila* (Stalker 1954) and maybe in some aphids asexual lineages. Second, asexual lineages may rise from hybridization events. This can take place between different species or within a single species that comprises sexual and asexual lines. The crossing of two species reproducing sexually can lead to viable hybrids, and these hybrids can be parthenogenetic if the combinations of mutations from the two parental species disrupt the meiosis process in hybrids. This is the main route for the evolution of asexual species in Vertebrates (Avisé, Quattro, et Vrijenhoek 1992), but it has also been demonstrated in Crustacea (Hebert et al. 1993) and insects (grasshopper (Honeycutt et Wilkinson 1989), aphids (Rakauskas 1999; Turcinaviciene, Rakauskas, et Pedersen 2006)). Asexual lineages can also sometimes breed with sexual lineages of the same species creating a new asexual line (this is called contagious parthenogenesis). It seems that mainly males from asexual lineages are involved in such crosses and contribute to spread asexuality. There is a lack of empirical evidence for this scenario but it is strongly suspected to have occurred in several gastropod species (Samadi et al. 1999; Jokela et al. 2003), ostracods (Turgeon et Hebert 1995), in one earthworm species (Jaenike et Selander 1979), *daphnia*

(Paland, Colbourne, et Lynch 2005) and aphids (Delmotte et al. 2003). Finally, parthenogenesis may be of infectious origin. Micro-organisms such as *Wolbachia* (Werren, Baldo, et Clark 2008) or *Arsenophonus*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* (Cordaux, Bouchon, et Grève 2011) are known as sex manipulators. The processes by which they intervene on the reproductive function are diverse. For instance, in species with haplo-diploid sex determination, *Wolbachia* causes diploidization of unfertilized haploid eggs, which develop as females. These three mechanisms (mutations, hybridization and infections) are not exclusive.

In aphids, the typical annual life cycle, cyclical parthenogenesis, consists in several apomictic parthenogenetic generations, followed by sexual morphs production (males and egg laying females) to generate one sexual reproduction event before winter. But evolution of asexual lineages (i.e. the loss of the sexual generation) is very common in aphids (Moran 1992). Aphid colonies cannot withstand harsh winter conditions over long periods, only the eggs, the product of sexual reproduction are frost resistant (Strathdee, Howling, et Bale 1995). Therefore, purely asexual lineages that skip the sexual phase of the cycle are only favoured when climatic conditions allow the persistence of parthenogenesis throughout the year (Rispe et al. 1998). These lineages can be persistent over decades and exhibit great dispersal abilities leading to largely distributed “superclones” that can become important agricultural pests when associated with cultivated plants. For instance, the grain aphid, *Sitobion avenae*, gathers two main asexual lineages favoured by agricultural practices and widespread over different continents (Haack et al. 2000; Figueroa et al. 2005). *Myzus persicae*, the peach-potato aphid, gathers persistent asexual lineages present from Scotland to Australia (Vorburger, Lancaster, et Sunnucks 2003; Kasprovicz et al. 2008). Asexual lineages in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii*, are specialized onto host-plant species, forming host races that represent major threats worldwide for cotton and melon cultures (Carletto et al. 2009). Some *Acyrtosiphon pisum* persistent clones have invaded Chile from the Old World and established on local legumes (Peccoud et al. 2008). In most cases, these parthenogenetic lineages do not show any clear genetic divergence with their sexual conspecifics suggesting that they are continuously formed from sexual lines (Dedryver et al. 2001; Halkett et al. 2005; Sandrock, Razmjou, et Vorburger 2011). Only 3% of all aphid species seem to be true obligate asexual species (Simon, Rispe, et Sunnucks 2002).

Brachycaudus helichrysi (Kaltenbach, 1843) is a cosmopolitan and polyphagous aphid

(Blackman et Eastop 2000), We have recently shown that what is recognized as *B. helichrysi*, actually gathers two sibling species named *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 (Piffaretti et al. 2012). *Brachycaudus helichrysi* H2 species is mainly constituted of purely asexual lineages (Piffaretti et al. *in prep*), whereas *B. helichrysi* H1 undergoes regular sexual reproduction. *Brachycaudus helichrysi* H1 and most asexual lineages in H2 have a worldwide distribution and share a wide range of herbaceous host plants. The number of transitions towards asexuality and the origin of the parthenogenetic lineages in H2 remained unelucidated.

In aphids, many studies based on ecological data and population genetic analyses have been conducted to demonstrate the existence of sexual and asexual lineages within a species, and understand which factors have favoured the evolution of asexuality (Sunnucks et al. 1996; Delmotte et al. 2002; Simon, Rispe, et Sunnucks 2002; Halkett et al. 2005). The study of asexuality in aphids has also motivated genetic studies that aimed at elucidating which genes and physiological mechanisms are involved in the loss of sexuality (for a transcriptomic approach see for instance (Le Trionnaire et al. 2009)). But very few historical (*i.e.* phylogenetic analyses) studies have been undertaken to investigate relationships between sexual and asexual lineages and determine the number of transitions from sexuality to asexuality. Furthermore, hybridization hypotheses have been explored through artificial breeding between closely related species (e.g. in the *Aphis* genus (Rakauskas 1999) and in the *Sitobion* genus (Sunnucks et al. 1997)) but evidence from empirical phylogenetic studies are underrepresented in the literature on aphids asexuality (but see the work on *Rhopalosiphum padi* by Delmotte et al. (2003)).

Hypotheses for the evolution of asexual lineages can be explored through phylogenetic reconstructions using strictly maternally inherited genetic markers in conjunction with nuclear biparentally inherited genetic markers (Johnson et Bragg 1999; Delmotte et al. 2003; Paland, Colbourne, et Lynch 2005; Rossi et al. 2007; Sandrock, Schirrmeister, et Vorburger 2011). If asexuality has arisen via mutation, or is of infectious origin, the phylogenetic histories of maternally and nuclear markers should correspond perfectly. In contrast if asexual lineages are of hybrid origin, we should detect incongruences between maternal and nuclear gene profiles of individuals resulting in incongruent genealogies.

Studying aphids allows the use of another maternally transmitted genetic marker in addition to mitochondrial DNA. Indeed, aphids are almost all involved in an obligate symbiosis with an intracellular bacterium: *Buchnera aphidicola*. This bacterium is exclusively maternally transmitted (Wilkinson,

Fukatsu, et Ishikawa 2003), and has strictly co-specified with their aphid hosts (Munson et al. 1991; Clark et al. 2000; Jouselin, Desdevises, et Coeur d'acier 2009). The *Buchnera*'s genome evolves faster than mitochondria because as an endosymbiotic bacterium, *Buchnera*'s genome evolves in a degenerative way (Funk, Wernegreen, et Moran 2001; van Ham et al. 2003). This particularity makes the *Buchnera* genome an excellent tool to investigate relationships between closely related taxa and more particularly, when used in conjunction with nuclear markers, to investigate hybridization events between closely related species or divergent lineages within a single species.

In this study, in order to explore scenario for the evolution of asexuality, we use a set of *B. helichrysi* specimens sampled on the five continents, multilocus sequence data from the nuclear, the mitochondrial and the *Buchnera* genome, and 14 microsatellite markers to reconstruct the phylogenetic relationships between all *B. helichrysi* lineages. We investigate the following questions: 1) has the loss of sexuality arise once or several times throughout *B. helichrysi* history?; 2) what is the origin of asexual lineages, are they of hybrid origin?; 3) what is the time frame for the differentiation of these lineages?; 4) is there evidence for population subdivisions within *B. helichrysi* lineages?

Material and methods

The studied model: Brachycaudus helichrysi

Brachycaudus helichrysi, the leaf curl plum aphid, is a cosmopolitan and polyphagous aphid (Blackman et Eastop 2000). We have previously shown that *B. helichrysi* actually encompasses two distinct sister species that we call *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 (Piffaretti et al. 2012). These two taxa are genetically well differentiated but they are morphologically indistinguishable. *B. helichrysi* H1 is heretereocious using plum trees (*P. domestica*, *P. spinosa*, *P. americana*, *P. insititia*, *P. cerasifera*, *i.e.* species belonging to the section *Prunus* of the genus *Prunus*) as primary host plants, and *B. helichrysi* H2 gathers several asexual lineages and one sexual (probably heteroecious) lineage that has been found using peach trees (*P. persicae*, a *Prunus* species that belongs to the section *Amygdalus*) as a primary host plant in India (Piffaretti et al. *in prep*). All these genetic lineages share many secondary herbaceous host plants mainly belonging to Asteraceae and Boraginaceae families. *Brachycaudus helichrysi* represents a serious pest for its cultivated host plants (sunflower (Lerin et Badenhausser 1995;

Badenhauer et Lerin 1998), plum orchards (Madsen et Bailey 1958), and ornamental flowers, such as chrysanthemums (Wardlaw et Gould 1981; Miller et Stoetzel 1997; Ramakers et Maaswinkel 2002) primarily affecting the growth of its host-plants by curling infested leaves, or transmitting viruses like the Plum Pox Virus (Bell 1983; Verma et Singh 1990; Levy et al. 2000).

Aphid sampling

We collected 148 aphid colonies between 1999 and 2012, from various host plants (from 7 plant families, 33 genera) and different parts of the world (13 countries on 5 continents) (Table 1). Each sampled colony was georeferenced and the host plant was identified down to the genus level at least and, where possible, to the species level, with a local flora. All colonies were immediately preserved in 90° ethanol for storage. Each colony corresponded to specimens collected from a single host plant or from two neighbouring host plants of the same species if only a very small number of individuals were present on a single plant. A voucher number was attributed to each colony, which was then transferred to the INRA collection (CBGP, Montpellier), from which they are available upon request. We used one *Brachycaudus salicinae* (Börner, 1939) specimen and several *Brachycaudus spiraeae* (Börner, 1932) specimens from a previous study (Coeur d'acier et al. 2008), which, like *B. helichrysi*, belong to the genus *Brachycaudus* and subgenus *Brachycaudus* as well as a specimen of a more distantly related species, *Brachycaudus tragopogonis* which belongs to the genus *Brachycaudus* subgenus *Appelia* (Coeur d'acier et al. 2008) as outgroups for our phylogenetic reconstructions. The trees were rooted using *B. tragopogonis*.

DNA extraction

From each sampled colonies, we took one to ten individuals for DNA sequencing and genotyping.

Total genomic DNA was extracted from a single individual per sample with the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) in 50 µl of extraction buffer, or with BioBasics extraction kit (Bio Basic Inc., Ontario, Canada) in 96 well plate in 50 µl of extraction buffer, or in 10 % (w/v) Chelex® 100 resin solution (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) in a 96 wells plate (see Piffaretti et al. (2012) for details). All DNA samples were stored at – 20°C.

As DNA amplification for sequencing often required higher quantities of DNA of better quality than amplification for microsatellites genotyping, and as *B. helichrysi* individual are very small (adults are c.a. 2 mm long, and DNA extraction was sometimes conducted on larvae), we could not always conduct sequencing and genotyping on the same DNA extracts (i.e. on the same individuals).

DNA amplification and sequencing

All polymerase chain reactions (PCR) were performed in a final volume of 30 µl containing 1x reaction buffer (Coraload PCR Buffer, Qiagen), 0.1 mM of each dNTP, 0.7 µM of each primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase and 2 or 3 µl of DNA extract; in an Eppendorf thermocycler.

We amplified two coding regions from the mitochondrial genome: a partial fragment from the mitochondrial *cytochrome oxidase subunit I* (COI) and a partial fragment from the mitochondrial *cytochrome B* gene (CytB). We amplified a non-coding nuclear marker corresponding to a fragment of the *para*-type gene encoding the *IIS2-S6* region of the voltage-gated sodium channel of the *B. helichrysi* nuclear genome (Aph). We amplified four partial sequences from the genome of the primary symbiont *Buchnera aphidicola*; three markers from the bacterial chromosome: a non-coding fragment of the *ssb-dnaB* intergenic spacer (sdna), a fragment of the *Tryptophane biosynthetase* coding region (TrpB), and a fragment of the *MethionineE* coding region (Met). The fourth bacterial marker was a fragment from the *LeucineC* coding region localized on a bacterial plasmid (pLeu). Primers sequences and PCR conditions are given in table S2.

Sequencing reactions were carried out by Macrogen (Korea) and MWG (Germany), with the PCR primers. All sequences not published in Piffaretti et al (2012) were submitted to the Genbank database (accession numbers).

Microsatellites amplification and genotyping

We used the 14 primer pairs previously designed for microsatellite markers and their four associated multiplex PCRs (for details on microsatellites markers and PCR conditions see Piffaretti et al. (2012)). The amplification products of the four multiplex PCR were analyzed on an ABI capillary sequencer by the SeqGen platform (CeMEB Labex, Montpellier, France). Alleles were scored by length and genotyping was carried out with GENEMAPPER v4.0 (Applied Biosystems), the results then being checked and corrected by eye.

Phylogenetic analyses

a) Sequences alignment

All chromatograms were inspected, corrected and preliminary alignments were generated with Seqscape v2.5 (Applied Biosystems) software. Alignments were performed with ClustalW via Bioedit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0 software (Hall 1999) and adjusted by eye. All coding genes were checked for protein coding frameshifts, to eliminate pseudogenes (Zhang et Hewitt 1996), with Mega v4.1

Table 1. *Brachycaudus helichrysi* sampling information.

sample	month	year	host plant family	host plant genus	host plant species	locality	Region / State	Country
705	6	1999	Asteraceae	Saussurea	alpina	Gerardmer	Lorraine	France
761	6	1999	Asteraceae	Solidago	glomerata	Gerardmer	Lorraine	France
852	6	2000	Asteraceae	Helichrysum	stoechas	Ondres	Aquitaine	France
1149	6	2001	Asteraceae	Achillea	millefolium	Heurteauville	Haute-Normandie	France
1207	6	2001	Rosaceae	Prunus	spinosa	Imbleville	Haute-Normandie	France
1455	5	2002	Asteraceae	Scorzonera	sp.	Kariés	Péloponèse	Grèce
1608	6	2002	Asteraceae	Achillea	sp.	Kalavrita	Péloponèse	Grèce
1681	4	2005	Asteraceae	Senecio	sp.	Saint-Martin-de-Crau	Provence-Alpes-Côte d'Azur	France
1712	4	2005	Rosaceae	Prunus	domestica	Saint-Clar	Midi-Pyrénées	France
1716	4	2005	Rosaceae	Prunus	domestica	Gramont	Midi-Pyrénées	France
1749	5	2005	Rosaceae	Prunus	domestica	Pontarlier	Franche-Comté	France
1775	-	2005	Rosaceae	Spiraea	sp.	La Grave	Provence-Alpes-Côte d'Azur	France
1805	10	2005	Goodeniaceae	Goodeniaceae	sp.	Cervantes	Western Australia	Australia
1809	10	2005	Asteraceae	Helianthus	annuus	Port Denison	Western Australia	Australia
1828	10	2005	Asteraceae	unknown	sp.	Cardwell	Queensland	Australia
1926	4	2006	Asteraceae	Senecio	vulgaris	Rouet	Languedoc-Roussillon	France
1937	5	2006	Asteraceae	Prunus	spinosa	Montferrier-sur-Lez	Languedoc-Roussillon	France
1939	5	2006	Rosaceae	Prunus	spinosa	Rouet	Languedoc-Roussillon	France
1946	5	2006	Asteraceae	Chrysanthemum	sp.	Catania	Sicile	Italy
1987	5	2006	Asteraceae	unknown	sp.	Castiglione di Sicilia	Sicile	Italy
2048	5	2006	Asteraceae	Tanacetum	vulgare	Zafferana Etnea	Sicile	Italy
2142	8	2006	Asteraceae	Senecio	vulgaris	Kinlochewe	Ecosse	UK
2143	8	2006	Rosaceae	Spiraea	salicifolia	Lochcarron	Ecosse	UK
2170	4	2007	Rosaceae	Prunus	sp.	Almaty	Almaty	Kazakhstan
2185	4	2007	Rosaceae	Prunus	sp.	Almaty	Almaty	Kazakhstan
2211	4	2007	Rosaceae	Prunus	sp.	Almaty	Almaty	Kazakhstan
2218	5	2007	Rosaceae	Prunus	domestica	Zhabagly	Ongtustik	Kazakhstan
2226	5	2007	Rosaceae	Spiraea	sp.	Zhabagly	Ongtustik	Kazakhstan
2240	5	2007	Rosaceae	Spiraea	sp.	Talghar	Almaty	Kazakhstan
2281	5	2007	Asteraceae	Tragopogon	sp.	Montferrier-sur-Lez	Languedoc-Roussillon	France
2379	4	2007	Myoporaceae	Myoporum	sp.	-	-	Algeria
2391	12	2007	Oenotheraceae	Oenothera	sp.	Quenés 3	Cachapoal Province	Chile
2398	12	2007	Asteraceae	Haplopappus	sp.	-	Cachapoal Province	Chile
2407	4	2008	Asteraceae	Cynara	scolymus	Montpellier	Languedoc-Roussillon	France
2408	5	2008	Boraginaceae	Myosotis	sp.	Montpellier	Languedoc-Roussillon	France
2411	5	2008	Boraginaceae	Cynoglossum	creticum	Montferrier-sur-Lez	Languedoc-Roussillon	France
2412	5	2008	Rosaceae	Prunus	domestica	Montpellier	Languedoc-Roussillon	France
2422	5	2008	Rosaceae	Prunus	domestica	Montpellier	Languedoc-Roussillon	France
2424	5	2008	Rosaceae	Prunus	domestica	Antibes	Provence-Alpes-Côte d'Azur	France
2433	5	2008	Asteraceae	Senecio	vulgaris	Antibes	Provence-Alpes-Côte d'Azur	France
2448	5	2008	Asteraceae	Carthamus	lanatus	Banyuls-sur-Mer	Languedoc-Roussillon	France
2455	5	2008	Asteraceae	Helichrysum	sp.	Banyuls-sur-Mer	Languedoc-Roussillon	France
2458	5	2008	Asteraceae	Calendula	sp.	Collioure	Languedoc-Roussillon	France
2463	5	2008	Asteraceae	Helianthus	annuus	Saint-Usage	Bourgogne	France
2464	5	2008	Rosaceae	Prunus	insititia	Thillot	Lorraine	France
2465	5	2008	Rosaceae	Prunus	insititia	-	Lorraine	France
2469	5	2008	Asteraceae	Helianthus	annuus	Morville-sur-Seille	Lorraine	France
2477	5	2008	Asteraceae	Helianthus	annuus	Tonneins	Aquitaine	France
2487	6	2008	Asteraceae	Helianthus	annuus	Fresnay-sur-Sarthe	Pays-de-Loire	France
2505	6	2008	Asteraceae	unknown	sp.	Almaty	Almaty	Kazakhstan
2528	6	2008	Asteraceae	unknown	sp.	Medeu	Almaty	Kazakhstan
2555	6	2008	Asteraceae	Conyza	sp.	Zhabagly	Ongtustik	Kazakhstan
2583	7	2008	Asteraceae	Achillea	millefolium	-	Ongtustik	Kazakhstan
2586	7	2008	Rosaceae	Spiraea	hypericifolia	Zhabagly	Ongtustik	Kazakhstan
2595	6	2008	Asteraceae	Helianthus	annuus	Broue	Centre	France
2598	6	2008	Asteraceae	Helianthus	annuus	Villemardy	Centre	France
2683	7	2009	Asteraceae	Senecio	sp.	Tende	Provence-Alpes-Côte d'Azur	France
2791	9	2009	Asteraceae	Senecio	sp.	Valleraugue	Languedoc-Roussillon	France
2794	10	2009	Asteraceae	Senecio	sp.	Saint-Guilhem-le-Desert	Languedoc-Roussillon	France
2819	5	2010	Rosaceae	Spiraea	sp.	Zhabagly	Ongtustik	Kazakhstan
2821	5	2010	Rosaceae	Spiraea	sp.	Zhabagly	Ongtustik	Kazakhstan
2980	6	2011	Asteraceae	Helichrysum	sp.	Pescadero beach	California	USA
3002	6	2011	Asteraceae	Chrysanthemum	sp.	Oakridge	Oregon	USA
3019	6	2011	Asteraceae	Achillea	sp.	Westport	Washington	USA
3020	6	2011	Rosaceae	Prunus	cerasifera	Elma	Washington	USA
RF1	6	2006	Asteraceae	Achillea	millefolium	Ruby Beach	Washington	USA
RF4	8	2007	Ericaceae	Arctostaphylos	uva-ursi	Parksville	British Columbia	Canada
RF5	5	2002	Asteraceae	Eupatorium	maculatum	Tamasee	South Carolina	USA
RF9	3	2008	Asteraceae	Ozothamnus	sp.	Chaslans	Dunedin	New Zealand
RF10	7	2006	Asteraceae	Chrysanthemum	sp.	Beecroft	New South Wales	Australia
Bh97	4	2010	Asteraceae	Senecio	vulgaris	Prades-sur-Lez	Languedoc-Roussillon	France
Bh98	4	2010	Asteraceae	Senecio	vulgaris	Prades-sur-Lez	Languedoc-Roussillon	France
Bh99	5	2010	Boraginaceae	Symphytum	orientale	Montpellier	Languedoc-Roussillon	France
Bh100	5	2010	Rosaceae	Prunus	domestica	Montpellier	Languedoc-Roussillon	France
Bh101	5	2010	Asteraceae	Helianthus	tuberosus	Paris	Ile-de-France	France

Table 1. continued

sample	month	year	host plant family	host plant genus	host plant species	locality	Region / State	Country
Bh103	5	2010	Rosaceae	Prunus	domestica	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh109	5	2010	Asteraceae	Conyza	canadensis	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh118	5	2010	Asteraceae	Matricaria	sp.	Zhabagly	Ongtustik	Kazakhstan
Bh124	5	2010	Rosaceae	Prunus	sp.	Zhabagly village	Ongtustik	Kazakhstan
Bh132	5	2010	Asteraceae	Achillea	millefolium	-	Ongtustik	Kazakhstan
Bh133	5	2010	Asteraceae	Achillea	sp.	-	Ongtustik	Kazakhstan
Bh134	5	2010	Rosaceae	Prunus	spinosa	-	Ongtustik	Kazakhstan
Bh135	5	2010	Asteraceae	Matricaria	sp.	-	Ongtustik	Kazakhstan
Bh136	5	2010	Asteraceae	Achillea	millefolium	-	Ongtustik	Kazakhstan
Bh139	5	2010	Asteraceae	unknown	unknown	-	Ongtustik	Kazakhstan
Bh140	5	2010	Asteraceae	unknown	unknown	-	Ongtustik	Kazakhstan
Bh144	5	2010	Rosaceae	Prunus	sp.	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh152	6	2010	Asteraceae	Senecio	vulgaris	Antibes	Provence-Alpes-Côte d'Azur	France
Bh159	6	2010	Asteraceae	Senecio	sp.	Soustons	Aquitaine	France
Bh160	6	2010	Asteraceae	Matricaria	sp.	Soustons	Aquitaine	France
Bh164	6	2010	Asteraceae	Helichrysum	arenarium	Ondres	Aquitaine	France
Bh167	6	2010	Asteraceae	unknown	unknown	Hossegor	Aquitaine	France
Bh171	6	2010	Asteraceae	Conyza	canadensis	Denver	Colorado	USA
Bh172	6	2010	Asteraceae	Achillea	sp.	Denver	Colorado	USA
Bh173	6	2010	Asteraceae	Achillea	sp.	Denver	Colorado	USA
Bh174	6	2010	Asteraceae	Achillea	sp.	West Lake	Colorado	USA
Bh175	7	2010	Asteraceae	Achillea	sp.	Bennett Creek	Colorado	USA
Bh176	7	2010	Asteraceae	Achillea	sp.	Gate River	Colorado	USA
Bh182	7	2010	Asteraceae	Matricaria	sp.	Fruita Reservoir	Colorado	USA
Bh203	5	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Santa Barbara	California	USA
Bh222	6	2011	Asteraceae	Eriophyllum	staechadifolium	-	California	USA
Bh225	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	San Simeon	California	USA
Bh230	6	2011	Asteraceae	Anaphalis	sp.	Carmel	California	USA
Bh232	6	2011	Asteraceae	Anaphalis	sp.	Carmel	California	USA
Bh246	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Manresa state beach	California	USA
Bh247	6	2011	Asteraceae	Anaphalis	sp.	Manresa state beach	California	USA
Bh251	6	2011	Asteraceae	Euryops	pectinatis	Manresa state beach	California	USA
Bh277	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Auburn	California	USA
Bh290	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	McCloud	California	USA
Bh292	6	2011	Asteraceae	Achillea	sp.	McCloud	California	USA
Bh319	6	2011	Asteraceae	Achillea	sp.	Florence	Oregon	USA
Bh327	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Portland	Oregon	USA
Bh330	6	2011	Asteraceae	Anaphalis	sp.	Portland	Oregon	USA
Bh348	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	The Dalles	Oregon	USA
Bh349	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	The Dalles	Oregon	USA
Bh352	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	The Dalles	Oregon	USA
Bh353	6	2011	Asteraceae	Senecio	viscosus	The Dalles	Oregon	USA
Bh359	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Maryhill State Park	Washington	USA
Bh360	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Hermiston	Oregon	USA
Bh374	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Walla Walla	Washington	USA
Bh377	6	2011	Rosaceae	Prunus	cerasifera	Yakima	Washington	USA
Bh379	6	2011	Asteraceae	Achillea	filipendulina	Yakima	Washington	USA
Bh400	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Edmons	Washington	USA
Bh405	6	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Paris	Ile-de-France	France
Bh406	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh407	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh408	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh409	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh410	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh411	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh412	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh413	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh414	3	2011	Rosaceae	Prunus	persica	Jammu	Jammu and Kashmir	India
Bh421	6	2006	Asteraceae	Crepis	sp.	Lalehzar	Kerman Province	Iran
Bh435	6	2011	Asteraceae	Centaurea	solstitialis	Batna	Batna Province	Algeria
Bh436	6	2011	Asteraceae	Koelpinia	linearis	Ghardaia	Ghardaia Province	Algeria
Bh437	7	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	St Clément de rivière	Languedoc-Roussillon	France
Bh439	6	2011	Asteraceae	Erechtites	hieracifolia	St Lucie	Florida	USA
Bh440	6	2011	Asteraceae	Erechtites	hieracifolia	St Lucie	Florida	USA
Bh447	8	2011	Asteraceae	Leucanthemum	crassifolium	Vieux Boucau	Aquitaine	France
Bh454	8	2011	Asteraceae	Helichrysum	arenarium	Lac Leon	Aquitaine	France
Bh533	8	2011	Asteraceae	Senecio	vulgaris	St-Martin-sur-Armançon	Bourgogne	France
Bh535	8	2011	Asteraceae	Conyza	canadensis	Mélisey	Bourgogne	France
Bh536	12	2010	Asteraceae	Senecio	sp.	Crozet Islands	Crozet Islands	Crozet Islands
Bh540	5	2011	Rosaceae	Prunus	americana	Fort Collins	Colorado	USA
Bh547	5	2011	Rosaceae	Prunus	americana	Fort Collins	Colorado	USA
Bh548	4	2012	Asteraceae	unknown	unknown	Bourg-lès-Valence	Rhône-Alpes	France
Bh552	4	2012	Asteraceae	Cirsium	arvense	INRA Gotheron	Rhône-Alpes	France

b) Classical phylogenetic analyses

Phylogenetic analysis of each gene was performed using Maximum Likelihood (ML) optimization in GARLI 0.97 (Zwickl 2006) and Bayesian inference using Mr Bayes v.3.1.2 (Huelsenbeck et al. 2001). First, the computer program MODELTEST version 3.7 (Nylander 2003) in combination with PAUP* 4.10b (Swofford 2001) was used to select an appropriate substitution model for each DNA fragment under the Akaike information criteria (AIC) and hierarchical likelihood ratio test.

ML “best tree” analyses, using the selected model, consisted of 100 searches using a stepwise addition starting tree and were conducted with the default settings in GARLI.

Each Bayesian analysis included two MCMC runs, each composed of four chains, three heated and one cold. Each Markov chain was started from a random tree and run for up to 10×10^6 generations, sampling the chains every 100th cycle. At the end of each run we considered the sampling of the posterior distribution to be adequate if the average standard deviation of split frequencies was < 0.01 . The log-likelihood scores of sample points were plotted against generation time to determine when the chain became stationary. After discarding the “burn-in” samples MCMC runs were summarized and further investigated for convergence of all parameters, using *sump* and *sumt* commands in MrBAYES and the computer program TRACER version 1.4 (Rambaut et Drummond 2007). Data remaining after discarding burn-in samples were used to generate a majority-rule consensus tree where the percentage of samples recovering any particular clade of the consensus tree represented the clade’s posterior probability (Huelsenbeck et al. 2001). Probabilities of 95% or higher were considered significant support. The mean, variance, and 95% credibility intervals were calculated from the set of substitution parameters.

Phylogenetic analyses were then conducted on combined DNA matrix: for DNA fragments that gave similar phylogenetic tree topologies were concatenated using Concatenator (Pina-Martins et Paulo 2008) then used as DNA partitions in combined analyses. Each partition was assigned the model of evolution available in the program that best fitted the one selected with Modeltest. ML partitioned bootstrap analyses consisted of 1000 pseudoreplicates, using a stepwise addition starting tree and the default settings in GARLI. Partitioned Bayesian analyses were conducted with the same approach as the one adopted above.

c) Topology tests

Our analyses gave three conflicting topologies depending on the set of genes analyzed. To assess the robustness of this result, we performed Shimodeira-Hasegawa (SH) tests in order to compare the likelihood of these three topologies under all alternative data sets. This was accomplished by conducting ML analyses on each dataset, under topological constraints in GARLI. The SH test were conducted in PAUP v4.0b10 with RELI (resampling estimated log-likelihood optimization) and 10000 bootstrap replicates. We optimized the model parameters for each dataset constrained to each alternative tree.

d) Species tree from multilocus data

We also adopted a “total evidence” approach by combining all DNA fragments in a single matrix. Bayesian inference and ML searches were conducted as specified above for combined partitioned DNA dataset.

In addition, on this combined dataset, we ran a Bayesian inference using a coalescent model to infer species trees from multilocus data sampled from multiple individuals across a set of closely related species as implemented in *BEAST (Heled and Drummond 2010). Sequence evolution was modeled using GTR or HKY depending on the partition. Tree shapes were assumed to follow a Yule process and population sizes considered as constant. Substitution models, tree models and clock models for each DNA fragment were unlinked. As our primary goal here was not to obtain dates of divergence but merely to obtain a species tree from multilocus data, we assumed strict clock models, with a substitution rates fixed to 1 for each DNA partition. MCMC chains were run for 10^8 generations. MCMC runs were investigated for convergence of all parameters using TRACER version 1.4 (Rambaut et Drummond 2007). After discarding the burnin period, we summarized the results using Tree annotator to obtain a species tree.

Haplotype networks reconstruction within

H2

Haplotype networks of each *Buchnera* gene fragment (sdna, Met, pLeu) and concatenated *Buchnera* DNA fragments (sdna + Met + pLeu) were built using statistical parsimony methods implemented in TCS Network 1.21 (Clement, Posada, et Crandall 2000) for specimens belonging to *B. helichrysi* H2. TrpB sequences corresponded to a single haplotype within H2, consequently this *Buchnera* dataset was not informative and was discarded from further analyses. The program collapses sequences into haplotypes and calculates the frequencies of the haplotypes in the sample. These frequencies are used to estimate haplotype outgroup probabilities, which correlate with

haplotype age (Donnelly, Tavaré, et Tavaré 1986; Castelleo et Templeton 1994). In the graphical output, haplotypes are symbolized as ovale or square with a size proportional to the haplotype frequency. The haplotype in the square has the biggest outgroup weight.

Divergence – dating analyses

Obtaining time estimates of divergence are generally based upon known historical events, geologic or fossil, which can be used as calibration points for a taxon specific mutation rate estimate. For the species complex we are studying, no such fossils are available, so we confronted this problem using fixed *Buchnera aphidicola* substitution rate estimates (Moran, McLaughlin, et Sorek 2009) on the *Buchnera* multilocus dataset.

We used the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method to estimate divergence time as implemented in BEAST V. 1.7.4 (Drummond et Rambaut 2007). This was run on the concatenated alignment of the *Buchnera* fragments that gave congruent trees. The BEAST runs comprised 10^8 generations sampled every 1000 generations using a $1.1 \cdot 10^{-7}$ substitution rate per site per year (as estimated by Moran et al (2009) and a strict molecular clock (preliminary analyses using relaxed molecular clocks did not reject the hypothesis of constant molecular evolution of the sequences). Loci were assumed to evolve independently (unlinked substitution models) under the models chosen by modeltest (GTR or HKY with or without proportion of invariant sites and a gamma distribution for depending on the partition). As a demographic model, we specified a coalescent tree model because our dataset mainly included sequences from individuals belonging to the same species, with population sizes set as constant. In order to ensure convergence and correct effective sample size (ESS), two chains were run then combined using LogCombiner V1.61 (Rambaut et Drummond 2010). Convergence was assessed by inspection of the trace plots using Tracer V1.5. Burn-in was set to remove 20% of the total trees sampled and after discarding the burnin samples, trees were summarized using Tree annotator.

In addition we ran *BEAST (Heled and Drummond 2010) on a matrix made of the concatenation of all *Buchnera* fragments (Met, sdna, pLeu, TrpB). Outgroups (*B. salicinae* and *B. tragopogonis*) for which we had a single individual, were excluded from this analysis. Sequence evolution was modeled using GTR or HKY depending on the partition. Tree shapes were assumed to follow a Yule process and population sizes considered as constant. Again a strict molecular clock with a substitution rate set to $1.1 \cdot 10^{-7}$ was assumed for all loci. MCMC chains were run for 10^8 generations and summarized using Tree annotator after inspection using Tracer v5.1..

Microsatellite data

Phylogenetic reconstructions based on microsatellite data were conducted using POPULATIONS software (Langella 1999). We used a dataset with genotypes of several H1 and H2 individuals that we used for phylogenetic reconstructions based on DNA sequences data, some additional genotypes of H2 to best represent the genotypic diversity within H2 lineages, and a genotype of *B. tragopogonis* as outgroup. A distance matrix was constructed using the D_A distance (Nei, Tajima, et Tateno 1983) as suggested for microsatellites data by Takezaki and Nei (Takezaki et Nei 1996; Takezaki et Nei 2008) to reconstruct topology. We used a Neighbor-joining tree (NJ) for phylogenetic reconstructions and we run 1000 bootstraps replicates. Bootstraps on phylogenetic trees built from microsatellites data are usually very low, we present here all bootstrap values even if they are very low. We additionally used Goldstein distance for estimating branch lengths as suggested by Takezaki and Nei (Takezaki et Nei 1996) for microsatellite data.

We used a factorial correspondence analysis (AFC) approach, available in GENETIX software version 4.0.5.2 (Belkiri et al. 2000) to visualize representatives of each genotype in a multidimensional space (3D) based on allelic data. We used this approach rather than any other discriminant approaches because it does not group individuals into groups defined *a priori*. This analysis provides an objective graphical representation of lineages relationships that can be used in comparisons with model based (sequence evolution) or distance based (NJ tree) tree reconstructions.

Life cycle evolution and host plant association

Mode of reproduction of each specimen was annotated on the *Buchnera* tree (obtained with the combined analyses of sdna, MetE, pLeu). Mode of reproduction was determined in a previous study (Piffaretti et al. *in prep*) by populations' genetic analyses on the microsatellite data. In Piffaretti *et al. (in prep)*, we identified 8 H2 multilocus lineages (MLL) corresponding to 8 H2 asexual lineages, and H1 and H2 genotypes that belonged to populations undergoing sexual reproduction. Each specimen in the phylogeny was assigned a mode of reproduction based on whether its genotype belonged to a recognized MLLs or a sexual population. Experimental tests of sex induction were conducted on MLLA and showed that asexuality was irreversible in this clonal lineage (Piffaretti et al. *in prep*). We also annotated specimens in the tree with their host plant association (plant families and genera) and their geographic origin (countries).

Trees were edited and annotated using Treedyn software (Chevenet et al. 2006).

Character reconstructions were first achieved by maximum parsimony (MP) methods, as implemented in Mesquite version 2.7.1 (Maddison et Maddison 2008). Maximum likelihood (ML) reconstructions were also conducted under a single-rate Markov model of evolution (Mk1 model, as implemented in Mesquite) and using a likelihood decision threshold of 2 (the decision threshold is the minimum difference in likelihood between the best and the next best state required to assign a state to a node). This was conducted on the *Buchnera* tree).

Results

Phylogenetic relationship between H1 and H2 species

ML “best tree searches” and Bayesian phylogenetic analyses, using aphid mitochondrial DNA fragment (Cytb and COI) and aphid nuclear DNA (Aph) gave congruent topologies: *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 appeared as sister species, this relationship was strongly sustained by high bootstrap and posterior probability values (not shown). In contrast, three *Buchnera* DNA fragments (sdna, Met and the plasmid located pLeu) suggested an alternative phylogenetic hypothesis, in which *B. spiraeae* and *B. helichrysi* H1 were sister species (not shown). The fourth *Buchnera* DNA fragment, the coding gene Trpb, yielded a third topology, suggesting that *B. spiraeae* and H2 were sister species (fig.1). All alternative topologies were supported by high bootstrap and posterior probability values.

We therefore concatenated all aphid DNA fragments (mitochondrial (COI and CytB) and nuclear (Aph) markers) together in one supermatrix and the three bacterial DNA fragments sdna, MetE and pLeu giving congruent topologies in a second supermatrix, for subsequent partitioned analyses.

ML and Bayesian phylogenetic reconstructions, using the aphid DNA partitioned dataset, suggested that *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 were sister species, this relationship was strongly sustained by high bootstrap and posterior probability values (fig. 1). In contrast, reconstructions based on the *Buchnera* DNA partitioned dataset confirmed the alternative phylogenetic hypothesis, suggesting that *B. spiraeae* and *B. helichrysi* H1 were more closely related (fig.1). All topologies were sustained by high bootstrap and posterior probability values. Though the SH tests were not significant (Table 2), except for one test involving the TrpB dataset. As all topologies were strongly sustained, we chose to present phylogenetic hypotheses obtained with aphid and bacterial DNA. Furthermore, the

relationship within each species did not differ between alternative dataset.

Total evidence approaches (ML, Bayesian and *Beast) using the supermatrix resulting from the concatenation of all DNA fragments, all converged on the topology obtained with the aphid DNA: H1 and H2 appeared as sister species, with *B. spiraeae* as a sister clade (as in Fig 1A.).

Phylogenetic relationships within H1

Phylogenetic reconstructions based on sdna *Buchnera* gene fragment tended to cluster H1 specimens from Kazakhstan (data not shown), while reconstructions based on Met and pLeu did not reveal this Kazakh cluster, consequently this trend was not sustained in the partitioned *Buchnera* dataset analyses (fig 2). But the microsatellites NJ tree also yielded H1 Kazakh genetic cluster, diverging from all other H1 specimens from Europe and North America (Fig 3).

Phylogenetic relationships within H2 lineages

Phylogenetic reconstructions based on sequences and microsatellites revealed some sub-structuring within *B. helichrysi* H2.

The microsatellites NJ tree clearly yielded 11 genetic clusters (fig. 3) corresponding to: 1) the H2 sexual lineage collected on peach tree in India, 2) the 8 H2 superclones previously identified (Piffaretti *in prep*) and one additional lineage corresponding to samples from very distant localities in Algeria and South of France, from 2008 to 2011, which we suspect to be an additional asexual lineage (hereafter called MLL-I), and 3) isolated genotypes without no strong relatedness to any other genetic clusters (one individual from Kazakhstan, one from South-West of France). The sexual lineage was positioned as a derived group in the tree, appearing more closely related with MLLH, MLLD and MLLI. But bootstrap values were very low for almost all nodes in this tree as it is generally observed for trees obtained with microsatellites data.

..

Networks of *Buchnera* haplotypes revealed some clustering patterns that are consistent through analyses of individual genes or concatenated dataset analyses. Two groups of haplotypes appeared, in all network reconstructions. The first group connected haplotypes from individuals belonging to asexual lineages MLL-A, MLL-B, MLL-C, MLL-G and MLL-I. The second group connected haplotypes from individuals belonging to asexual lineages MLL-D, MLL-F, MLL-H and the sexual lineage using peach trees in India. This second group seemed to have recently evolved from the previous one from which the most probable outgroup haplotype belonged (fig 4). This outgroup

haplotype was shared by all the asexual lineages belonging to the first group (i.e. at least one haplotype of each asexual lineage MLL-A, MLL-B, MLL-C, MLL-G and MLL-I corresponded to the outgroup haplotype) (fig. 4). The divergence between the two groups was partly confirmed by phylogenetic reconstruction based on the *Buchnera*

DNA sequence dataset (fig 2): this tree retrieved a clade formed by individuals from the second group, this relationship was strongly sustained by high posterior probability and bootstraps values (fig. 1C), individuals found in the first group formed a polytomy.

Table 2: Ln likelihoods of aphids and *Buchnera* trees under alternative datasets. Significance levels were determined using SH test. *P* values represent the probability that the score of the ML tree for a given dataset is significantly higher than alternative topologies.

Data set/topology	Aphid	<i>Buchnera</i> (3 fragments)	<i>Buchnera</i> Trpb
Aphid	4462,51	4465,12- <i>P</i> = 0.39	4465,15 <i>P</i> = 0.40
<i>Buchnera</i> (3 fragments)	4642,63 <i>P</i> = 0.30	4639,01	4642,74 <i>P</i> = 0.30
<i>Buchnera</i> Trpb	972,04 <i>P</i> = 0.15	983,28 <i>P</i> = 0.033 **	964,06

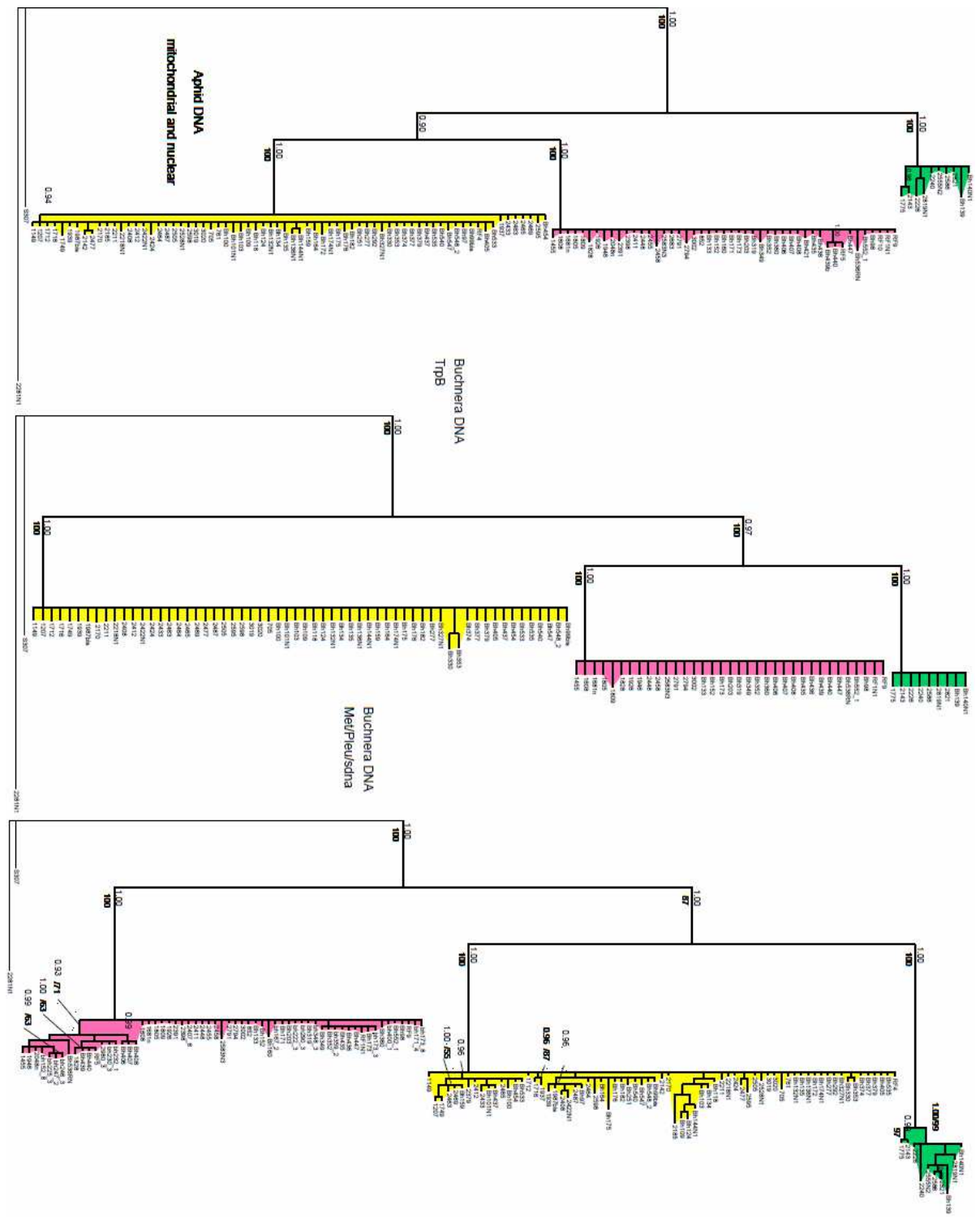


Figure 1. Phylogenetic reconstructions based on aphid and *Buchnera* markers giving relationship between *B. spiraeae*, *B. helichrysi* H1 et *B. helichrysi* H2. The topology presented is the one inferred by Bayesian Inference. Posterior probability from BI and bootstrap values from ML analyses were both presented. In pink: H2, in yellow: H1 and in green: *B. spiraeae*.

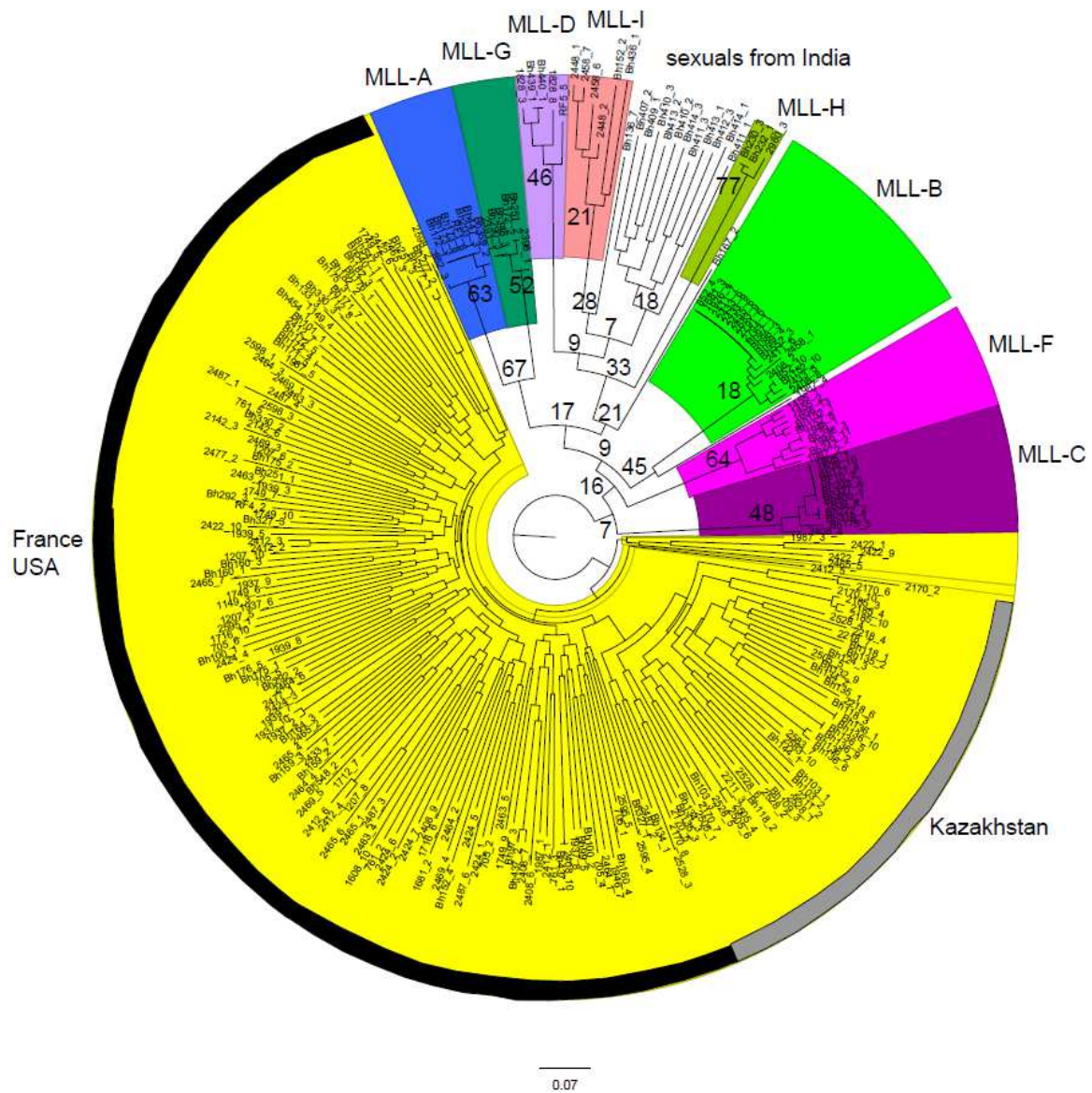


Figure3. Phylogenetic reconstructions based on microstaellites data giving relationship between *B. helichrysi* H1 et *B. helichrysi* H2. The topology is the one inferred by Neighbour Joining using the D_A distance matrix. Bootstrap values for H2 lineages were presented. In yellow: H1.

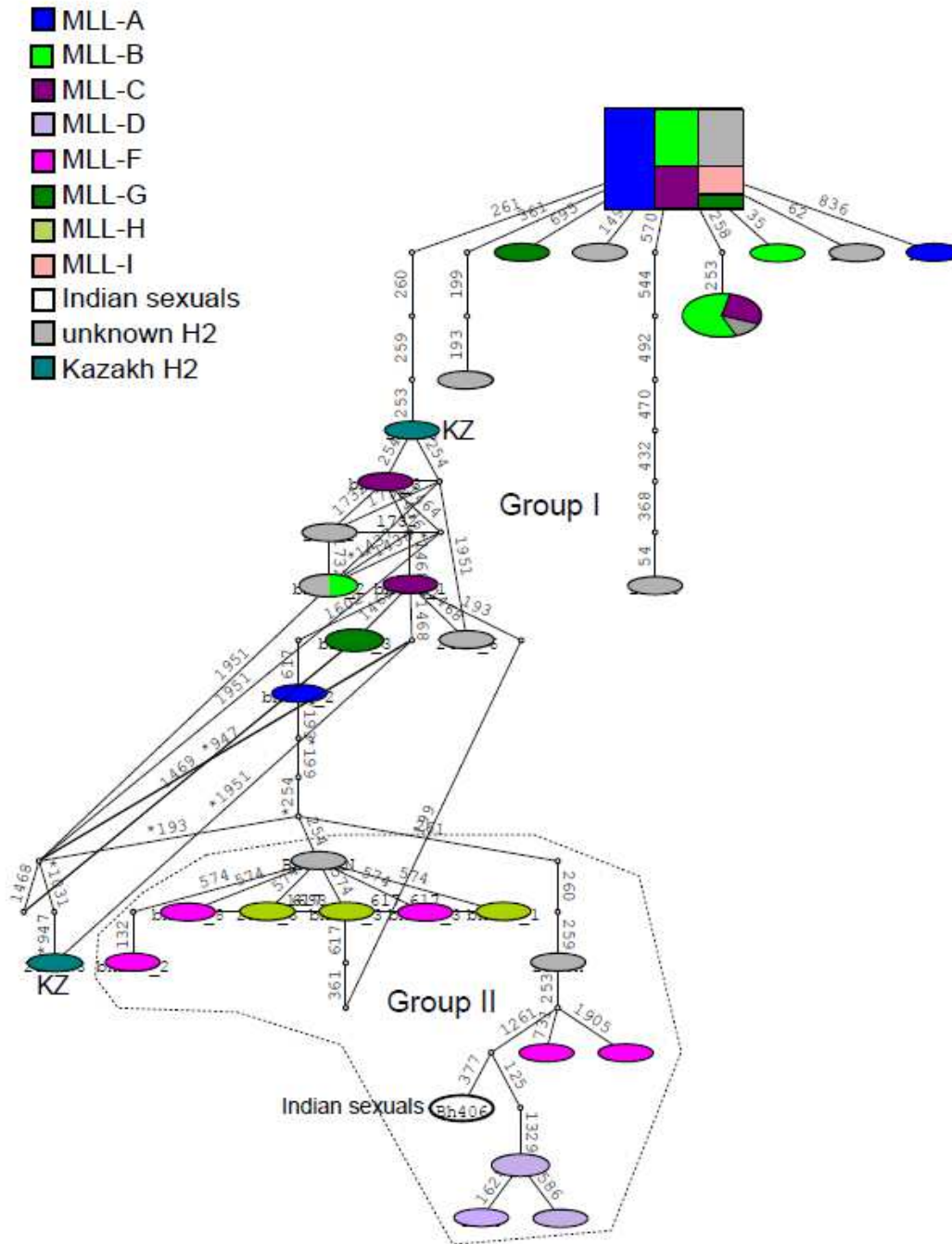


Figure 4. Haplotype Network reconstruction on the *Buchnera* combined dataset. In the square: the most probable ancestral haplotype. Each ovale represents a unique haplotype. The ovals' size are proportional to the number of individuals sharing the haplotypes. Colors correspond to H2 genetic lineages of individuals carrying one haplotype.

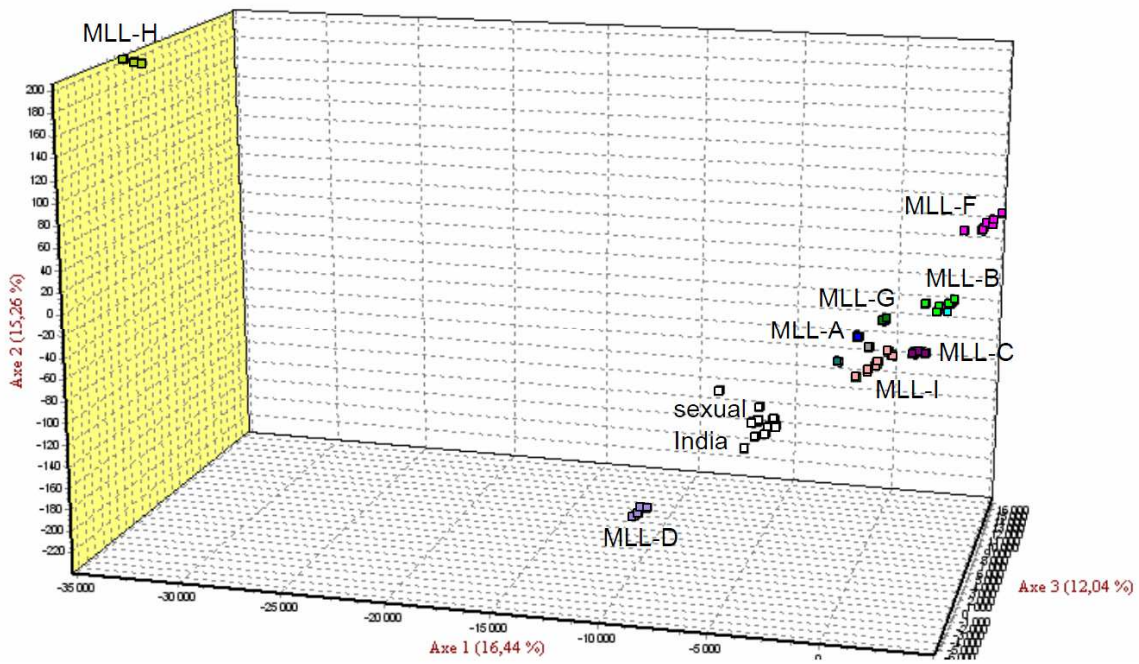


Figure 5. Plot of the genotypes in a multidimensional space (3D) after Factorial Correspondence Analysis (AFC).

Phylogenetic reconstructions and haplotypes network based on *Buchnera* dataset both suggested that MLL-A and MLL-I were closely related (fig 1 and fig 4), whereas microsatellite data suggested that MLL-A and MLL-G were more closely related to each other than any other lineages, this was sustained by a bootstrap value of 0.7 (fig. 3). Conversely, MLL-F was more closely related to MLL-H, MLL-D and the sexual lineage based on the *Buchnera* sequence dataset (fig 1 and fig 4), whereas MLL-F was more closely related to MLL-A, MLL-B, MLL-C and MLL-G in the microsatellites data (fig. 3).

The factorial correspondence analysis (AFC), based on microsatellite data, grouped individuals belonging to the same MLL together, in a more or less scattered group depending on the genotypic diversity of each lineage. We found again a group of closely related genotypes belonging to asexual lineages MLL-A, MLL-B, MLL-C, MLL-G, MLL-I and MLL-E (fig. 5). The four remaining lineages appeared less related: genotypes of the asexual lineage MLL-F and genotypes from the sexual lineage seemed to be closer to the first group than those from MLL-D and MLL-H. All four appeared very divergent from each other (fig. 5).

Based on the results of the four analyses, it seemed that two main genetic groups can be defined within H2: Group I which comprised individuals belonging to MLL-A, MLL-B, MLL-C and MLL-G); and Group II which comprised individuals from MLL-D, MLL-H and from the Indian sexual lineage. The relationships of MLL-I and MLL-F to the two groups appeared incongruent between the trees obtained with the *Buchnera* sequences dataset and the nuclear microsatellites tree. On the other hand, the AFC on microsatellites gave some results that were congruent with the *Buchnera* analysis. Group I also included several specimens, for which the mode of reproduction was unknown as their microsatellite genotypes belonged to none of the 8 asexual MLLs. Two specimens among these, Bh133 and 2583N3 were found in Kazakhstan were climate precludes the occurrence of anholocycly. Though we cannot conclude for sure on their mode of reproduction, this strongly suggests that they might belong to sexual populations.

Life cycle evolution, phylogenetic patterns of host plant association and phylogeographic structure

H1 gathered specimens undergoing sexual reproduction, which were found on *Prunus* trees and herbaceous plants mainly belonging to Asteraceae. H2 gathered mainly specimens reproducing by obligate parthenogenesis, which were sampled on herbaceous host plants mainly from Asteraceae, and one sexual line (the Indian population sampled on *Prunus*), and may be a couple of specimens belonging to a sexual population sampled on herbaceous in Kazakhstan. As the sexual H2 population occupied a terminal node of

the trees, MP and ML reconstructions of mode of reproduction both suggested the same scenario, involving a single loss of sexuality in the ancestor of H2 followed by the reacquisition of sexuality in one lineage (individuals on peach trees in India). Given the lack of resolution of the tree, we cannot exclude an alternative scenario with no reacquisition of sexuality but several independent losses of sexuality; at least one loss in Group I, and one or several losses in Group II. In any case, our tree clearly indicates that asexual lines in H2 are not all derived from the sexual one. If we assume that the two Kazakh specimens found in Group I belong to sexual populations, the number of transitions in mode of reproduction might be even more important than currently estimated. Again, given the tree resolution, it would be still difficult to conclude on the directionality of the changes (gains or losses of sexuality).

Interestingly, *B. spiraeae* gathered specimens undergoing sexual reproduction, and they were mainly found on *Spiraea* sp. trees but some specimens in Kazakhstan were found on herbaceous host plants (Asteraceae). These data suggest that *B. spiraeae* could be heteroecious at least in Kazakhstan. The two specimens sampled in Europe (France and Kazakhstan) were found on *Spiraea* sp. very late in season (August), which suggests that these population are monoecious on *Spiraea* as described in the literature (Blackman et Eastop 2006) for this species.

H2 appeared more widely distributed than H1. H2 has a worldwide distribution whereas H1 is more restricted to the North hemisphere (fig. 2).

Within H1, the phylogenetic tree based on sequences did not reveal any strong geographic structure, though one clade was constituted by all specimens from Kazakhstan in the best ML tree, this clade was not sustained by high bootstrap values, and bootstrap consensus ML trees and Bayesian consensus trees only retrieved a clade that gathered some of the Kazakh H1 individuals (clade Kazakh on fig 2). Phylogeographic clustering was more obvious on the microsatellite tree: we retrieved clades corresponding to geographic clusters gathering individuals from Kazakhstan and on the other part individuals from Europe and North America (fig 3) though, as expected for tree obtained with microsatellite data, these clades were not strongly sustained. Hosts plant association did not yield any structure in the phylogenetic relationships within H1. Looking at the association with one of *B. helichrysi* cultivated host plant (sunflower i.e. *Helianthus*), we see that individuals associated with *Helianthus* are scattered in the tree.

Within H2, none of the clustering patterns reflected any common patterns of host plant association or any geographic clustering (nor in the phylogenetic trees obtained on sequence data, the microsatellite NJ tree or the AFC), each MLL being

associated with very diverse host plants and being widely distributed across continents (fig 2).

Dating the divergence event within the complex B. spiraeae - B. helichrysi

Analyses using previous estimates of mutation rates in the *Buchnera* genome, estimated the divergence in the *B. helichrysi* - *B. spiraeae* complex to be around 200 000 years. Beast analyses estimated the split events between H1 and *B. spiraeae* to be around 295 000 years (95% highest probability density (HPD): 162 000-375 000) while *Beast analyses suggested a divergence time around 207 000 years (95% HPD: 133 000-297 000). The divergence event between H2 and (*B. spiraeae*, H1) was estimated around 342 000 years (95% HPD: 115 000-342 000) in BEAST and 234 000 years (95% HPD: 150 000-358 000) in *BEAST.

Discussion

This study, using a large set of DNA markers and a worldwide sampling, confirms the existence of the two sibling species *B. helichrysi* H1 and H2. H1 gathers only sexual lineages while H2 includes several obligate asexual lineages and at least one sexual population. Relationships between H2 lineages are still largely unresolved. However, all our analyses (phylogenetic reconstructions and haplotype networks based on sequence data, AFC or NJ trees based on nuclear microsatellite data) suggest that the H2 sexual population, is not a sister group to all the asexual lines. In other words, asexual lines in H2 are not all derived from the sexual one. This result therefore suggests that sexual reproduction may have been lost once, concomitantly to the H1/H2 split event, and acquired *de novo* during H2 evolutionary history. This reversion towards sexuality, though parsimonious given by the distribution of asexuality in our trees and haplotype networks, is considered unlikely (Moran 1992). Once lost, sexuality is rarely gained *de novo*. The alternative scenarii, less parsimonious given our data for now, suggest multiple independent losses of asexuality. At least two losses of sexuality are necessary to explain the distribution of asexuality within H2: one loss in Group I and one loss in Group II (fig 2). In any case, our data suggest multiple evolutionary transitions in *B. helichrysi* H2 mode of reproduction. If we assume that the Kazakh samples in Group I undergo sexual reproduction, considering their climatic environment, H2 mode of reproduction might be even more evolutionary labile than presented here.

Our analyses also suggest an intricate history with the closely related species, *B. spiraeae*, as depending on the DNA fragments investigated, the relationship between the three species *B. spiraeae*, *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2 are not the same. The divergence frame of the species complex *B. helichrysi* - *B. spiraeae* is quite recent: 200 000-300 000 years based on bacterial molecular clock. These are rough estimates. They are solely based on the

Buchnera dataset. Depending on whether the inconsistency between *Buchnera* data and aphid DNA data results from incomplete lineage sorting or other phenomena (host switches, hybridization), these dates can predate or post-date the divergence between H1 and H2. Divergence dating using aphid DNA calibration will be necessary to give more accurate dates.

Evolutionary pathway towards the loss of sexuality within B. helichrysi

One of the main pathways leading to the loss of sexuality is interspecific hybridization. Interspecific hybridization generally occurs between closely related species and leads to incongruence between genetic profiles obtained with maternally inherited markers and genetic profiles obtained with bi-parentally inherited markers (Mallet 2005). In the present study we show that the nuclear (Aph and 14 loci microsatellites) and maternally transmitted (mitochondrial and bacterial) DNA profiles of all H1, H2, and *B. spiraeae* individuals are congruent. All H2 specimens share distinct and monophyletic nuclear and maternally inherited DNA markers that diverge strongly from both H1 and *B. spiraeae* nuclear and maternal genomes. Even if microsatellite data suggest that H1 and H2 share some alleles, the alleles' combinations (i.e. the multilocus genotypes) in H1 and H2 are very divergent from each other and there are no ambiguity in genotype attribution to one of the two sister species.

On the other end, we show some incongruence between the phylogenetic trees obtained with aphid DNA (nuclear and mitochondrial) and the phylogenetic trees obtained with *Buchnera* DNA fragments. Further, *Buchnera* gene trees do not all yield the same topologies. These mismatches could be interpreted as the result of introgression (hence hybridization). However if this was the case, we should get a consistent story from all maternally inherited markers (i.e. mitochondrial and all bacterial markers). *Buchnera* host shift could also explain this pattern but again *Buchnera* DNA fragments should then all yield the same topologies. This lack of consistency between maternally inherited markers suggests that incongruent topologies maybe due to incomplete lineage sorting. If ancestral polymorphism has occurred in the bacterial genome before the speciation event between *B. spiraeae* and *B. helichrysi*, incomplete lineage sorting may have led to a lack of congruence between the trees obtained (Pamilo et Nei 1988; Wu 1991; Rosenberg 2002; Maddison et Knowles 2006; Pollard et al. 2006). Similar copies of *B. aphidicola* genes may have been conserved in *B. spiraeae* and *B. helichrysi* H1, while alternative copies may have been conserved in *B. helichrysi* H2. It is also likely that extended

periods of gene flow occurred during the speciation event, increasing the lineage sorting effects due to enhanced genetic drift (Rannala et Michalakis 2003). This observation is in agreement with a recent divergence within this species complex. Furthermore if a major mutation causing the loss of sexuality is at the origin of the splitting event between H2 and H1, it has reinforced genetic drift: one ancestral and unique population has transmitted the same *B. aphidicola* copy to its descendants and to derived lineages within H2. The absence of sexual reproduction would have made the acquisition of alternative *B. aphidicola* copies via sexual females impossible within H2 asexual lineages.

From an ecological point of view, our current data on host plant association suggest that there is a strong before-mating barrier between H1, *B. spiraeae* and H2 sexual lineages, as they do not use the same primary hosts: H1 uses plum trees and H2 uses peach trees at least in India for their sexual reproduction. This mating sites difference necessarily contributes to limit gene flow between the two sibling species.

Loss of sexual reproduction by hybridization can also occur via intraspecific breedings. Our current data, i.e. genetic data from a single H2 sexual population suggest that sexual genotypes diverge strongly from all other H2 asexual genotypes. Phylogenetic reconstructions and the AFC based on microsatellites data sustain this divergence. Furthermore we did not detect any hybrid multilocus genotypes between sexual and asexual H2 lineages. But we reveal some incongruences in the position of two H2 asexual lineages MLL-F and MLL-I that clustered into two different genetic groups, Group I and Group II, depending on bacterial or nuclear genetic data. Mitochondrial data are not variable enough to yield some genetic structure within H2, so we cannot conclude whether all maternally inherited markers show similar clustering patterns. Further, distance trees based on microsatellite data must be interpreted with care as bootstrap values are always low. But this result could suggest that intraspecific hybridization between sexual and asexuals lineages from both H2 genetic groups may have occurred after the loss of sexuality within H2. Some asexual lineages could have been generated by contagious parthenogenesis within H2.

In summary our data do not corroborate the hypothesis that interspecific hybridization is the main pathway towards to the loss of sexuality in *B. helichrysi* H2, as suggested in the *Aphis* genus and in *Rhopalosiphum padi* (Rakauskas 1999; Delmotte et al. 2003). This leaves us with the two alternative scenarios: spontaneous mutations disrupting the processes leading to meiosis or asexuality of infectious origin. If asexuality has occurred via spontaneous mutations or is of infectious origins, it suggests that these phenomena have occurred repeatedly or, more surprisingly, that they are reversible.

Spontaneous mutation has often been suggested to be at the origin of asexual lineages in aphids (Delmotte et al. 2001; Simon, Stoeckel, et Tagu 2010) and it has been suggested to occur repeatedly which is in agreement with our phylogenetic scenarios. These mutations can occur in any gene involved in the cascade of mechanisms necessary to achieve sexual reproduction (from photoperiod reception to sexual morph production) (see (Simon, Stoeckel, et Tagu 2010) for a review of candidate gene) or mating behaviour. The evolutionary history of the H2 sexual lineage in India is for now still unresolved. As explained above, we cannot be sure of the phylogenetic position of sexual H2 because we only have a single population. Adding some sexual lineages might change our topology. But for now, its position implies that sexual reproduction has been restored in the Indian lineage. Looking at which and how many gene functions are lost and whether they are simply “momentarily” shut down in asexual *B. helichrysi* lineages might help elucidating whether this process is really reversible.

The evolution of asexuality via micro-organism remains to be proven in aphids. Even if insects sex-manipulators like *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Cardinium* have been reported in aphids, studies investigating endosymbiotic communities' composition of asexual aphid lineages did not reveal any potential role of these bacteria on reproductive mode modification (Oliver et al. 2010; Cordaux, Bouchon, et Grève 2011; Simon et al. 2011). But these studies have focused on bacteria known to have a sex-modifiers role in other organisms and it is possible that unsuspected bacteria may play a role in aphid. To reveal potential unknown sex-modifiers in aphids, we will need to prospect bacterial community in aphids with a molecular method without *a priori*. New generation sequencing technologies (NGS) could offer methodologies allowing the fast obtention of high quantities of bacterial genetic data which will help sorting out interesting candidates (Jones et al. 2011; Shah et al. 2011; Shokralla et al. 2012). These methods will allow establishing an exhaustive list of aphid associated bacterial species in order to compare the bacterial community of sexual and asexual lineages and reveal which bacteria are linked to different reproductive modes. Infectious origins of asexuality could also easily occur repeatedly during the course of evolution of an aphid species but we have no means of knowing whether these sexuality losses would be reversible.

Intraspecific divergence and phylogeographic patterns in B. helichrysi-B. spiraeae complex

Phylogenetic trees based on DNA sequences do not reveal any strong geographic clustering even in fast evolving DNA fragments

such as the *Buchnera* intergenic region (i.e. sdna) in H1 nor H2. The ML best trees based on “sdna” did yield one Kazakh cluster within H1, but this clade was not strongly sustained. Actually, we observed very little intraspecific divergence in all DNA sequences. On the other hand, the NJ microsatellite tree did reveal some strong geographic groups within H1, corresponding to Europe and North America, and Kazakhstan. This geographic clustering is the signature of a species undergoing sexual reproduction, with reproductive isolation being associated with geographic distance. H2 lineages are found into two genetic groups based on sequence data. Group I gathers asexual lineages sharing closely related haplotypes that are supposedly closely related to the ancestral genotype, whereas Group II gathers three asexual lineages, namely MLL-F, MLL-D and MLL-H with very divergent genotypes and the sexual population. In the microsatellites tree reconstruction based on Goldstein distances (fig S1), MLL-I, MLL-D, MLL-H and the sexual lineage exhibits the longest branch lengths in comparison to the other asexual H2 lineages. MLL-F did not branch with Group II but it exhibited the longest branch length of the genetic group. Altogether these results suggest that lineages in Group II have accumulated more mutations than any other H2 asexual lineages. This seems to imply that this clade is older, but this assertion is not sustained by any of our phylogenetic trees. Again adding more sexual populations might yield alternative topologies and help solving this puzzle but for now alternative explanations for this long branch involve accelerated evolution that may be due to some selective pressures. Nevertheless, we have never found any genotypes closely related to the H2 sexual lines outside of India, even in intensively prospected areas (France, West coast of the United States, Kazakhstan), nor have found any other signs of sexually reproducing H2 apart from may be a couple of specimens from Kazakhstan. So it seems that this lineages undergoing sexual reproduction in H2 have a restricted distribution area. This restricted area could mean that lineage has evolved recently compared with H1 and with the widely distributed H2 superclones in Group I. The alternative hypothesis is that this restricted distribution reflects the restricted natural distribution range of its primary host trees: peach trees. There are no phylogeographic studies on *Prunus persica*, however it is believed to be native to southern China (quite close to northern India where our samples come from) and to have first be brought to India and Western Asia in ancient times. Then it came to the Mideast through the trade routes known to extend to Turkey and Iran (Persia). It seems that peaches were not introduced into Europe first during Antiquity, and then in the Americas in the mid 1500's by Spanish explorers. So peach trees are cultivated worldwide but maybe its merchandising is more local than plum trees. On the other hand, most *Prunus* species on which *B. helichrysi* H1 occurs (*Prunus spinosa*, *Prunus*

domestica) are naturally distributed throughout Europe which might explain why the natural range of H1 is large.

The role of life cycle evolution in speciation in the B. helichrysi - B. spiraeae complex

Previous studies in the *Brachycaudus* genus have shown that life cycle is a particularly labile character, indeed phylogenetic reconstructions suggest frequent transitions from monoecy (i.e. complete reproductive cycle taking place on the same range of host-plant) towards heteroecy (i.e. host plant shift for sexual reproduction) and *vice-versa* during the evolutionary story of this genus (Jousselin, Genson, et Coeur d'acier 2010). Within the *Brachycaudus* genus, heteroecious species use *Prunus* species as primary hosts. So it is not surprising that, when uncovering *B. helichrysi* H2 sexual lineages, we find it associated with peach trees (*Prunus persicae*) as a primary host. Further, we found some *B. spiraeae* colonies on Asteraceae in Kazakhstan though this species is described as monoecious on *Spiraea* sp. trees (Blackman et Eastop 2006). This suggests that this species might actually encompass some heteroecious lineages. Based on our phylogenetic reconstructions and this biological data, we can draw an evolutionary scenario of life cycle evolution within the *B. helichrysi - B. spiraeae* complex. As *B. helichrysi* H1 and *B. spiraeae* are heteroecious, the common ancestor of *B. helichrysi* complex was probably heteroecious. The loss of sexuality might have then let to the split between H1 and H2. Such loss can only occur under environmental conditions that allow the persistence of purely clonal lineages. Therefore, this scenario supposes that the split event between H1 and H2 was concomitant to the colonization of areas with no strong seasonal variations (photoperiod and temperature). This scenario is in agreement with the fact that H1 and H2 share the same herbaceous host range. The restoration of sexual reproduction might have then been concomitant to the capture of peach trees as primary host plant in H2 sexual lineage. Alternatively, if asexuality is not ancestral in the H2 group, our data still suggest that the three heteroecious species *B. helichrysi* H1, *B. helichrysi* H2 and *B. spireae* use a different set of primary host plants. Better resolution in parts of the trees will be necessary to conclude on the number and directionality of the transitions in mode of reproduction. But in any case, this specialisation towards different sets of a primary hosts has probably played a major role in the speciation process. Further, our data show that, as host plant alternation, reproductive mode is labile in the genus *Brachycaudus* and our study is the first one reporting such an important role of anholocycly in the evolution of this genus.

Conclusion

Asexuality has many genetic consequences. The lack of recombination can lead to the accumulation of deleterious mutations conducting to the extinction of asexual lineages. Alternatively viable allele combinations can be selected against or positively selected. In positive selection cases, asexual lineages can rapidly invade environment and outcompete other species or sexual relatives, especially in aphids where the demographic advantage of parthenogenesis is very high. Finally if the genetic clone manages to establish persistent colonies, absence of genetic flow with their asexual counterparts can lead to complete reproductive isolation and therefore to speciation events.

In this study, we show that, within the leaf-curl plum aphid, there are two species, one of these, *B. helichrysi* H2, encompassing mainly long term asexual lineages. Our phylogenetic reconstructions show that the main loss(es) of sexual reproduction was/were not induced by hybridization but instead that most probably mutations were involved. Further, they suggest that the loss of sexuality might have been involved in the split between H1 and H2. However such a scenario would involve a reacquisition of sexuality in one of H2 lineages, which is considered biologically unlikely. Investigation into the genetic mechanisms involved into sexuality loss will be necessary to conclude on the possibility of the reversibility of this transition.

References

- Avise, J., Quattro, J., and Vrijenhoek, R. (1992). Molecular Clones Within Organismal Clones - Mitochondrial-Dna Phylogenies and the Evolutionary Histories of Unisexual Vertebrates. *Evol. Biol.* 26, 225–246.
- Badenhausser, I., and Lerin, J. (1998). Comparison of population dynamics of *Brachycaudus helichrysi* and damage symptoms in four sunflower cultivars. In *Aphids in Natural and Managed Ecosystems. Proceedings of the Fifth International Symposium on Aphids*, Leon, Spain, 15-19 September, 1997., (Leon Spain: Universidad de Leon Secretariado de Publicaciones), pp. 513–518.
- Belkir, K., Borsa, P., Chiki, L., Raufaste, N., and Bonhomme, F. (2000). GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR. 5000. Université De Montpellier II, Montpellier, France.
- Bell, A.C. (1983). The life-history of the leaf-curling plum aphid *Brachycaudus helichrysi* in Northern Ireland and its ability to transmit potato virus Yc(AB). *Annals of Applied Biology* 102, 113–120.
- Bell, G. (1982). *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality* (Berkeley, CA: CUP Archive).
- Blackman, R.L., and Eastop, V.F. (2000). *Aphids on the world's crops: an identification and information guide* (John Wiley & Sons Ltd., England).
- Blackman, R.L., and Eastop, V.F. (2006). *Aphids on the World's Herbaceous Plants And Shrubs* (John Wiley & Sons Inc).
- Butlin, R., Schön, I., and Martens, K. (1998). Asexual reproduction in nonmarine ostracods. *Heredity* 81, 473–480.
- Carletto, J., Blin, A., and Vanlerberghe-Masutti, F. (2009a). DNA-based discrimination between the sibling species *Aphis gossypii* Glover and *Aphis frangulae* Kaltenbach. *Systematic Entomology* 34, 307–314.
- Carletto, J., Lombaert, E., Chavigny, P., Brévault, T., Lapchin, L., and Vanlerberghe-Masutti, F. (2009b). Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Molecular Ecology* 18, 2198–2212.
- Castelloe, J., and Templeton, A.R. (1994). Root Probabilities for Intraspecific Gene Trees under Neutral Coalescent Theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3, 102–113.
- Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A.-L., Jacq, B., and Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7, 439.
- Clark, M.A., Moran, N.A., Baumann, P., and Wernegreen, J.J. (2000). Cospeciation between Bacterial Endosymbionts (*Buchnera*) and a Recent Radiation of Aphids (*Uroleucon*) and Pitfalls of Testing for Phylogenetic Congruence. *Evolution* 54, 517–525.
- Clement, M., Posada, D., and Crandall, K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657–1659.
- Coeur d'acier, A., Cocuzza, G., Jousset, E., Cavalieri, V., and Barbagallo, S. (2008). Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Zoologica Scripta* 37, 175–193.
- Cordaux, R., Bouchon, D., and Grève, P. (2011). The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics* 27, 332–341.
- Dedryver, C.-A., Hullé, M., Le Gallic, J.-F., Caillaud, M., and Simon, J.-C. (2001). Coexistence in space and time of sexual and asexual populations of the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Oecologia* 128, 379–388.
- Delmotte, F., Leterme, N., Bonhomme, J., Rispé, C., and Simon, J.-C. (2001). Multiple Routes to

- Asexuality in an Aphid Species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 2291–2299.
- Delmotte, F., Leterme, N., Gauthier, J.-P., Rispe, C., and Simon, J.-C. (2002). Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. *Mol Ecol* 11, 711–723.
- Delmotte, F., Sabater-Muñoz, B., Prunier-Leterme, N., Latorre, A., Sunnucks, P., Rispe, C., and Simon, J.-C. (2003). Phylogenetic Evidence for Hybrid Origins of Asexual Lineages in an Aphid Species. *Evolution* 57, 1291–1303.
- Donnelly, P., Tavaré, S., and Tavaré, S. (1986). The Ages of Alleles and a Coalescent. *Advances in Applied Probability* 18, 1.
- Drummond, A., and Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.
- Figueroa, C.C., Simon, J.-C., Le Gallic, J.-F., Prunier-Leterme, N., Briones, L.M., Dedryver, C.-A., and Niemeyer, H.M. (2005). Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Heredity* 95, 24–33.
- Funk, D.J., Wernegreen, J.J., and Moran, N.A. (2001). Intraspecific Variation in Symbiont Genomes: Bottlenecks and the Aphid-*Buchnera* Association. *Genetics* 157, 477–489.
- Haack, L., Simon, J.C., Gauthier, J.P., Plantegenest, M., and Dedryver, C.A. (2000). Evidence for predominant clones in a cyclically parthenogenetic organism provided by combined demographic and genetic analyses. *Mol. Ecol.* 9, 2055–2066.
- Halkett, F., Plantegenest, M., Prunier-Leterme, N., Mieuze, L., Delmotte, F., and Simon, J.C. (2005). Admixed sexual and facultatively asexual aphid lineages at mating sites. *Mol Ecol* 14, 325–336.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium Series*, pp. 95–98.
- van Ham, R.C.H.J., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., Fernández, J.M., Jiménez, L., Postigo, M., Silva, F.J., et al. (2003). Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 581–586.
- Harry, M., Solignac, M., and Lachaise, D. (1998). Molecular Evidence for Parallel Evolution of Adaptive Syndromes in Fig-Breeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9, 542–551.
- Hebert, P.D.N., Schwartz, S.S., Ward, R.D., and Finston, T.L. (1993). Macrogeographic patterns of breeding system diversity in the *Daphnia pulex* group. I. Breeding systems of Canadian populations. *Heredity* 70, 148–161.
- Honeycutt, R.L., and Wilkinson, P. (1989). Electrophoretic Variation in the Parthenogenetic Grasshopper *Warramaba virgo* and its Sexual Relatives. *Evolution* 43, 1027.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., and others (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Innes, D.J., and Hebert, P.D.N. (1988). The Origin and Genetic Basis of Obligate Parthenogenesis in *Daphnia pulex*. *Evolution* 42, 1024.
- Jaenike, J., and Selander, R.K. (1979). Evolution and ecology of parthenogenesis in earthworms. *American Zoologist* 19, 729–737.
- Jermiin, L.S., and Crozier, R.H. (1994). The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution* 38, 282–294.
- Johnson, S.G. (2005). Mode of origin differentially influences the fitness of parthenogenetic freshwater snails. *Proc. R. Soc. B* 272, 2149–2153.
- Johnson, S.G., and Bragg, E. (1999). Age and Polyphyletic Origins of Hybrid and Spontaneous Parthenogenetic *Campeloma* (Gastropoda: Viviparidae) from the Southeastern United States. *Evolution* 53, 1769.
- Jokela, J., Lively, C.M., Dybdahl, M.F., and Fox, J.A. (2003). Genetic variation in sexual and clonal lineages of a freshwater snail. *Biological Journal of the Linnean Society* 79, 165–181.
- Jones, R.T., Bressan, A., Greenwell, A.M., and Fierer, N. (2011). Bacterial Communities of Two Parthenogenetic Aphid Species Cocolonizing Two Host Plants across the Hawaiian Islands. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8345–8349.
- Jousselin, E., Desdèvises, Y., and Coeur d’acier, A. (2009). Fine-scale cospeciation between *Brachycaudus* and *Buchnera aphidicola*: bacterial genome helps define species and evolutionary relationships in aphids. *Proc. Biol. Sci* 276, 187–196.
- Jousselin, E., Genson, G., and Coeur d’acier, A. (2010). Evolutionary lability of a complex life cycle in the aphid genus *Brachycaudus*. *BMC Evolutionary Biology* 10, 295.
- Kasprowicz, L., Malloch, G., Pickup, J., and Fenton, B. (2008). Spatial and temporal dynamics of *Myzus persicae* clones in fields and suction traps. *Agricultural and Forest Entomology* 10, 91–100.
- Langella, O. (1999). Populations, 1.2.30 (CNRS UPR9034).
- Lerin J, and Badenhauer I (1995). Influence of the leaf curl plum aphid (*Brachycaudus helichrysi*) on stem diameter, seed yield, and their relationship, in sunflower. *Journal of agricultural Science* 125, 211–221.

- Levy, L., Damsteegt, V., Scorza, R., and Kolber, M. (2000). Plum Pox Potyvirus Disease of Stone Fruits. APSnet Features.
- Maddison, W.P., and Knowles, L.L. (2006). Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. *Systematic Biology* 55, 21–30.
- Maddison, W.P., and Maddison, D.R. (2008). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. 2010.
- Madsen, H.F., and Bailey, B.J. (1958). Biology and Control of the Leaf Curl Plum Aphid in Northern California. *Journal of Economic Entomology* 51, 226–229.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 229–237.
- Meeûs, T., Prugnolle, F., and Agnew, P. (2007). Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1355–1372.
- Miller, G.L., and Stoetzel, M.B. (1997). Aphids Associated with Chrysanthemums in the United States. *The Florida Entomologist* 80, 218–239.
- Moran, N.A. (1992). THE EVOLUTION OF APHID LIFE CYCLES. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 321–348.
- Moran, N.A., McLaughlin, H.J., and Sorek, R. (2009). The Dynamics and Time Scale of Ongoing Genomic Erosion in Symbiotic Bacteria. *Science* 323, 379–382.
- Munson, M.A., Baumann, P., Clark, M.A., Baumann, L., Moran, N.A., Voegtlin, D.J., and Campbell, B.C. (1991). Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J. Bacteriol.* 173, 6321–6324.
- Nei, M., Tajima, F., and Tatenno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153–170.
- Normark, B.B., Judson, O.P., and Moran, N.A. (2003). Genomic signatures of ancient asexual lineages. *Biological Journal of the Linnean Society* 79, 69–84.
- Nylander, J.A.A. (2003). MrModeltest 1.0 b. A Simplified Version of David Posada's "Modeltest 3.06". Uppsala, Sweden: Department of Systematic Zoology, [Http://www. Ebc. Uu. Se/systzoo/staff/nylander. Html.](http://www.Ebc.Uu.se/systzoo/staff/nylander)
- Oliver, K.M., Degnan, P.H., Burke, G.R., and Moran, N.A. (2010). Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annual Review of Entomology* 55, 247–266.
- Paland, S., Colbourne, J.K., and Lynch, M. (2005). Evolutionary history of contagious asexuality in *Daphnia pulex*. *Evolution* 59, 800–813.
- Pamilo, P., and Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Mol. Biol. Evol.* 5, 568–583.
- Peccoud, J., Figueroa, C.C., Silva, A.X., Ramirez, C.C., Mieuzet, L., Bonhomme, J., Stoeckel, S., Plantegenest, M., and Simon, J.-C. (2008). Host range expansion of an introduced insect pest through multiple colonizations of specialized clones. *Molecular Ecology* 17, 4608–4618.
- Piffaretti, J., Vanlerberghe-Masutti, F., Tayeh, A., Clamens, A., D'Acier, Cœur, A., and Jousselin, E. (2012). Molecular phylogeny reveals the existence of two sibling species in the aphid pest *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae). *Zoologica Scripta, Zoologica Scripta* 41, 266–280.
- Pina-Martins, F., and Paulo, O.S. (2008). concatenator: sequence data matrices handling made easy. *Molecular Ecology Resources* 8, 1254–1255.
- Pollard, D.A., Iyer, V.N., Moses, A.M., and Eisen, M.B. (2006). Widespread Discordance of Gene Trees with Species Tree in *Drosophila*: Evidence for Incomplete Lineage Sorting. *PLoS Genet* 2, e173.
- Rakauskas, R. (1999). Hybridisation between *Aphis grossulariae* and *Aphis schneideri* (Sternorrhyncha: Aphididae): an experimental approach. *European Journal of Entomology* 96, 401–408.
- Ramakers, P. M. J., and Maaswinkel, R. H. M. (2002). Pest occurrence and control in organic year-round production of chrysanthemums. In *Bulletin OILB/SROP, (Victoria (British Columbia), Canada, 6-9 May 2002.: International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP), Dijon, France), pp. 221–224.*
- Rambaut, A., and Drummond, A.J. (2007). Tracer, version 1.4. Computer Program and Documentation Distributed by the Author, Website [Http://beast. Bio. Ed. Ac. uk/Tracer.](http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer)
- Rambaut, A., and Drummond, A.J. (2010). LogCombiner version 1.6.2 [computer program].
- Rannala, B., and Michalakis, Y. (2003). Population genetics and cospeciation: from process to pattern. In *Tangled Trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution, (Roderic D. M. Page).*
- Redfield (1999). A truly pluralistic view of sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology* 12, 1043–1046.
- Rispe, C., Pierre, J.-S., Simon, J.-C., and Gouyon, P.-H. (1998). Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints. *Journal of Evolutionary Biology* 11, 685–701.
- Rosenberg, N.A. (2002). The probability of topological concordance of gene trees and species trees. *Theor Popul Biol* 61, 225–247.
- Rossi, V., Gandolfi, A., Baraldi, F., Bellavere, C., and Menozzi, P. (2007). Phylogenetic

- relationships of coexisting *Heterocypris* (Crustacea, Ostracoda) lineages with different reproductive modes from Lampedusa Island (Italy). *Molecular Phylogenetics and Evolution* *44*, 1273–1283.
- Samadi, S., Mavárez, J., Pointier, J.-P., Delay, B., and Jarne, P. (1999). Microsatellite and morphological analysis of population structure in the parthenogenetic freshwater snail *Melanoides tuberculata*: insights into the creation of clonal variability. *Molecular Ecology* *8*, 1141–1153.
- Sandrock, C., Razmjou, J., and Vorburger, C. (2011a). Climate effects on life cycle variation and population genetic architecture of the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Molecular Ecology* *20*, 4165–4181.
- Sandrock, C., Schirrmeister, B.E., and Vorburger, C. (2011b). Evolution of reproductive mode variation and host associations in a sexual-asexual complex of aphid parasitoids. *BMC Evolutionary Biology* *11*, 348.
- Shah, N., Tang, H., Doak, T.G., and Ye, Y. (2011). Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. In *Pac Symp Biocomput*, pp. 165–176.
- Sheffield, C.S., Hebert, P.D.N., Kevan, P.G., and Packer, L. (2009). DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources* *9*, 196–207.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., and Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* *21*, 1794–1805.
- Simon, J.-C., Boutin, S., Tsuchida, T., Koga, R., Le Gallic, J.-F., Frantz, A., Outreman, Y., and Fukatsu, T. (2011). Facultative Symbiont Infections Affect Aphid Reproduction. *PLoS ONE* *6*, e21831.
- Simon, J.-C., Claude Rispe, and Paul Sunnucks (2002). Ecology and evolution of sex in aphids. *TRENDS in Ecology & Evolution* *17*, 34–39.
- Simon, J.-C., Delmotte, F., Rispe, C., and Crease, T. (2003). Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society* *79*, 151–163.
- Simon, J.-C., Stoeckel, S., and Tagu, D. (2010). Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids. *Comptes Rendus Biologies* *333*, 488–496.
- Stalker, H.D. (1954). Parthenogenesis in *Drosophila*. *Genetics* *39*, 4–34.
- Strathdee, A.T., Howling, G.G., and Bale, J.S. (1995). Cold hardiness of overwintering aphid eggs. *Journal of Insect Physiology* *41*, 653–657.
- Sunnucks, P., De Barro, P.J., Lushai, G., MacLean, N., and Hales, D. (1997). Genetic structure of an aphid studied using microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages and host specialization. *Molecular Ecology* *6*, 1059–1073.
- Sunnucks, P., England, P.R., Taylor, A.C., and Hales, D.F. (1996). Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic *Sitobion* aphids in Australia. *Genetics* *144*, 747–756.
- Swofford, D.L. (2001). PAUP* 4.10 b. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4.
- Takezaki, N., and Nei, M. (1996). Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. *Genetics* *144*, 389–399.
- Takezaki, N., and Nei, M. (2008). Empirical Tests of the Reliability of Phylogenetic Trees Constructed With Microsatellite DNA. *Genetics* *178*, 385–392.
- Le Trionnaire, G., Francis, F., Jaubert-Possamai, S., Bonhomme, J., De Pauw, E., Gauthier, J.-P., Haubruge, E., Legeai, F., Prunier-Leterme, N., Simon, J.-C., et al. (2009). Transcriptomic and proteomic analyses of seasonal photoperiodism in the pea aphid. *BMC Genomics* *10*, 456.
- Turcinaviciene, J., Rakauskas, R., and Pedersen, B.V. (2006). Phylogenetic relationships in the “*grossulariae*” species group of the genus *Aphis* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae): Molecular evidence. *European Journal of Entomology* *103*, 597–604.
- Turgeon, J., and Hebert, P.D.N. (1995). Genetic characterization of breeding systems, ploidy levels and species boundaries in *Cypricerus* (Ostracoda). *Heredity* *75*, 561–570.
- Verma, K.L., and Singh, M. (1990). Biology of peach leaf curl aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomology (New Delhi)* *31*.
- Vorburger, C., Lancaster, M., and Sunnucks, P. (2003). Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two “superclones” in Victoria, Australia. *Molecular Ecology* *12*, 3493–3504.
- Wardlow, L. R., and Gould, H. J. (1981). *Chrysanthemum pests under glass and their control*. Booklet, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food ii + 14 pp.
- Werren, J.H., Baldo, L., and Clark, M.E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* *6*, 741–751.
- Wilkinson, T.L., Fukatsu, T., and Ishikawa, H. (2003). Transmission of symbiotic bacteria *Buchnera* to parthenogenetic embryos in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Arthropod Structure & Development* *32*, 241–245.

- Wu, C.I. (1991). Inferences of species phylogeny in relation to segregation of ancient polymorphisms. *Genetics* *127*, 429–435.
- Zhang, D.-X., and Hewitt, G.M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution* *11*, 247–251.
- Zwickl, D.J. (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. The University of Texas.

Discussion générale, perspectives

I. Principaux résultats de la thèse

A. Différenciation génétique

Nous avons montré l'existence de deux espèces sœurs au sein de *Brachycaudus helichrysi*, nommées H1 et H2 (Chap. 1). Ces deux espèces se distinguent par une forte différenciation génétique, étudiée ici sur plusieurs marqueurs moléculaires : deux fragments de séquences mitochondriales codantes, un fragment d'un intron nucléaire et 14 loci microsatellites, et quatre séquences appartenant au génome de *Buchnera aphidicola*. Nous avons utilisé cette divergence génétique afin de mettre au point un test de discrimination moléculaire par PCR-RFLP (Chap. 1, article n° 2) nous permettant de déterminer la lignée mitochondriale des individus du complexe *B. helichrysi*. Tous les marqueurs génétiques étudiés sont congruents quant à l'assignation des individus à H1 et H2, par contre les topologies obtenues à partir des gènes de puceron *versus* bactériens sont contradictoires. Alors que *B. helichrysi* H1 et H2 sont deux espèces sœurs dans les reconstructions basées sur l'ADN du puceron, c'est *B. helichrysi* H1 et *B. spiraeae* qui sont plus proches dans les reconstructions basées sur l'ADN de *B. aphidicola*. Cette incongruence entre phylogénie des espèces d'hôtes et des gènes bactériens, suggère un tri incomplet des lignées pour les gènes bactériens (Chap. 4, article n° 4).

L'étude des génotypes, constitués à partir des 14 loci microsatellites, a révélé différentes structurations populationnelles au sein de chaque espèce sœur. *Brachycaudus helichrysi* H1 rassemble deux populations majeures peu différenciées génétiquement. Ces deux populations H1 sont géographiquement structurées: une première rassemble uniquement des colonies échantillonnées au Kazakhstan, tandis qu'une seconde rassemble toutes les autres colonies échantillonnées principalement en Europe et à l'ouest de l'Amérique du Nord (Chap. 2, article n° 3). Les séquences du fragment bactérien « *sdna* » confirment cette structuration : en effet beaucoup de mutations sont partagées seulement par les individus du Kazakhstan, mais les autres séquences ne sont pas assez variables pour

soutenir cette observation dans l'arbre résultant des analyses combinées. Au sein de H2, on retrouve au moins neuf superclones à répartition mondiale, persistants aux cours des dix dernières années, et une population sexuée que nous avons pour l'instant retrouvée uniquement au Nord de l'Inde (Chap. 3, article n° 4).

B. Différenciation écologique : climat et plantes hôtes

Les deux espèces sœurs n'ont pas la même distribution climatique. Les lignées H2 asexuées sont largement distribuées dans le monde, mais généralement absentes des régions les plus froides, particulièrement celles aux automnes et printemps froids. Il ne semble pas qu'il existe une forte divergence de niche climatique entre les superclones H2, à l'exception peut-être d'un clone exploitant préférentiellement les régions au climat de type tropical, d'un clone plutôt associé au climat sec et un clone plutôt associé au climat méditerranéen. Néanmoins, la population indienne de H2 sexués a été échantillonnée dans une région aux hivers rudes, son maintien dans cette région est permis grâce à la production d'œufs résistants. Nous soupçonnons que les individus H2 retrouvés au Kazakhstan appartiennent eux aussi à une population sexuée mais nous manquons d'individus pour le vérifier. En effet bien que nous ayons échantillonné abondamment au Kazakhstan, nous avons trouvé principalement des individus H1 et des individus appartenant à *B. spiraeae*. La mise en évidence de ces espèces ne se fait qu'après une identification génétique au laboratoire, et il est donc difficile sur le terrain de concentrer l'échantillonnage sur H2. L'espèce H1, quant à elle, est sous-représentée dans les régions aux faibles variations annuelles de température et aux fortes précipitations. Dans notre étude, nous n'avons retrouvé H1 que dans l'hémisphère Nord mais l'hémisphère Sud a été sous échantillonné.

Les deux espèces sœurs partagent la même gamme de plantes hôtes herbacées. Les deux espèces co-colonisent souvent une même plante, formant ainsi des colonies mixtes. Ces hôtes herbacées appartiennent à de nombreuses familles de plantes (au moins 26 familles) mais les plus représentées sont des genres d'Asteraceae et de Boraginaceae. La seule exception à cette observation de partage de gamme de plantes hôtes concerne l'association aux tournesols cultivés en France : sur 18 colonies échantillonnées, nous n'avons jamais retrouvé d'individus H2 dans des champs de tournesols cultivés. Concernant

les hôtes ligneux, H1 a été fréquemment trouvé sur plusieurs espèces de pruniers (*P. americana*, *P. cerasifera*, *P. domestica*, *P. insititi* et *P. spinosa*, qui appartiennent tous au sous-genre *Prunus*), mais jamais H2. La lignée H2 sexuée en Inde a été récoltée sur pêcher (*Prunus persica*, qui appartient au sous-genre *Amygdalus*). Il est toujours difficile de conclure sur les données d'absence, l'association exclusive des H2 sexués avec les pêchers et de H1 avec les pruniers du sous-genre *Prunus* reste à confirmer en prospectant de façon plus systématique sur les pêchers dans les régions peu ou pas encore échantillonnées (par exemple Asie, Moyen-Orient, Afrique), mais également sur les pruniers (hôtes potentiels de la phase de reproduction sexuée) dans les régions où l'on a trouvé des H2 sexuées (Nord de l'Inde).

C. Les cycles de vie au sein du complexe *B. helichrysi*-*B. spiraeae*

Grâce à la combinaison de données écologiques et génétiques, nous avons pu mettre en évidence que H1 et H2 avaient des cycles de vie contrastés. H1 est une espèce hétéroécique. Au sein de H2, on retrouve une majorité de lignées anholocycliques. Nous avons également mis en évidence une lignée H2 hétéroécique. (Figure 20)

Notre échantillonnage suggère que chez *B. spiraeae* aussi l'évolution des cycles de vie est complexe (Figure 20) : nous avons retrouvé des individus sur *Spiraea* sp.. Mais plusieurs individus ont été retrouvés également associés à des plantes herbacées à la fin du printemps, au Kazakhstan. Cette espèce est décrite dans la littérature comme monoécique sur arbuste (*Spiraea* sp.). Nos observations suggèrent donc que *B. spiraeae* comprendrait des populations hétéroéciques au moins au Kazakhstan. Nous sommes par contre pratiquement sûres que les individus récoltés en Europe (Alpes françaises et Ecosse) appartiennent bien à des populations monoéciques sur *Spiraea* sp. car nous les avons trouvés sur *Spiraea* et non sur herbacées en été (mi-août), période à laquelle les populations hétéroéciques se trouvent sur leurs hôtes secondaires herbacées.

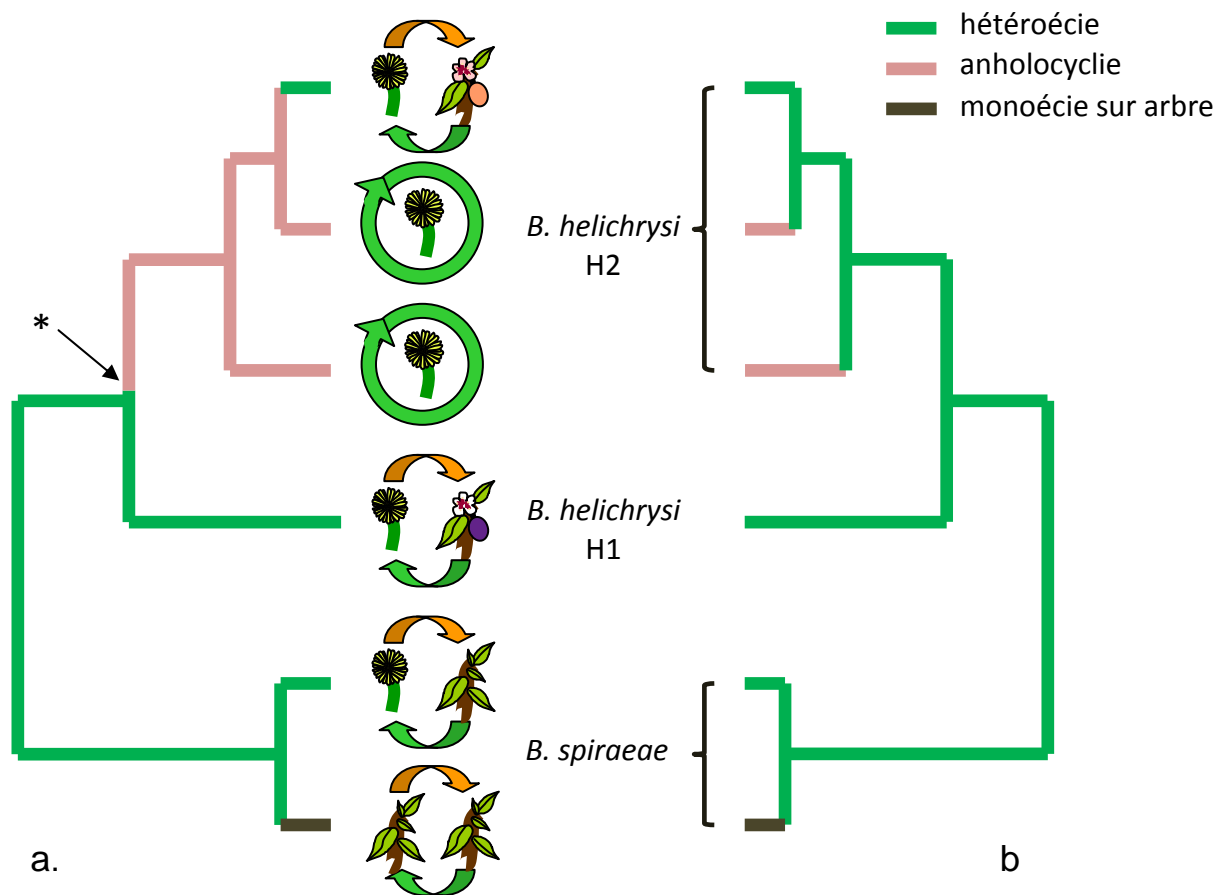


Figure 20. Deux scénarios alternatifs expliquant l'évolution des cycles de vie au sein du complexe *B. helichrysi* – *B. spiraeae*. a : un perte unique de la sexualité et une réaquisition. L'astérisque symbolise la divergence H1/H2 et la colonisation par H2 des régions aux climats permettant le maintien de l'anholocyclie. b : plusieurs pertes indépendantes de la sexualité.

D. Relation phylogénétique entre les différentes lignées, hypothèses sur l'évolution des cycles de vie

Les lignées génétiques H1 et H2 sont bien différenciées et indépendantes. La lignée sexuée H2 ne se place pas en groupe frère de toutes les lignées clonales H2. Il semblerait donc que la perte de la sexualité soit à l'origine de la divergence H1/H2, mais ce scénario implique que la restauration de la sexualité ait eu lieu secondairement chez H2 (Figure 20a). Ce scénario est étonnant étant donné que l'on considère souvent que la perte de la sexualité est un cul de sac évolutif et aucune étude n'envisage de ré-acquisition de la sexualité chez les pucerons un fois celle-ci perdue. Ce scénario reste donc encore à confirmer par une phylogénie mieux résolue, d'autant plus qu'il est basé sur une seule population H2 sexuée.

Dans tous les cas, des transitions multiples de mode de reproduction ont eu lieu au cours de l'histoire évolutive de H2. Le mécanisme le plus probable à l'origine de la perte de la sexualité chez H2 semble être via une ou des mutations spontanée(s) (Chap. 4, article n° 4). Celles-ci ont pu intervenir dans n'importe quel gène impliqué dans la production de morphes sexués. Bien sûr ces mutations n'ont pu être maintenues uniquement dans des conditions environnementales favorables à la parthénogénèse obligatoire ; c'est-à-dire que leur sélection, ou du moins l'absence de contre sélection, a pu être concomitante à la colonisation de zones sans hivers marqués.

Au sein de H2, les lignées sont rassemblées dans deux principaux clusters génétiques. Un premier cluster, qui apparaît fortement apparenté à l'ancêtre commun de toutes ces lignées H2, rassemble uniquement des lignées asexuées. Le second cluster rassemble des lignées asexuées ainsi que la population sexuée, les lignées de ce second cluster sont beaucoup plus diversifiées. On pourrait penser que cette plus grande différenciation est due à un temps de divergence plus important, mais le positionnement phylogénétique de ces lignées dans les arbres et les réseaux d'haplotypes bactériens suggèrent plutôt qu'il existe une accélération du taux de mutation dans ces lignées (Chap. 4, article n° 4). Cette accélération pourrait être le fait de pressions de sélections différentes, mais pour l'instant nous n'avons pas d'hypothèse sur ces pressions.

Chez *B. helichrysi* H1, nous n'avons pas mis en évidence de sous-structuration forte, mise à part une structuration géographique. Ceci est typique des organismes se reproduisant par reproduction sexuée.

Enfin, nous montrons l'existence de populations hétéroéciques chez *B. spiraeae*.

Nos résultats confirment donc la labilité des cycles de vie au sein du genre *Brachycaudus* :

- nous démontrons une transition de l'hétéroécie vers la monoécie sur arbre chez *B. spiraeae* (Figure 20)
- une perte de la sexualité suivie d'une réacquisition chez H2 (Figure 20a) ou alternativement plusieurs pertes indépendantes de la sexualité (figure 20b)

Ces transitions évolutives impliquent des changements importants dans les morphes produits par les pucerons et le choix des plantes hôtes par ces morphes. La perte de la sexualité implique l'absence de production de morphes sexués, et un retour vers la monoécie implique l'absence de dispersion de vivipares ailés vers des hôtes herbacés. La

diversité des cycles de vie au sein de ce complexe d'espèces et du genre *Brachycaudus* en général suggère donc que les mécanismes du déterminisme des morphes et de leurs choix d'hôtes sont relativement labiles au cours de l'évolution.

E. Le statut de ravageur.

Un ravageur des vergers ?

Nous avons montré que les pucerons identifiés comme *B. helichrysi* sur pêchers en Inde et sur pruniers dans l'hémisphère Nord sont deux espèces bien différentes. H1 correspondrait donc au ravageur de vergers de pruniers signalé dans l'hémisphère Nord (Bennett 1955; Madsen et Bailey 1958; Bell 1983). Il est plus probable que ce soit H2 qui sévisse en Inde sur pêcher où *B. helichrysi* est reconnu comme ravageur, dans cette région peu de dégâts sur pruniers dus à *B. helichrysi* sont reportés (Verma et Singh 1990; Gupta et Thakur 1993; Arora, Gupta, et Bali 2009). La majorité des dégâts infligés ailleurs aux vergers de pêchers sont dus à une toute autre espèce de puceron, *Myzus persicae*, qui est un ravageur mondial des pêchers (Blackman et Eastop 2000). Afin de confirmer l'association exclusive d'hôtes primaires de H1 avec les pruniers et de H2 avec les pêchers, un échantillonnage plus poussé sur pêchers dans le monde et sur pruniers au moins en Inde est nécessaire. Dans tous les cas, il semblerait que la distribution de la lignée H2 sexuée retrouvée en Inde soit pour l'instant restreinte à l'Asie centrale. Il est donc important de prévenir sa propagation aux vergers des régions encore non colonisées.

Brachycaudus helichrysi dans les champs

Nous avons aussi mis en évidence que les deux espèces sœurs H1 et H2 sont très polyphages vis-à-vis de leurs hôtes herbacées. Parmi ces hôtes herbacées, on compte de nombreuses espèces destinées à l'agriculture ou à l'ornementation (tournesols, achillées, chrysanthèmes). La culture en serres de plantes d'ornementation offre des conditions favorisant le maintien des superclones même dans les régions aux climats continentaux. Il faut également souligner que seul H1 a été retrouvé associé aux tournesols cultivés en

France, dans des régions où des individus appartenant aux superclones H2 ont été récoltés sur d'autres plantes herbacées. Vu la grande polyphagie des clones de H2, il paraît peu probable que l'identité de la plante hôte à elle seule explique l'absence de H2 sur tournesol. Deux colonies ont d'ailleurs été échantillonnées sur des tournesols isolés dans des jardins dans le sud de la France et en Australie. Nous suggérons donc que H2 serait plus susceptible que H1 aux traitements insecticides appliqués sur les cultures. En effet H1 étant associé aux cultures de pruniers au cours de son cycle, il est probablement régulièrement soumis à des traitements phytosanitaires. Cette pression de sélection, qui s'exerce pendant la phase du cycle s'effectuant sur hôte primaire peut avoir pour conséquence la sélection de pucerons résistants aux insecticides et peut donc favoriser l'exploitation de plantes hôtes secondaires cultivées. H2 n'étant pas associé aux pruniers, car asexué, il n'y aurait pas de raison que des clones résistants soient sélectionnés positivement, ce qui, au final, pourrait l'empêcher d'exploiter des plantes hôtes herbacées fortement traitées.

D'autres plantes hôtes auxquelles est associé *B. helichrysi* ne sont pas des espèces cultivées mais considérées comme de mauvaises herbes (*Senecio vulgaris*, *Conyza canadensis*, *Matricaria* sp.), ces mauvaises herbes sont généralement très colonisées et très fréquentes dans les milieux anthropisés. Ces milieux anthropisés présentent souvent des conditions climatiques tamponnées par rapport à celles rencontrées dans la même région en pleine campagne, et pourraient donc servir de refuge aux lignées anholocycliques dans les régions froides.

L'étude des caractéristiques écologiques des superclones a montré que bon nombre d'entre eux sont très généralistes. Ils correspondent plutôt au génotype généraliste de Lynch (1984). Cette caractéristique peut donc les favoriser en situation de compétition avec d'autres lignées ou espèces spécialisées. De plus, chez les pucerons, la fécondité des lignées asexuées semble meilleure que celle des lignées sexuées (Nespolo et al. 2009) et la reproduction asexuée continue peut conduire à des pullulations très rapides dans les aires envahies.

Un dernier point important à souligner concernant le potentiel ravageur de *B. helichrysi* est sa grande capacité de dispersion. Nous avons mis en évidence que chez H1 une même « population », au sens génétique du terme (i.e. un ensemble d'individus se croisant et au sein duquel les fréquences alléliques sont proches de l'équilibre d'Hardy-Weinberg), est répartie en Europe et en Amérique du Nord. Plusieurs superclones H2 sont répartis sur

différents continents (par exemple Amérique du Nord et Océanie). Ces pucerons sont probablement transportés par des courants aériens de haute altitude (Minks et Harrewijn 1987), mais cette distribution suggère aussi que les activités humaines ont pu jouer un rôle dans le transport de ces populations et des superclones. Les chrysanthèmes et les achillées, qui sont parmi les hôtes préférés de *B. helichrysi* (H1 et H2) sont commercialisés et probablement transportés en pots sur de longues distances.

Toutes ces caractéristiques soulignent le statut de ravageur de *B. helichrysi* et montrent l'importance de bien connaître l'écologie et la biologie des différentes lignées de ce complexe afin de définir des stratégies de surveillance et de lutte adaptées.

II. La spéciation chez *B. helichrysi*

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, un changement de cycle de vie que ce soit une perte de la sexualité ou une transition entre la monoécie et l'hétéroécie, peut être un moteur de la spéciation chez les pucerons, conduisant à un isolement reproducteur et des pressions de sélections différentes. Chez *B. helichrysi*, il est clair que les transitions évolutives dans ces cycles de vie ont probablement joué un rôle dans la diversification du complexe.

De nombreuses études portant sur le mode de spéciation chez les pucerons mettent en avant le rôle des associations aux plantes hôtes (Nyman et al. 2010; Peccoud et al. 2009; Peccoud et al. 2010). H1 et H2 partagent la même gamme d'hôtes herbacées. L'absence d'association des superclones H2 avec les *Prunus* est liée à la perte de la reproduction sexuée, c'est-à-dire à l'absence de production de migrants retournant sur hôte primaire pour y produire des sexués.

Deux scénarios se dessinent compte tenu de nos données.

Il semblerait que la lignée H2 sexuée soit apparue après la divergence entre H1 et H2, et que donc la capture d'un hôte primaire par les sexués H2 soit postérieure à l'évènement de spéciation H1/H2 (Figure 20a). Si l'on accepte cette hypothèse, ce n'est donc pas l'adaptation à deux hôtes primaires différents qui pourrait être à l'origine de la divergence entre H1 et H2. Nos résultats suggèrent que la perte de la sexualité, liée à la colonisation de

milieux favorables à la parthénogénèse obligatoire, a pu être à l'origine de la divergence entre H1 et H2.

Peu d'études ont suggéré qu'un changement de mode de reproduction était le moteur de la spéciation chez les pucerons. De nombreuses espèces de pucerons comprennent des lignées sexuées et asexuées étroitement apparentées, et souvent retrouvées en sympatrie, la proportion de chacune dépendant d'un gradient de températures (voir par exemple les études sur le genre *Sitobion* (Papura et al. 2003; Wilson, Sunnucks, et Hales 1999)). Chez *B. helichrysi* H2, il semblerait que la coexistence de lignées sexuées et de lignées asexuées étroitement apparentées soit bien plus rare : les différentes lignées clonales semblent majoritairement dérivées les unes des autres et non pas de plusieurs populations sexuées. Cette observation va dans le sens de notre scénario selon lequel la perte de la sexualité chez H2 n'est pas un événement récurrent et qu'il a peut-être été le moteur de la spéciation H1/H2 (Figure 20a).

Un scénario alternatif qui pourrait se dessiner si on obtient une meilleure résolution de notre arbre phylogénétique et selon la position que pourraient y occuper des populations H2 sexuées « fantômes » (c'est-à-dire non échantillonnées), serait que les lignées clonales soient majoritairement dérivées de ces populations sexuées (Figure 20b). Dans ce cas, l'ancêtre de H2 serait vraisemblablement hétéroécique. La différenciation des deux espèces H1 et H2, qu'elle se soit effectuée en allopatrie ou en sympatrie, a pu être favorisée par la spécialisation sur une gamme d'hôtes primaires différents. H1 et H2 sont certes associées à des arbres appartenant au même genre, le genre *Prunus*, mais leurs espèces hôtes se trouvent dans des sous-genres de la classification différents, et ne sont pas très proches dans la phylogénie des *Prunus* (Bortiri et al. 2001; Bortiri, Heuvel, et Potter 2006).

Par ailleurs, une des questions majeures concernant la délimitation des espèces est de savoir si les organismes asexués peuvent se diversifier en espèces (Barraclough, Birky, et Burt 2003; Birky et al. 2005). On peut se poser la question du statut de *B. helichrysi* H2 qui comprend des lignées clonales évoluant indépendamment en absence de flux de gènes, et acquérant sans cesse de nouvelles mutations. Si ces lignées réussissent à se maintenir, la différenciation génétique obtenue ne va-t-elle pas atteindre le niveau observé entre espèces du genre *Brachycaudus*? Il serait donc possible de considérer qu'au lieu de deux espèces sœurs, *B. helichrysi* soit en fait un complexe d'espèces. Chez les organismes sexués, l'existence d'espèces discrètes est possible grâce aux croisements entre individus qui

maintiennent la cohérence entre populations, alors que l'isolement reproducteur crée une divergence entre espèces (Barraclough et Nee 2001). De ce point de vue, les organismes asexués ne devraient pas se diversifier jusqu'à atteindre le niveau de l'espèce car l'absence de croisements ne permet pas de maintenir la cohésion de clade au-dessus du niveau de l'individu. Mais chez les organismes asexués, d'autres processus extérieurs peuvent être plus importants que les croisements pour le maintien de la cohésion et causer des divergences entre populations (Cohan 2001; Barraclough, Birky, et Burt 2003). Par exemple, l'exploitation de niches différentes par des populations asexuées pourrait conduire à une diversification jusqu'au niveau de l'espèce. Afin de savoir si les organismes asexués peuvent se diversifier en espèces, quelques études ont établi une méthodologie prenant en compte la divergence génétique et les différences écologiques entre populations et l'ont testée chez divers organismes. Chez les rotifères bdelloïdes du genre *Rotaria* qui sont des organismes asexués anciens, une sélection divergente a conduit à l'évolution indépendante de clusters génétiques aux caractéristiques morphologiques contrastées, exploitant des niches différentes (Fontaneto et al. 2007). Ou encore, l'exploitation de profondeurs différentes semble avoir conduit à la spéciation de deux algues majoritairement asexuées (Pereyra et al. 2009). Chez *B. helichrysi* H2, la majorité de superclones semblent généralistes, mais quelques superclones semblent s'être spécialisés dans l'exploitation de niches plus étroites : notamment le superclone MLL-D qui est préférentiellement associé au climat tropical, et MLL-I au climat sec et MLL-H au climat méditerranéen. On peut noter que la divergence de ces superclones est bien soutenue par les reconstructions phylogénétiques (cf. Chap. 4), ce qui suggère que quelques « espèces » asexuées pourraient évoluer chez H2. Cependant, ce processus resterait exceptionnel chez H2 car la majorité des superclones sont très généralistes.

III. Perspectives

Ce travail de thèse a permis d'acquérir des données génétiques sur *B. helichrysi* qui étaient jusque-là presque inexistantes dans la littérature portant sur cette espèce. Avec notre échantillonnage mondial, qui reste pourtant incomplet, nous avons soulevé de

nombreuses questions et apporté des premières réponses, mais il reste encore beaucoup de point à confirmer et les perspectives sont nombreuses.

A. Approfondir les connaissances sur la divergence des lignées au sein du complexe *B. helichrysi*

***Brachycaudus helichrysi* en Asie et en Afrique?**

Tout d'abord, il semble crucial d'obtenir de nouveaux échantillons en provenance d'Asie. L'absence de prospection dans ces régions sur des espèces herbacées et de données génétiques nous empêche de confirmer que les H2 sexués sont bien hétéroéciques, et d'estimer leur diversité génétique. Ce sont des informations primordiales pour comprendre l'évolution de(s) lignée(s) sexuée(s) chez H2. Afin de confirmer l'association exclusive de H1 avec les pruniers (i.e. plusieurs *Prunus* du sous-genre *Prunus*) comme hôtes primaires et de H2 avec les pêchers (*Prunus* du sous-genre *Amygdalus*), un échantillonnage plus poussé sur pruniers, au moins en Inde, et sur pêchers dans le monde est nécessaire. En effet, la présence de *B. helichrysi* a été reportée sur pêchers en Afrique du Sud (Remaudière 1985). Aux Etats-Unis il est considéré comme une menace potentielle pour les cultures de pêchers (Stoetzel et Miller 1998), mais nous ne savons pas s'il y sévit réellement. *Brachycaudus helichrysi* a également été rencontré sur amandiers (*Prunus amygdalinus*, aussi classé dans le sous-genre *Amygdalus* et apparenté au pêcher) en Tunisie (Ben Halima et Ben Hamouda 2005) et en Asie Mineure : en Syrie (Almatni et Khalil 2008), au Liban et dans les régions de l'Est méditerranéen (Talhok 1977; Hussein et Qouar 1984), nous ne savons pas si ces populations de *B. helichrysi* appartiennent à H1, ou H2, ou encore une nouvelle espèce du complexe. Les reconstructions phylogénétiques, basées sur le COI, incluant deux séquences de spécimens de Corée du Sud et un spécimen d'Inde disponibles dans Genbank suggèrent en effet l'existence d'un troisième cluster génétique au sein de *B. helichrysi* (Chap.1, article n°1 (Piffaretti et al. 2012)).

De plus, une prospection poussée dans ces régions nous permettra d'avoir une meilleure idée de la distribution mondiale de H1 et H2. Si H1 est présent dans les mêmes régions que des H2 sexués, l'étude des géotypes de différentes populations pourra nous

apprendre si des évènements d'hybridation ont eu lieu entre les deux espèces sœurs sexuées. Si l'hybridation entre les deux espèces sœurs est possible, alors cela pourrait représenter une voie alternative pour la perte de la sexualité (Simon et al. 2003) qui pour l'instant n'apparaît pas dans nos données. Si aucun hybride n'est retrouvé dans la nature, les mécanismes de l'isolement reproducteur entre H1 et H2 pourraient être testés par des approches expérimentales : s'agit-il simplement d'un isolement écologique (association avec une gamme d'hôtes primaires différents), ou y a-t-il d'autres mécanismes pré ou post-zygotiques qui entrent en jeu ?

Etude morphologique

Afin d'établir l'existence des deux espèces sœurs d'un point de vue taxonomique, il serait nécessaire de conduire une étude morphologique approfondie. Les études morphologiques sur hôte primaire révèlent des différences pour les différents morphes (Gupta et Thakur 1993), cependant nous ne pouvons pas nous soustraire de l'effet de la plante hôte. Pour avoir une idée des différences morphologiques entre femelles vivipares aptères sur herbacées, il faudrait sélectionner un grand nombre d'individus adultes provenant de différentes localités et récoltés sur de nombreuses espèces de plantes hôtes. Avant toute préparation des échantillons, une étude d'extraction d'ADN non destructive est indispensable afin d'avoir une identification génétique des individus, et de pouvoir classifier correctement les caractères morphologiques mesurés.

Existe-t-il des stratégies de reproduction intermédiaires chez *B. helichrysi* H2 ?

Définir aussi finement que possible le mode de reproduction de tous les superclones reste à faire. Nous n'avons pu tester l'induction de formes sexuées que sur un seul des neuf superclones (MLL-B). Celui-ci s'est avéré purement asexué. Mais nous savons qu'il existe des stratégies de reproduction intermédiaires entre la parthénogénèse cyclique et obligatoire chez d'autres espèces de pucerons, par exemple des clones asexués peuvent produire des mâles (Wilson, Sunnucks, et Hales 2003). Si certains des superclones que nous avons mis en évidence ont des stratégies de reproduction intermédiaires et sont capables de produire des mâles cela pourrait apporter des informations importantes sur les scénarii possibles

d'évolution de l'asexualité chez H2. En effet, ces mâles peuvent fertiliser des femelles ovipares apparentées, et ainsi contribuer aux flux de gènes (Dedryver et al. 2001). De tels croisements peuvent avoir pour conséquences la rupture de l'isolement reproducteur entre sexués et asexués, accompagné d'hybrides viables qui peuvent être sexués, ou encore générer des hybrides asexués à partir desquels une nouvelle lignée asexuée évoluera (*i.e.* parthénogénèse contagieuse) (Simon et al. 2003).

Par ailleurs l'existence de stratégies intermédiaires et donc le fait que des lignées asexuées n'aient pas totalement perdu la capacité de produire des morphes sexués rend le scénario dans lequel la sexualité est acquise *de novo* plus probable.

Nous avons réussi à récolter des individus appartenant au clone MLL-A présent à la fois à l'ouest de la France et à l'ouest des Etats Unis et à les maintenir sur *Achillea*, malheureusement ce clone n'a pu être maintenu au-delà de 6 mois en élevage au laboratoire et nous n'avons pas eu le temps de tester l'induction de formes sexuées sur celui-ci.

Comment expliquer les différentes distributions observées entre lignées?

Notre étude suggère que la plupart des superclones H2 sont de bons généralistes alors que quelques-uns exploiteraient préférentiellement des niches écologiques particulières. Des études expérimentales en conditions contrôlées, ayant pour but de comparer des mesures de traits associés à la valeur sélective des lignées, permettraient de confirmer l'adaptation de certains clones à des conditions écologiques particulières, ou bien leur succès en tant que généralistes (Turak et al. 1998; Hodgson 2001). De même des études expérimentales permettraient de tester l'issue de la compétition entre lignées, ce qui pourrait expliquer les différentes répartitions géographiques observées (Rochat et al. 1999).

Brachycaudus helichrysi est très commun dans l'hémisphère Nord, mais il semble plus rare dans la partie Est d'Amérique du Nord. Pourtant les plantes hôtes primaires et secondaires exploitées par *B. helichrysi* sont présentes et on y retrouve des conditions climatiques identiques à d'autres régions où nous avons fréquemment retrouvé *B. helichrysi*. Une dernière piste qui pourrait expliquer sa répartition est l'histoire de son invasion en Amérique. Afin de déterminer quel processus influe le plus sur la répartition de *B. helichrysi* toutes lignées confondues, nous pourrions employer des méthodes de modélisation de

niche écologique (Guisan et Thuiller 2005; Webb et al. 2002), afin de prédire la distribution de H1 et des différentes lignées H2. En comparant la distribution réelle et prédite, nous pourrions mettre en évidence l'absence de populations dans des zones géographiques pourtant propices. Dans ce cas, il semblerait plus probable que l'histoire de la dispersion des pucerons explique sa distribution plutôt que des facteurs écologiques.

Nous avons vu que H2 était absent des champs de tournesols cultivés en France. Nous avons suggéré que H1 aurait pu acquérir une résistance aux insecticides du fait des pressions de sélection exercées par les traitements dans les vergers de pruniers. La résistance de H1 et de H2 aux traitements insecticides peut être testée expérimentalement (Field et al. 1997; Barber et al. 1999; Foster, Devine, et Devonshire 2007; Fenton et al. 2010). On peut aussi rechercher la présence de mutations sur certains gènes candidats conférant une résistance aux insecticides chez H1 (Foster, Devine, et Devonshire 2007).

Est ce que la communauté d'endosymbiontes secondaires joue un rôle sur la divergence des lignées ?

La composition des communautés d'endosymbiontes secondaires est une piste intéressante à explorer, pouvant nous apporter des informations complémentaires sur l'écologie et l'évolution des deux espèces et des superclones. Notre premier screening portant sur la détection des principales bactéries recherchées chez les pucerons nous a révélé la présence récurrente d'*Hamiltonella defensa* et de *Rickettsia*, et occasionnellement de *Regiellainsecticola* et *Serratia symbiotica*. Nos résultats sont encore très préliminaires et nous ne sommes pas tout à fait confiants quant à leur solidité. Comme nous l'avons vu, les associations facultatives avec de telles bactéries confèrent des phénotypes particuliers aux hôtes (Oliver et al. 2010), par exemple des phénotypes plus tolérants à des conditions climatiques extrêmes ou résistants aux parasitoïdes, modifiant donc les pressions de sélection exercées sur les populations de pucerons. Ces associations pourraient expliquer les distributions et l'exploitation de niches écologiques particulières de certains clones. La perte de la sexualité chez H2 peut également être le résultat d'une infection par des micro-organismes. Les bactéries endosymbiotiques que nous avons retrouvées chez *B. helichrysi* ne montrent pas de patrons d'association forts avec un mode de reproduction particulier. Mais

il se peut que des bactéries que nous n'avons pas recherchées puissent intervenir dans ce mécanisme.

Afin d'avoir une composition exhaustive des communautés bactériennes, des approches sans *a priori* serait mieux appropriées. Grâce au développement des techniques de séquençage haut débit (Costello et al. 2009; Caporaso et al. 2010; Jones et al. 2011) . Une fois définie la communauté bactérienne associée à *B. helichrysi*, des tests d'infection contrôlés nous permettrait de définir les phénotypes associés aux infections, et de mettre en évidence si ces phénotypes peuvent expliquer l'écologie des différentes lignées H1 et H2.

B. Quels sont les mécanismes génétiques impliqués dans les changements de mode de reproduction ?

Chez les pucerons, les mécanismes génétiques et physiologiques contrôlant le changement de la production de femelle vivipares vers les formes sexuées sont très étudiés mais encore mal connus (Simon, Stoeckel, et Tagu 2010). Les études se sont souvent concentrées sur la comparaison d'une même lignée génétique élevée en condition induisant la parthénogénèse ou la production de formes sexuées. Les comparaisons de niveaux d'expression des transcrits ont montré une forte variation des hormones juvéniles et des transcrits impliqués dans la mélanisation (Le Trionnaire et al. 2009; Gallot et al. 2010). Si la perte de la sexualité chez H2 est bien la conséquence de mutation(s) la comparaison de deux fonds génétiques différents entre lignées sexuée (H1 ou H2) et asexuée H2 pourrait nous indiquer les zones qui ont subie des modifications, potentiellement liées au mode de reproduction. L'avancée dans la production de données moléculaires haut-débit et leur traitement pourrait permettre une telle étude. De plus l'acquisition du génome du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (The International Aphid Genomics Consortium 2010) faciliterait l'assemblage des génomes et permettrait d'identifier les gènes potentiellement impliqués. Cette comparaison de génomes nous permettrait également de confirmer les mécanismes de la perte de la sexualité chez H2. En effet, des mutations spontanées laissent une signature bien différente des événements d'hybridations.

C. Scenarii de colonisation des deux sous-espèces

Brachycaudus helichrysi H1

Notre échantillonnage montre que les deux espèces ont une très large répartition géographique. Nous n'avons pas retrouvé de H1 dans l'hémisphère Sud. Avant de conclure à son absence dans cet hémisphère, il faudrait intensifier notre échantillonnage dans ces régions, notamment sur pruniers pour optimiser les chances de le trouver.

Ce qui semble pour l'instant certain, c'est que H1 comprend deux principales populations, l'une restreinte à l'Asie centrale (Kazakhstan), et l'autre distribuée en Europe et en Amérique du Nord. Très peu d'études relèvent la présence de *B. helichrysi* à l'est des Etats-Unis (Favret et al. 2010), qui ont pourtant une politique de surveillance importante des cultures. Une mission de terrain en 2012 dans plusieurs états de l'est des USA n'a pas permis de récolter de H1 et souligne donc la rareté de *B. helichrysi* dans ces régions (pers. comm. Cœur d'Acier). Si ce ne sont pas des facteurs écologiques qui limitent l'établissement de *B. helichrysi* H1 à l'Est des USA, il serait intéressant de tester des scénarii de routes d'introduction de H1 sur le continent américain. Des travaux ont permis de retracer les routes d'invasions, grâce à des approches de génétique des populations, d'une autre espèce de puceron associées aux pruniers, *Hyalopterus pruni* (Lozier, Roderick, et Mills 2009) et d'une espèce associées aux pêchers *Myzus persicae* (Margaritopoulos et al. 2009; Zepeda-Paulo et al. 2010). L'étude de Lozier *et al.* (2009), montre que les populations de *H. pruni* de Californie ont été introduites depuis l'Espagne alors que les populations de l'Est des Etats-Unis sont probablement issues d'Europe Centrale et d'Europe du Nord. L'étude de Zepeda-Paulo *et al.* (2010) sur *M. persicae* (*nicotianae*) suggère de multiples voies de colonisation de l'Europe vers l'Amérique du nord, puis une voie de l'Amérique du nord vers l'ouest de l'Amérique du Sud. Il semble donc intéressant d'appliquer de telles méthodes à *B. helichrysi* H1 et de tester par exemple si l'on retrouve des scénarii comparables, c'est-à-dire des scénarii impliquant des colonisations multiples de l'Europe vers l'Amérique du Nord et plus particulièrement des introductions indépendantes en Amérique de l'Ouest et en Amérique de l'Est.

Un scénario intéressant à tester serait le lien entre la colonisation de ce puceron et la commercialisation des pruniers. Les pruniers sont originaires d'Asie centrale (Bortiri et al.

2001). On pourrait donc supposer que les populations sources de pucerons se trouvent en Asie centrale (Coeur d'acier et al. 2008), puis qu'elles ont été introduites successivement, ou en parallèle, en Europe et aux Etats-Unis probablement par la côte Ouest. En Europe, la culture de pruniers remonte au premier siècle après J.C. (Okie et Ramming 1999). La Californie est un berceau de l'arboriculture fruitière: cet état est aujourd'hui le premier producteur de prunes des USA (Norton 2007). Le développement de la culture des pruniers remonte à la fin du 18^{ème} siècle. Il serait intéressant de dater l'introduction de *B. helichrysi* dans cet état à partir de nos données génétiques.

Brachycaudus helichrysi H2

Concernant la distribution de H2, nous avons retrouvé des superclones dans presque toutes les localités où les conditions hivernales n'empêchaient pas la survie des lignées anholocycliques. Certains superclones ont une distribution impressionnante, ils ont en effet été retrouvés sur plusieurs continents séparés par des océans! Il serait intéressant de déterminer si une telle répartition est le fruit d'une dispersion humaine via le transport de plantes d'ornementation colonisées par exemple. Retracer les routes de dispersion des superclones pourrait être un bon indice, malheureusement, les méthodes DIYABC (Do It Yourself Approximate Bayesian Computation) (Estoup et Guillemaud 2010) ne sont pas applicables aux organismes asexués. Il faudrait donc développer d'autres outils ou réfléchir à d'autres approches.

A l'inverse des superclones, il semblerait que la distribution de la lignée sexuée H2 est beaucoup plus restreinte. Nous n'avons jamais retrouvé ces lignées en Europe et aux Etats-Unis qui, comme pour les pruniers, sont pourtant des régions productrices de pêches (Warburton et Bliss 1996). Si les lignées sexuées H2 sont bien exclusivement associées aux pêchers, est-ce que cette distribution restreinte reflète l'aire de distribution d'origine des hôtes primaires ? En effet, contrairement aux pruniers sauvages (*P. spinosa*) largement distribués dans toute l'Europe, les pêchers sont apparemment originaires du sud de la Chine et leur importation en Europe s'est fait de manière ponctuelle en Grèce durant l'Antiquité, puis tardivement plus à l'Ouest au 17^{ème} siècle. Si la distribution actuelle des H2 sexuée reflète vraiment l'aire d'origine des pêchers, on peut s'interroger sur les facteurs écologiques ou les contraintes qui ont limité la dispersion de ces lignées sexuées avec l'essor

de la culture de la pêche. Une autre hypothèse serait que l'apparition des lignées sexuées s'est faite après la période majeure de commerce des arbres fruitiers entre l'Asie et l'Occident ce qui a limité la dispersion des pucerons. Ce scénario, suggèrerait que ces lignées sont extrêmement récentes et il semble peu cohérent avec les dates estimées de divergence du complexe *B. helichrysi* H1-H2-*B. spiraeae*.

Pour répondre à toutes ces questions, plusieurs études sont nécessaires.

Une meilleure connaissance de l'origine de la pêche (son aire de distribution) ainsi que de l'histoire de la domestication du pêcher nous permettrait de comparer les histoires phylogéographiques de nos pucerons et de leurs hôtes. Il n'existe malheureusement pas d'études génétiques approfondies sur ces arbres fruitiers, comme ce qui a été fait pour le pommier (Cornille et al. 2012).

Des datations fines au sein des lignées de *B. helichrysi* H2 nous permettrait d'estimer des dates de divergences pour les superclones. Pour cela, il serait nécessaire d'utiliser une plus grande portion du génome de *Buchnera* ainsi que des marqueurs dans le génome nucléaire des pucerons afin d'augmenter la puissance du jeu de données de séquences actuel (nous avons peu de mutation entre les lignées sur les marqueurs utilisés) et des analyses plus approfondies avec les nouvelles méthodes de datation (appliquant des modèles de coalescence type Beast (Drummond et Rambaut 2007)).

Bien sûr, un échantillonnage plus important, et en particulier une prospection systématique des pêchers et pruniers restent à faire afin d'avoir une bonne idée de la répartition géographique des lignées sexuées H2 et de leur diversité génétique.

D. Mot final

Avant cette thèse, tout restait à faire et à montrer sur la diversité de *B. helichrysi*. Notre étude nous a révélé des caractéristiques écologiques et évolutives insoupçonnés. Nous avons mis en évidence l'existence de deux espèces sœurs aux cycles de vie contrastés. Il peut sembler peu enthousiasmant de conclure une thèse sur la nécessité d'un échantillonnage complémentaire mais lorsque l'on veut retracer des scénarii évolutifs, que ce soit une histoire phylogéographique ou la trajectoire évolutive d'un caractère tel que le mode de reproduction, l'échantillonnage est primordial. Comme nous l'avons vu,

l'échantillonnage de *B. helichrysi* a été un point crucial qui nous a permis de dévoiler sa diversité... et les conclusions de notre étude auraient pu être bien différentes si nous n'avions pas obtenu certaines populations (en particulier la population de H2 sexués en Inde).

Il reste encore beaucoup de points à explorer afin de pouvoir affirmer et affiner des scénarii concernant des questions générales sur l'évolution des cycles de vie et plus particulièrement l'évolution de l'asexualité et la spéciation chez les pucerons, mais les recherches sur *B. helichrysi* méritent d'être poursuivies. Notre étude démontre que cette espèce s'avère être un modèle très intéressant pour explorer ces questions... (son seul défaut étant sa taille minuscule !!!).

Bibliographie générale

- Abbot, P., et J. H. Withgott. 2004. « Phylogenetic and molecular evidence for allochronic speciation in gall-forming aphids (*Pemphigus*) ». *Evolution* 58 (3): 539-553.
- Almatni, W., et N. Khalil. 2008. « A primary survey of aphid species on almond and peach, and natural enemies of *Brachycaudus amygdalinus* in As-Sweida, Southern Syria ». In *Ecofruit-13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 18th February to 20th February 2008 at Weinsberg/Germany*, 109–115. <http://orgprints.org/13654/1/109-115.pdf>.
- Aradottir, G. I., S. J. Hanley, C. M. Collins, K.J. Dawson, A. Karp, S. R. Leather, I. Shield, et R. Harrington. 2012. « Population Genetics of *Tuberolachnus salignus*, an Obligate Parthenogenetic Aphid ». *Agricultural and Forest Entomology* 14 (2): 197–205.
- Arora, RK, RK Gupta, et K. Bali. 2009. « Population dynamics of the leaf curl aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) and its natural enemies on subtropical peach, *Prunus persica* cv. Flordasun ». *Journal of Entomology and Nematology* 1 (3): 036–042.
- Auclair, J. L. 1963. « Aphid feeding and nutrition ». *Annual Review of Entomology* 8 (1): 439–490.
- Augustinos, A. A., D. Santos-Garcia, E. Dionyssopoulou, M. Moreira, A. Papapanagiotou, M. Scarvelakis, V. Doudoumis, et al. 2011. « Detection and Characterization of *Wolbachia* Infections in Natural Populations of Aphids: Is the Hidden Diversity Fully Unraveled? » *PLoS ONE* 6 (12)
- Badenhausser, I. 1996. « Sequential sampling of *Brachycaudus helichrysi* (Homoptera: Aphididae) in sunflower fields ». *JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY* 89 (6): 1460-1467.
- Badenhausser, I. 1994. « Spatial patterns of alate and apterous morphs of the *Brachycaudus helichrysi* (Homoptera, Aphididae) in sunflower fields ». *ENVIRONMENTAL ENTOMOLOGY* 23 (6): 1381-1390.
- Badenhausser, I, et J Lerin. 1998a. « Comparison of two methods, based on counts and damage symptoms, to assess population dynamics of the leaf-curling plum aphid *Brachycaudus helichrysi* (Hom., Aphididae) on sunflower ». *JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY* 122 (6): 323-330.
- Badenhausser, I., et J. Lerin. 1998b. « Comparison of population dynamics of *Brachycaudus helichrysi* and damage symptoms in four sunflower cultivars ». In *Aphids in natural and managed ecosystems. Proceedings of the Fifth International Symposium on Aphids, Leon, Spain, 15-19 September, 1997.*, 513-518. Leon Spain: Universidad de Leon Secretariado de Publicaciones.
- Balloux, F., L. Lehmann, et T. de Meeûs. 2003. « The population genetics of clonal and partially clonal diploids. » *Genetics* 164 (4): 1635-1644.
- Barber, M.d., G.d. Moores, G.m. Tatchell, W.e. Vice, et I. Denholm. 1999. « Insecticide resistance in the currant-lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae) in the UK ». *Bulletin of Entomological Research* 89 (01): 17-23.
- Barraclough, T. G., C. W. Birky, et A. Burt. 2003. « Diversification in sexual and asexual organisms ». *Evolution* 57 (9): 2166-2172.

- Barraclough, T. G., et S. Nee. 2001. « Phylogenetics and speciation ». *Trends in Ecology & Evolution* 16 (7) : 391-399.
- Basky, Z., et B. Raccach. 1990. « Aphids Colonizing Peppers in Hungary and Their Importance as Virus Vectors ». *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica* 25 (1-4): 383-391.
- Basky, Z., et D. Magyar. 2009. « Impact of indigenous aphids on development of the invasive common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in Hungary ». *Journal of Pest Science* 82 (1): 19-25.
- Baumann, L., P. Baumann, N. A. Moran, J. Sandström, et M. L. Thao. 1999. « Genetic Characterization of Plasmids Containing Genes Encoding Enzymes of Leucine Biosynthesis in Endosymbionts (*Buchnera*) of Aphids ». *Journal of Molecular Evolution* 48 (1): 77-85.
- Bell, A. C. 1983. « The life-history of the leaf-curling plum aphid *Brachycaudus helichrysi* in Northern Ireland and its ability to transmit potato virus Yc(AB). » *Annals of Applied Biology* 102 (1).
- Ben Halima, K. M., et M. H. Ben Hamouda. 2005. « A propos des pucerons des arbres fruitiers de Tunisie ». *Notes Fauniques de Gembloux* 58: 11–16.
- Bennett, S. H. 1955. « The biology, life history and methods of control of the leaf curling plum aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt) ». *J. Hortic. Sci* 30: 252–259.
- Berim, M. N. 2003. « AgroAtlas - Pests - *Brachycaudus helichrysi* Kalt. - Leafcurl Plum Aphid ». *Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds.* http://www.agroatlas.ru/en/content/pests/Brachycaudus_helichrysi/.
- Berlacher, S. H., et J. L. Feder. 2002. « SYMPATRIC SPECIATION IN PHYTOPHAGOUS INSECTS: Moving Beyond Controversy? » *Annual Review of Entomology* 47 (1): 773-815.
- Birky, C. W., C. Wolf, H. Maughan, L. Herbertson, et E. Henry. 2005. « Speciation and Selection without Sex ». *Hydrobiologia* 546 (1): 29-45.
- Blackman, R. L., et V. F. Eastop. 1984. *Aphids on the world's crops. An identification and information guide.* John Wiley.
- Blackman, R. L., et V. F. Eastop. 1994. *Aphids on the world's trees: an identification and information guide.* CAB International in association with The Natural History Museum. London.
- Blackman, R.L. 1978. « Early development of the parthenogenetic egg in three species of aphids (Homoptera : Aphididae) ». *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 7 (1): 33-44.
- Blackman, R.L., et V. F. Eastop. 2006. *Aphids on the World's Herbaceous Plants And Shrubs.* John Wiley & Sons Inc.
- Blackman, R. L., et V. F. Eastop. 2000. *Aphids on the world's crops: an identification and information guide.* 2nd éd. John Wiley & Sons Ltd., England.
- Bolnick, D. I., et B. M. Fitzpatrick. 2007. « Sympatric Speciation: Models and Empirical Evidence ». *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38 (1): 459-487.
- Bortiri, E., B. Heuvel, et D. Potter. 2006. « Phylogenetic analysis of morphology in *Prunus* reveals extensive homoplasy ». *Plant Systematics and Evolution* 259 (1): 53-71.
- Bortiri, E., S.-H. Oh, J. Jiang, S. Baggett, A. Granger, C. Weeks, M. Buckingham, D. Potter, et D. E. Parfitt. 2001. « Phylogeny and Systematics of *Prunus* (Rosaceae) as Determined by Sequence Analysis of ITS and the Chloroplast trnL-trnF Spacer DNA ». *Systematic Botany* 26 (4): 797-807.

- Brumin, M., S. Kontsedalov, et M. Ghanim. 2011. « Rickettsia Influences Thermotolerance in the Whitefly *Bemisia tabaci* B Biotype ». *Insect Science* 18 (1): 57–66.
- Burg, S. von, Ferrari, J., Müller, C.B., and Vorburger, C. (2008). Genetic variation and covariation of susceptibility to parasitoids in the aphid *Myzus persicae*: no evidence for trade-offs. *Proceedings of the Royal Society B* 275, 1089–1094.
- Butts, RA. 1992. « Cold hardiness and its relationship to overwintering of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in Southern Alberta ». *Journal of Economic Entomology* 85 (4): 1140-1145.
- Butts, RA, et GB Schaalje. 1997. « Impact of subzero temperatures on survival, longevity, and natality of adult Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) ». *Environmental Entomology* 26 (3): 661-667.
- Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, et al. 2010. « QIIME Allows Analysis of High-throughput Community Sequencing Data ». *Nature Methods* 7 (5)
- Carletto, J., E. Lombaert, P. Chavigny, T. Brévault, L. Lapchin, et F. Vanlerberghe-Masutti. 2009. « Ecological Specialization of the Aphid *Aphis gossypii* Glover on Cultivated Host Plants ». *Molecular Ecology* 18 (10) (mai 1): 2198-2212.
- Carletto, J., G. Gueguen, F. Fleury, et F. Vanlerberghe-Masutti. 2008. « Screening the bacterial endosymbiotic community of sap-feeding insects by terminal-restriction fragment length polymorphism analysis ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 129 (2): 228-234.
- Chandler, S.M., Wilkinson, T.L., and Douglas, A.E. (2008). Impact of plant nutrients on the relationship between a herbivorous insect and its symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B* 275, 565–570.
- Chen, D.-Q., C. B. Montllor, et A. H. Purcell. 2000. « Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi* ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 95 (3): 315-323.
- Chen, D.-Q., et A. H. Purcell. 1997. « Occurrence and Transmission of Facultative Endosymbionts in Aphids ». *Current Microbiology* 34 (4): 220-225.
- Clark, M. A., N. A. Moran, P. Baumann, et J. J. Wernegreen. 2000. « Cospeciation between Bacterial Endosymbionts (*Buchnera*) and a Recent Radiation of Aphids (*Uroleucon*) and Pitfalls of Testing for Phylogenetic Congruence ». *Evolution* 54 (2): 517-525.
- Coeur d'acier, A., G. Cocuzza, E. Jouselin, V. Cavalieri, et S. Barbagallo. 2008. « Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes ». *Zoologica Scripta* 37 (2): 175-193.
- Cohan, F. M. 2001. « Bacterial species and speciation ». *Systematic Biology* 50 (4) (août): 513-524.
- Cornille, A., P. Gladieux, M. J. M. Smulders, I. Roldán-Ruiz, F. Laurens, B. Le Cam, A. Nersesyan, et al. 2012. « New Insight into the History of Domesticated Apple: Secondary Contribution of the European Wild Apple to the Genome of Cultivated Varieties ». *PLoS Genet* 8 (5)
- Cortes, T, D Tagu, JC Simon, A Moya, et D Martinez-Torres. 2008. « Sex versus parthenogenesis: A transcriptomic approach of photoperiod response in the model aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) ». *GENE* 408 (1-2)

- Costello, E. K., C. L. Lauber, M. Hamady, N. Fierer, J. I. Gordon, et R. Knight. 2009. « Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time ». *Science* 326 (5960): 1694-1697.
- Dedryver, C.-A., Maurice Hullé, J.-F. Le Gallic, M. Caillaud, et J.-C. Simon. 2001. « Coexistence in space and time of sexual and asexual populations of the cereal aphid *Sitobion avenae* ». *Oecologia* 128 (3): 379-388.
- Delmotte, F., N. Leterme, J.-P. Gauthier, C. Rispe, et J.-C. Simon. 2002. « Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers ». *Molecular Ecology* 11 (4): 711-723.
- Delmotte, F.. 2001. « Evolution des modes de reproduction chez le puceron *Rhopalosiphum padi* (L.) : apports de la génétique des populations et de la phylogénie moléculaire ». Biologie, Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Rennes.
- Dewar, A. M., L. A. Haylock, K. M. Bean, et M. J. May. 2000. « Delayed control of weeds in glyphosate-tolerant sugar beet and the consequences on aphid infestation and yield ». *Pest Management Science* 56 (4): 345-350.
- Dixon, A. F. G. 1987. « Parthenogenetic reproduction and the rate of increase in aphids ». In *Aphids, their biology, natural enemies and control*, 2:269–287. Elsevier. A. K. Minks & P. Harrewijn.
- Dixon, A. F. G., P. Kindlmann, J. Leps, et J. Holman. 1987. « Why there are so few species of aphids, especially in the tropics ». *American Naturalist*: 580–592.
- Dixon, Anthony Frederick George. 1998. *Aphid Ecology: An Optimization Approach*. Springer.
- Douglas, A. E. 1998. « Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera* ». *Annual review of entomology* 43 (1): 17–37.
- Drès, M., et J. Mallet. 2002. « Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 357 (1420) :471-492.
- Drummond, A., et A. Rambaut. 2007. « BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees ». *BMC Evolutionary Biology* 7 (1): 214.
- Emden, H F V, V F Eastop, R D Hughes, et M J Way. 1969. « The Ecology of *Myzus Persicae* ». *Annual Review of Entomology* 14 (1): 197-270.
- Emden, H. F. V., et R. Harrington. 2007. *Aphids as crop pests / edited by Helmut F. van Emden and Richard Harrington*. CABI.
- Estoup, ., et T. Guillemaud. 2010. « Reconstructing Routes of Invasion Using Genetic Data: Why, How and so What? » *Molecular Ecology* 19 (19): 4113–4130.
- Favret, C., J. J. Duggan, N. J. Sanders, et L. R. Phillippe. 2010. « Actual and Inferred Checklist of the Aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Great Smoky Mountains National Park, with Attendant Ant and Host Plant Associations ». *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 112 (3): 381-403.
- Fenton, B., L. Kasprowitz, G. Malloch, et J. Pickup. 2010. « Reproductive performance of asexual clones of the peach-potato aphid, (*Myzus persicae*, Homoptera: Aphididae), colonising Scotland in relation to host plant and field ecology ». *Bulletin of Entomological Research* 100 (4): 451-460.
- Ferrari, J., A. C. Darby, T. J. Daniell, H. C. J. Godfray, et A. E. Douglas. 2004. « Linking the Bacterial Community in Pea Aphids with Host-plant Use and Natural Enemy Resistance ». *Ecological Entomology* 29 (1): 60–65.
- Ferrari, J., Scarborough, C., and Godfray, H. (2007). Genetic variation in the effect of a facultative symbiont on host-plant use by pea aphids. *Oecologia* 153, 323–329.

- Field, L. M., A. P. Anderson, I. Denholm, S. P. Foster, Z. K. Harling, N. Javed, D. Martinez-Torres, G. D. Moores, M. S. Williamson, et A. L. Devonshire. 1997. « Use of Biochemical and DNA Diagnostics for Characterising Multiple Mechanisms of Insecticide Resistance in the Peach-potato Aphid, *Myzus Persicae* (Sulzer) ». *Pesticide Science* 51 (3): 283–289.
- Figueroa, C C, J-C Simon, J-F Le Gallic, N Prunier-Leterme, L M Briones, C-A Dedryver, et H M Niemeyer. 2005. « Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae* ». *Heredity* 95 (1): 24-33.
- Fontaneto, D., E. A Herniou, C. Boschetti, M. Caprioli, G. Melone, C. Ricci, et T. G Barraclough. 2007. « Independently Evolving Species in Asexual Bdelloid Rotifers ». *PLoS Biol* 5 (4): e87.
- Foster, S. P., G. Devine, et A. L. Devonshire. 2007. « Insecticide Resistance ». In *Aphids As Crop Pests*, 261-285. van Emden H. & Harrington R. CABI.
- Frantz, A.. 2005. « Spécialisation écologique du puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum*: Différenciation génétique et phénotypique entre races d'hôte ». AGROCAMPUS OUEST: UNIVERSITE RENNES 1.
- Fukatsu, T.. 2001. « Secondary Intracellular Symbiotic Bacteria in Aphids of the Genus *Yamatocallis* (Homoptera: Aphididae: Drepanosiphinae) ». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (11): 5315-5320.
- Gallot, A., C. Rispe, N. Leterme, J.-P. Gauthier, S. Jaubert-Possamai, et D. Tagu. 2010. « Cuticular proteins and seasonal photoperiodism in aphids ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40 (3): 235-240.
- Gil, R., B. Sabater-Muñoz, V. Perez-Brocal, F. J. Silva, et A. Latorre. 2006. « Plasmids in the aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola* with the smallest genomes. A puzzling evolutionary story ». *Gene* 370: 17-25.
- Gómez-Valero, L., A. Latorre, et F. J. Silva. 2004. « The Evolutionary Fate of Nonfunctional DNA in the Bacterial Endosymbiont *Buchnera aphidicola* ». *Molecular Biology and Evolution* 21 (11): 2172 -2181.
- Gómez-Valero, L., M. Soriano-Navarro, V. Pérez-Brocal, A. Heddi, A. Moya, J. Manuel García-Verdugo, et A. Latorre. 2004. « Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a Secondary Symbiont in the Aphid *Cinara cedri* ». *Journal of Bacteriology* 186 (19): 6626-6633.
- Guisan, A., et W. Thuiller. 2005. « Predicting Species Distribution: Offering More Than Simple Habitat Models ». *Ecology Letters* 8 (9): 993–1009.
- Gupta, P. R., et J. R. Thakur. 1993. « Sexual generation and overwintering of the peach leaf curling aphid *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) in Himachal Pradesh, India. » *Annals of Applied Biology* 122 (2).
- Haack, L., J. C. Simon, J. P. Gauthier, M. Plantegenest, et C. A. Dedryver. 2000. « Evidence for predominant clones in a cyclically parthenogenetic organism provided by combined demographic and genetic analyses ». *Molecular Ecology* 9 (12): 2055-2066.
- Hales, F D., A. C C Wilson, M. A Sloane, J.-C. Simon, J.-F. le Gallic, et P.Sunnucks. 2002. « Lack of detectable genetic recombination on the X chromosome during the parthenogenetic production of female and male aphids ». *Genetical research* 79 (3): 203-209.
- Halkett, F.. 2004. « Dynamique et génétique des lignées du puceron *Rhopalosiphum padi* en interaction lors de la reproduction sexuée : conséquences pour le maintien du polymorphisme des stratégies de reproduction ». L'AGROCAMPUS RENNES: ENSAR.

- Halkett, F., J.-C. Simon, et F. Balloux. 2005. « Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms ». *Trends in Ecology & Evolution* 20 (4): 194-201.
- van Ham, R. C. H. J., J. Kamerbeek, C. Palacios, C. Rausell, F. Abascal, U. Bastolla, J. M. Fernández, et al. 2003. « Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2): 581-586.
- Hawthorne, D. J., et S. Via. 2001. « Genetic Linkage of Ecological Specialization and Reproductive Isolation in Pea Aphids ». *Nature* 412 (6850): 904-907.
- Heie, O. E. 1987. « Paleontology and phylogeny ». In *Aphids: their biology, natural enemies, and control*, 2a:367-391. Elsevier. A. K. Minks & P. Harrewijn.
- Heie, O. E. 1994. « Why Are There so Few Aphid Species in the Temperate Areas of the Southern-Hemisphere ». In *European Journal of Entomology*, 91:127-133.
- Heie, O. E. 1991. *The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark: Family Aphididae, part 1-2 of tribe Macrosiphini of subfamily Aphidinae (2 v.)*. BRILL.
- Hijmans, R. J., S. E. Cameron, J. L. Parra, P. G. Jones, et A. Jarvis. 2005. « Very High Resolution Interpolated Climate Surfaces for Global Land Areas ». *International Journal of Climatology* 25 (15): 1965-1978.
- Hodgson, D. J. 2001. « Monoclonal Aphid Colonies and the Measurement of Clonal Fitness ». *Ecological Entomology* 26 (4): 444-448.
- Howling, GG, JS Bale, et R Harrington. 1994. « Effects of extended and repeated exposures to low-temperature on mortality of the peach-potato aphid *Myzus persicae* ». *Ecological Entomology* 19 (4): 361-366.
- Hussein, M. K., et N. S. Qouar. 1984. « A study of aphid species and its natural enemies which presence at southern Lebanon ». *Arab Journal of Plant Protection* 2: 77-82.
- Hutchinson, LA, et JS Bale. 1994. « Effects of sub-lethal cold stress on the aphid *Rhopalosiphum padi* ». *Journal of Applied Ecology* 31 (1): 102-108.
- Isac, M., S. Preda, et M. Marcu. 1998. « Aphid species - Vectors of plum pox virus ». *Acta Virologica* 42 (4): 233-234.
- John M. S. Forrest. 1987. « Gallling Aphids ». In *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control A*, 341-353. Elsevier. A. K. Minks & P. Harrewijn.
- Jones, R. T., A. Bressan, A. M. Greenwell, et N. Fierer. 2011. « Bacterial Communities of Two Parthenogenetic Aphid Species Cocolonizing Two Host Plants Across the Hawaiian Islands ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (23): 8345-8349.
- Jousselin, E., Y. Desdevises, et A. Coeur d'acier. 2009. « Fine-scale cospeciation between *Brachycaudus* and *Buchnera aphidicola*: bacterial genome helps define species and evolutionary relationships in aphids ». *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 276 (1654): 187-196.
- Jousselin, E., G. Genson, et A. Coeur d'acier. 2010. « Evolutionary lability of a complex life cycle in the aphid genus *Brachycaudus* ». *BMC Evolutionary Biology* 10 (1): 295.
- Kanbe, T., et S.-I. Akimoto. 2009. « Allelic and Genotypic Diversity in Long-term Asexual Populations of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum* in Comparison with Sexual Populations ». *Molecular Ecology* 18 (5): 801-816.
- Kim, H., S. Lee, et Y. Jang. 2011. « Macroevolutionary Patterns in the Aphidini Aphids (Hemiptera: Aphididae): Diversification, Host Association, and Biogeographic Origins ». *PLoS ONE* 6 (9): e24749.

- Koga, R., T. Tsuchida, et T. Fukatsu. 2009. « Quenching autofluorescence of insect tissues for *in situ* detection of endosymbionts ». *Applied Entomology and Zoology* 44 (2): 281-291.
- Kontsedalov, S., E. Zchori-Fein, E. Chiel, Y. Gottlieb, M. Inbar, et M. Ghanim. 2008. « The Presence of *Rickettsia* Is Associated with Increased Susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to Insecticides ». *Pest Management Science* 64 (8): 789-792.
- Lee, W., H. Kim, J. Lim, H.-R. Choi, Y. Kim, Y.-S. Kim, J.-Y. Ji, R. G Footitt, et S. Lee. 2011. « Barcoding Aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: Updating the Global Data Set ». *Molecular Ecology Resources* 11 (1): 32-37.
- Lees, A. D. 1959. « The role of photoperiod and temperature in the determination of parthenogenetic and sexual forms in the aphid *Megoura viciae* (Buckton): The influence of these factors on apterous virginoparae and their progeny ». *Journal of Insect Physiology* 3 (2): 92-117.
- Lees, A.D. 1973. « Photoperiodic time measurement in the aphid *Megoura viciae* ». *Journal of Insect Physiology* 19 (12): 2279-2316.
- Leonardo, T.E., and Muir, G.T. (2003). Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, S209-S212.
- Lerin J, et Badenhausser I. 1995. « Influence of the leaf curling plum aphid (*Brachycaudus helichrysi*) on stem diameter, seed yield, and their relationship, in sunflower ». *JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE* 125: 211-221.
- Levy, L., V. Damsteegt, R. Scorza, et M. Kolber. 2000. « Plum Pox Potyvirus Disease of Stone Fruits. » *APSnet Feature Articles*.
- Lozier, J., G. Roderick, et N. Mills. 2009. « Tracing the invasion history of mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae), in North America: a population genetics approach ». *Biological Invasions* 11 (2): 299-314.
- Lynch, M. 1984. « Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis ». *Quarterly Review of Biology*: 257-290.
- Madsen, H. F., et B. J. Bailey. 1958. « Biology and Control of the Leaf Curl Plum Aphid in Northern California1 ». *Journal of Economic Entomology* 51 (avril): 226-229.
- Marcovitch, S. 1924. « The migration of the Aphididae and the appearance of the sexual forms as affected by the relative length of daily light exposure ». *J. agric. Res* 27 (5): 13-522.
- Margaritopoulos, J. T., L. Kasproicz, G. L. Malloch, et B. Fenton. 2009. « Tracking the Global Dispersal of a Cosmopolitan Insect Pest, the Peach Potato Aphid ». *BMC Ecology* 9 (1): 13.
- Maynard-Smith, J. 1978. *The evolution of sex*. UK: Cambridge Univ Press.
- Mayr, Ernst. 1942. *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press.
- Meeûs, T., F. Prugnolle, et P. Agnew. 2007. « Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (11): 1355-1372.
- de Meeûs, T., et F. Balloux. 2004. « Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: a simulation study ». *Infection, Genetics and Evolution* 4 (4): 345-351.
- Miller, G. L., et M. B. Stoetzel. 1997. « Aphids Associated with Chrysanthemums in the United States ». *The Florida Entomologist* 80 (2): 218-239.

- Minks, A. K., et P. Harrewijn. 1987. *Aphids: their biology, natural enemies, and control*. Elsevier.
- Mira, A., et N.A. Moran. 2002. « Estimating Population Size and Transmission Bottlenecks in Maternally Transmitted Endosymbiotic Bacteria ». *Microbial Ecology* 44 (2): 137-143.
- Miyazaki, M. 1987. « Morphology of aphids ». In *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control A*, 2:1–25. Elsevier. A. K. Minks & P. Harrewijn.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Cynthia M. Anderson, Gallego J. Aparicio, Alain R. Atangana, Jean Beaulieu, M.W. Bruford, Forrest Cain, et al. 2010. « Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 December 2009-31 January 2010 ». *Molecular Ecology Resources* 10 (3): 576-579.
- Montllor, C. B., A. Maxmen, et Al. H. Purcell. 2002. « Facultative Bacterial Endosymbionts Benefit Pea Aphids *Acyrtosiphon Pisum* Under Heat Stress ». *Ecological Entomology* 27 (2): 189–195.
- Moran, N. A. 1990. « Aphid life cycles: two evolutionary steps ». *The American Naturalist* 136 (1): 135–138.
- Moran, N. A. 1992. « THE EVOLUTION OF APHID LIFE CYCLES ». *Annual Review of Entomology* 37: 321-348.
- Moran, N. A., M. A. Munson, P. Baumann, et H. Ishikawa. 1993. « A Molecular Clock in Endosymbiotic Bacteria Is Calibrated Using the Insect Hosts ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 253 (1337): 167-171.
- Munson, M. A., P. Baumann, M. A. Clark, L. Baumann, N. A. Moran, D. J. Voegtlin, et B. C. Campbell. 1991. « Evidence for the Establishment of Aphid-eubacterium Endosymbiosis in an Ancestor of Four Aphid Families. » *Journal of Bacteriology* 173 (20): 6321-6324.
- Nespolo, R. F., F. Halkett, C. C. Figueroa, M. Plantegenest, et J.-C. Simon. 2009. « Evolution of trade-offs between sexual and asexual phases and the role of reproductive plasticity in the genetic architecture of aphid life histories». *Evolution* 63 (9): 2402-2412.
- Norton, M.. 2007. *Growing Prunes (Dried Plums) in California: An Overview*. UCANR Publications.
- Vaz Nunes, M., et J. Hardie. 2000. « The effect of temperature on the photoperiodic clock' and counter' of a Scottish clone of the vetch aphid, *Megoura viciae* ». *Journal of Insect Physiology* 46 (5): 727-733.
- Nyman, T., V. Vikberg, D. Smith, et J.-L. Boevé. 2010. « How Common Is Ecological Speciation in Plant-feeding Insects? A “Higher” Nematinae Perspective ». *BMC Evolutionary Biology* 10 (1): 266.
- Okie, W. R., et D. W. Rammig. 1999. « Plum breeding worldwide ». *HortTechnology* 9 (2): 162–176.
- Oliver, K. M., P. H. Degnan, G. R. Burke, et N. A. Moran. 2010. « Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits ». *Annual Review of Entomology* 55: 247-266.
- Oliver, K. M., N. A. Moran, et M. S. Hunter. 2005. « Variation in Resistance to Parasitism in Aphids Is Due to Symbionts Not Host Genotype ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (36): 12795-12800.
- . 2006. « Costs and Benefits of a Superinfection of Facultative Symbionts in Aphids ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273 (1591): 1273-1280.

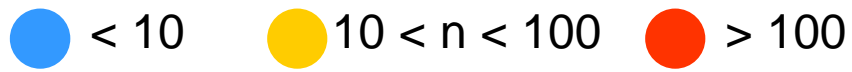
- Oliver, K. M., J. A. Russell, N. A. Moran, et M. S. Hunter. 2003. « Facultative Bacterial Symbionts in Aphids Confer Resistance to Parasitic Wasps ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (4): 1803-1807.
- Papura, D, J-C Simon, F Halkett, F Delmotte, J-F Le Gallic, et C-A Dedryver. 2003. « Predominance of sexual reproduction in Romanian populations of the aphid *Sitobion avenae* inferred from phenotypic and genetic structure ». *Heredity* 90 (5): 397-404.
- Peccoud, J., C. C. Figueroa, A. X. Silva, C. C. Ramirez, L. Mieuze, J. Bonhomme, S. Stoeckel, M. Plantegenest, et J.-C. Simon. 2008. « Host Range Expansion of an Introduced Insect Pest Through Multiple Colonizations of Specialized Clones ». *Molecular Ecology* 17 (21): 4608–4618.
- Peccoud, Jean. 2008. « Spéciation écologique et radiation adaptative dans le complexe du puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* ». AGROCAMPUS OUEST: L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGROALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE.
- Peccoud, J., A. Ollivier, M. Plantegenest, et J.-C. Simon. 2009. « A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (18): 7495 -7500.
- Peccoud, J., J.-C. Simon, C. von Dohlen, A. Coeur d'acier, M. Plantegenest, F. Vanlerberghe-Masutti, et E. Jousset. 2010. « Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification ». *Comptes Rendus Biologies* 333 (6-7): 474-487.
- Pereyra, R., L. Bergström, L. Kautsky, et K. Johannesson. 2009. « Rapid Speciation in a Newly Opened Postglacial Marine Environment, the Baltic Sea ». *BMC Evolutionary Biology* 9 (1): 70.
- Piffaretti, J., F. Vanlerberghe-Masutti, A. Tayeh, A.-L. Clamens, Cœur D'Acier, A., et E. Jousset. 2012. « Molecular Phylogeny Reveals the Existence of Two Sibling Species in the Aphid Pest *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae) ». *Zoologica Scripta, Zoologica Scripta* 41 (3): 266-280.
- Pons, J., T. G Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. D Sumlin, et A. P Vogler. 2006. « Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects ». *Systematic biology* 55 (4): 595-609.
- Powell, G, et J Hardie. 2001. « The chemical ecology of aphid host alternation: How do return migrants find the primary host plant? » *APPLIED ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY* 36 (3): 259-267.
- Powell, G., R. Harrington, et Nj Spiller. 1992. « Stylet Activities and Potato Virus-Y Vector Efficiencies by the Aphids *Brachycaudus helichrysi* and *Drepanosiphum platanoidis* ». *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 62 (3): 293-300.
- Powell, G., C. R. Tosh, et J. Hardie. 2006. « HOST PLANT SELECTION BY APHIDS: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives ». *Annual Review of Entomology* 51 (1): 309-330.
- Ramakers, P. M. J., et Maaswinkel, R. H. M. 2002. « Pest occurrence and control in organic year-round production of chrysanthemums. » In *Bulletin OILB/SROP*, 25:221-224. Victoria (British Columbia), Canada, 6-9 May 2002.: International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP), Dijon, France.
- Remaudière, G. 1985. *Contribution à l'écologie des aphides africains*. Food & Agriculture Org.

- Remaudière, G., et M. Remaudière. 1997. *Catalogue des Aphididae du monde*. Editions Quae.
- Rispe, C., J.-S. Pierre, J.-C. Simon, et P.-H. Gouyon. 1998. « Models of Sexual and Asexual Coexistence in Aphids Based on Constraints ». *Journal of Evolutionary Biology* 11 (6): 685–701.
- Rochat, J., F. Vanlerberghe-Masutti, P. Chavigny, R. Boll, et L. Lapchin. 1999. « Inter-strain Competition and Dispersal in Aphids: Evidence from a Greenhouse Study ». *Ecological Entomology* 24 (4): 450-464.
- Rouhbachsh, D., C.-Y. Lai, C. von Dohlen, M. Clark, L. Baumann, P. Baumann, N. Moran, et D. Voegtlin. 1996. « The tryptophan biosynthetic pathway of aphid endosymbionts (*Buchnera*): Genetics and evolution of plasmid-associated anthranilate synthase (trpEG) within the aphididae ». *Journal of Molecular Evolution* 42 (4): 414-421.
- Rundle, H. D., et P. Nosil. 2005. « Ecological speciation ». *Ecology Letters* 8 (3): 336-352.
- Russell, J.A., et N.A Moran. 2006. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society B*:273, 603–610.
- Sakurai, M., R. Koga, T. Tsuchida, X.-Y. Meng, et T. Fukatsu. 2005. « *Rickettsia* Symbiont in the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*: Novel Cellular Tropism, Effect on Host Fitness, and Interaction with the Essential Symbiont *Buchnera* ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (7): 4069-4075.
- Sandrock, C., J. Razmjou, et C. Vorburger. 2011. « Climate Effects on Life Cycle Variation and Population Genetic Architecture of the Black Bean Aphid, *Aphis fabae* ». *Molecular Ecology* 20 (19): 4165–4181.
- Scarborough, C. L., J. Ferrari, et H. C. J. Godfray. 2005. « Aphid Protected from Pathogen by Endosymbiont ». *Science* 310 (5755): 1781-1781.
- Schurko, A. M., M. Neiman, et J. M. Logsdon Jr. 2009. « Signs of sex: what we know and how we know it ». *Trends in Ecology & Evolution* 24 (4): 208-217.
- Shaposhnikov, G. C. 1987. « Evolution of aphids in relation to evolution of plants ». In *Aphids, their biology, natural enemies and control*, 409–414. Elsevier. A. K. Minks & P. Harrewijn.
- Simon, J.-C., S., Boutin, T., Tsuchida, R., Koga, J.-F., Le Gallic, A., Frantz, Y., Outreman, et T. Fukatsu. 2011. Facultative Symbiont Infections Affect Aphid Reproduction. *PLoS ONE* 6, e21831.
- Simon, J.-C., F. Delmotte, C. Rispe, et T. Crease. 2003. « Phylogenetic Relationships Between Parthenogens and Their Sexual Relatives: The Possible Routes to Parthenogenesis in Animals ». *Biological Journal of the Linnean Society* 79 (1): 151–163.
- Simon, J.-C., C. Rispe, et P. Sunnucks. 2002. « Ecology and evolution of sex in aphids ». *TRENDS in Ecology & Evolution* 17 (1): 34-39.
- Simon, J.-C., M., Sakurai, J., Bonhomme, T., Suchida, R., Koga, et T. Fukatsu. 2007. Elimination of a specialised facultative symbiont does not affect the reproductive mode of its aphid host.. *Ecol. Entomol.* 32, 296–301.
- Simon, J.-C., S. Stoeckel, et D. Tagu. 2010. « Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids ». *Comptes Rendus Biologies* 333 (6–7): 488-496.
- Sitch, J. C., et C. W. Jackson. 1997. « Pre-penetration events affecting host specificity of *Verticillium lecanii* ». *Mycological Research* 101: 535-541.
- Stoetzel, M. B., et G. L. Miller. 1998. « Aphids (homoptera: aphididae) colonizing peach in the united states or with potential for introduction ». *Florida Entomologist* 81 (3): 325.

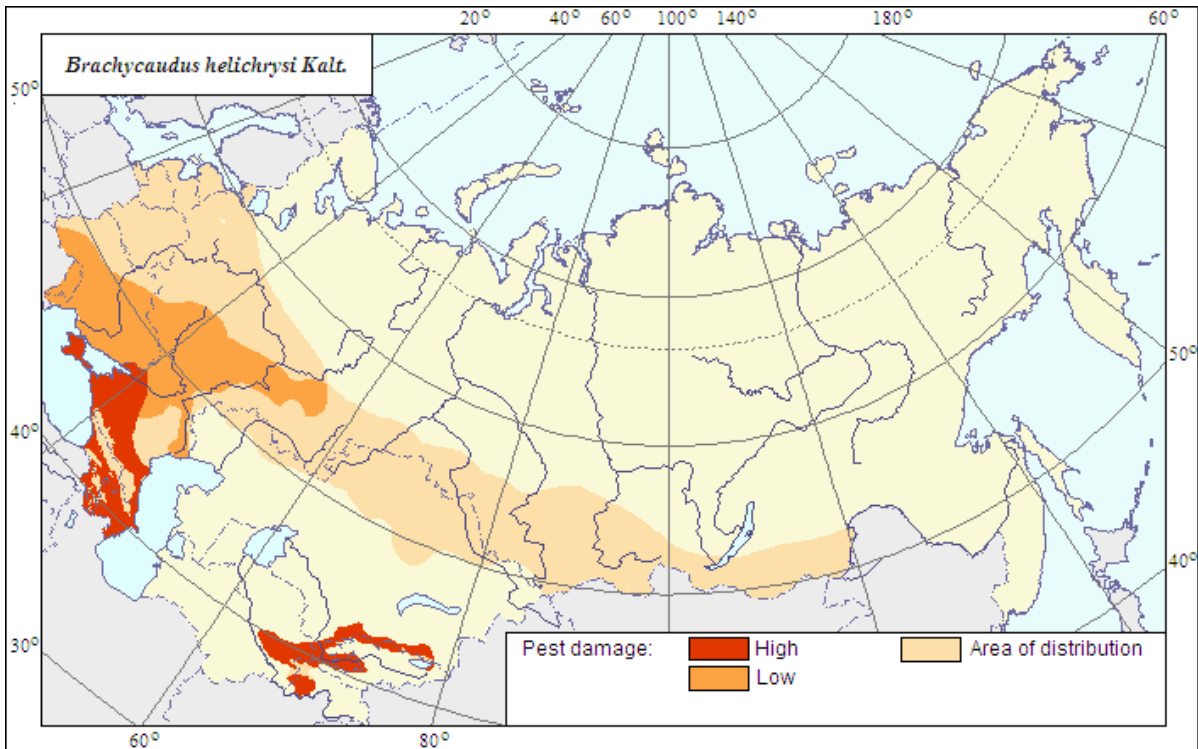
- Strathdee, A.T., G.G. Howling, et J.S. Bale. 1995. « Cold hardiness of overwintering aphid eggs ». *Journal of Insect Physiology* 41 (8): 653-657.
- Sunnucks, P., P. R. England, A. C. Taylor, et D. F. Hales. 1996. « Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic *Sitobion* aphids in Australia ». *Genetics* 144 (2): 747-756.
- Symmes, E., S. Dewhurst, M. Birkett, C. Campbell, K. Chamberlain, J. Pickett, et F. Zalom. 2012. « The Sex Pheromones of Mealy Plum *Hyalopterus pruni* and Leaf-Curl Plum *Brachycaudus helichrysi* Aphids: Identification and Field Trapping of Male and Gynoparous Aphids in Prune Orchards ». *Journal of Chemical Ecology* 38 (5): 576-583.
- Talhouk, A. S. 1977. « Contribution to the Knowledge of Almond Pests in East Mediterranean Countries1 ». *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie* 83 (1-4): 248-257.
- Tayeh, A.. 2007. « Différenciation génétique et morphologique au sein d'une espèce de pucerons : *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach, 1843) ». Master professionnel 2 en santé des plantes, SupAgro Montpellier.
- The International Aphid Genomics Consortium. 2010. « Genome Sequence of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* ». *PLoS Biol* 8 (2): e1000313.
- Thomas, S., N. Boissot, et F. Vanlerberghe-Masutti. 2012. « What Do Spring Migrants Reveal About Sex and Host Selection in the Melon Aphid? » *BMC Evolutionary Biology* 12 (1): 47.
- Le Trionnaire, G, F Francis, S Jaubert-Possamai, J Bonhomme, E De Pauw, J-P Gauthier, E Haubruge, et al. 2009. « Transcriptomic and proteomic analyses of seasonal photoperiodism in the pea aphid ». *BMC Genomics* 10 (1): 456.
- Tsuchida, T., R., Koga, et T., Fukatsu. 2004. Host Plant Specialization Governed by Facultative Symbiont. *Science* 303, 1989.
- Tsuchida, T., R., Koga, M., Horikawa, T., Tsunoda, T., Maoka, S., Matsumoto, J.-C., Simon, et T. Fukatsu. 2010. Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color. *Science* 330, 1102-1104.
- Tsuchida, T., R. Koga, H. Shibao, T. Matsumoto, et T. Fukatsu. 2002. « Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* ». *Molecular Ecology* 11 (10): 2123-2135.
- Turak, E., R. Talent, P. Sunnucks, et D. F. Hales. 1998. « Different Responses to Temperature in Three Closely-related Sympatric Cereal Aphids ». *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 86 (1): 49-58.
- Venette, R. C., et D. W. Ragsdale. 2004. « Assessing the Invasion by Soybean Aphid (Homoptera: Aphididae): Where Will It End? » *Annals of the Entomological Society of America* 97 (2): 219-226.
- Verma, K. L., et M. Singh. 1990. « Biology of peach leaf curl aphid, *Brachycaudus helichrysi* (Kalt.) (Homoptera: Aphididae). » *Bulletin of Entomology (New Delhi)* 31 (2).
- Via, S.. 2001. « Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up ». *Trends in Ecology & Evolution* 16 (7): 381-390.
- Via, S., et D. J. Hawthorne. 2002. « The Genetic Architecture of Ecological Specialization: Correlated Gene Effects on Host Use and Habitat Choice in Pea Aphids ». *The American Naturalist* 159 (3): S76-S88.
- Voegtlin, D. J., et S. E. Halbert. 1998. « Variable morph production by some North American clones of *Rhopalosiphum padi* in response to reduced photoperiod and temperature ». In *Aphids in natural and managed ecosystems*, 309-315. Leon: Universidad de Leon: J. M. Nieto Nafria and A. F. G. Dixon (eds).

- Vorburger, C.. 2004. « Cold Tolerance in Obligate and Cyclical Parthenogens of the Peach-potato Aphid, *Myzus Persicae* ». *Ecological Entomology* 29 (4): 498-505.
- Vorburger, C., M. Lancaster, et P. Sunnucks. 2003. « Environmentally Related Patterns of Reproductive Modes in the Aphid *Myzus persicae* and the Predominance of Two 'superclones' in Victoria, Australia ». *Molecular Ecology* 12 (12): 3493-3504.
- Vorburger, C., C. Sandrock, A. Gousskov, L. E. Castañeda, et J. Ferrari. 2009. « Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host-parasitoid interaction ». *Evolution* 63 (6): 1439–1450.
- Vrijenhoek, R. C. 1984. « Ecological differentiation among clones: the frozen niche variation model ». *Population biology and evolution*: 217–231.
- Warburton, M. L., et F. A. Bliss. 1996. « Genetic Diversity in Peach (*Prunus Persica* L. Batch) Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers and Compared to Inbreeding Coefficients ». *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121 (6): 1012-1019.
- Wardlaw, L. R., et Gould, H. J. 1981. « Chrysanthemum pests under glass and their control. » *Booklet, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food* (2360): ii + 14 pp.
- Webb, C.I O., D. D. Ackerly, M. A. McPeck, et M. J. Donoghue. 2002. « Phylogenies and Community Ecology ». *Annual Review of Ecology and Systematics* 33 (1): 475-505.
- Welch, D. B. M., et M. Meselson. 2000. « Evidence for the Evolution of Bdelloid Rotifers Without Sexual Reproduction or Genetic Exchange ». *Science* 288 (5469): 1211-1215.
- Wilkinson, T. L., T. Fukatsu, et H. Ishikawa. 2003. « Transmission of symbiotic bacteria *Buchnera* to parthenogenetic embryos in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea) ». *Arthropod Structure & Development* 32 (2-3): 241-245.
- Wilkinson, T.L., R., Koga, et T. Fukatsu. 2007. Role of Host Nutrition in Symbiont Regulation: Impact of Dietary Nitrogen on Proliferation of Obligate and Facultative Bacterial Endosymbionts of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1362–1366.
- Wilson, A. C. C., P. Sunnucks, et D. F. Hales. 1999. « Microevolution, Low Clonal Diversity and Genetic Affinities of Parthenogenetic *Sitobion* Aphids in New Zealand ». *Molecular Ecology* 8 (10): 1655–1666.
- Wilson, A. C. C., P. Sunnucks, et D. F. Hales. 2003. « Heritable Genetic Variation and Potential for Adaptive Evolution in Asexual Aphids (Aphidoidea) ». *Biological Journal of the Linnean Society* 79 (1): 115–135.
- Zepeda-Paulo, FA, J. C. Simon, C. C. Ramírez, E. Fuentes-Contreras, J. T. Margaritopoulos, A. C. C. Wilson, C. E. Sorenson, et al. 2010. « The invasion route for an insect pest species: the tobacco aphid in the New World ». *Molecular ecology* 19 (21): 4738–4752.
- Zhou, XL, R. Harrington, IP Woiwod, JN Perry, JS Bale, et SJ Clark. 1995. « Effects of Temperature on Aphid Phenology ». *Global Change Biology* 1 (4): 303-313.

Annexe Introduction



Carte mondiale présentant la provenance des échantillons de *B. helichrysi* recensé dans la collection d'Essig.



Carte d'Asie centrale et mineure présentant l'aire de distribution de *B. helichrysi* et les zones de dégâts sur Prunus. Copyright 2007 © M.N.Berim & M.I.Saulich

Annexe Supplementary data article n°1

TableS1. Genbank accession ID of genetic markers of *Brachycaudus helichrysi*, *Brachycaudus spiraeae* and *Brachycaudus salicinae* used in this study.

Species	Sample (Voucher ID)	COI	Genbank accession ID		
			CytB	sDNA	Aph
B. helichrysi	705	JQ289450	JQ289498	JQ289547	JQ289402
B. helichrysi	707	JQ289451	JQ289499	JQ289548	JQ289403
B. helichrysi	852	JQ289452	JQ289500	JQ289549	JQ289404
B. helichrysi	1149	JQ289405	JQ289453	JQ289501	JQ289357
B. helichrysi	1207	JQ289406	JQ289454	JQ289502	JQ289358
B. helichrysi	1455	JQ289407	JQ289455	JQ289503	JQ289359
B. helichrysi	1600	JQ289408	JQ289456	EU998876.1	-
B. helichrysi	1608	EU189643.1	EU189579.1	EU998877.1	JQ289360
B. helichrysi	1684	JQ289409	JQ289457	JQ289504	JQ289361
B. helichrysi	1695	EU189647.1	EU189583.1	JQ289505	GU568398.1
B. helichrysi	1702	JQ289410	JQ289458	JQ289506	JQ289362
B. helichrysi	1712	GU568507.1	GU568573.1	GU568608.1	GU568404.1
B. helichrysi	1716	EU189653.1	EU189589.1	EU998886.1	JQ289363
B. helichrysi	1728	GU568508.1	GU568574.1	GU568609.1	GU568407.1
B. helichrysi	1749	EU189662.1	EU189598.1	EU998894.1	GU568413.1
B. helichrysi	1805	JQ289411	JQ289459	JQ289507	JQ289364
B. helichrysi	1809	JQ289412	JQ289460	EU998905.1	JQ289365
B. helichrysi	1828	EU189675.1	EU189611.1	JQ289508	GU568428.1
B. helichrysi	1926	EU189676.1	EU189612.1	JQ289509	JQ289366
B. helichrysi	1937	JQ289413	JQ289461	JQ289510	JQ289367
B. helichrysi	1939	JQ289414	JQ289462	JQ289511	JQ289368
B. helichrysi	1946	JQ289415	JQ289463	JQ289512	JQ289369
B. helichrysi	2170	GU568514.1	GU568581.1	GU568616.1	GU568438.1
B. helichrysi	2185	JQ289416	JQ289464	JQ289513	JQ289370
B. helichrysi	2211	JQ289417	JQ289465	JQ289514	JQ289371
B. helichrysi	2218	GU568517.1	GU568584.1	GU568619.1	GU568441.1
B. helichrysi	2379	JQ289418	JQ289466	JQ289515	-
B. helichrysi	2398	JQ289419	JQ289467	JQ289516	JQ289372
B. helichrysi	2406	JQ289420	JQ289468	JQ289517	JQ289373
B. helichrysi	2407	JQ289421	JQ289469	JQ289518	JQ289374
B. helichrysi	2408	JQ289422	JQ289470	JQ289519	JQ289375
B. helichrysi	2412	JQ289423	JQ289471	JQ289520	JQ289376
B. helichrysi	2422	JQ289424	JQ289472	JQ289521	JQ289377
B. helichrysi	2424	JQ289425	JQ289473	JQ289522	JQ289378
B. helichrysi	2433	JQ289426	JQ289474	JQ289523	JQ289379
B. helichrysi	2438	JQ289427	JQ289475	JQ289524	JQ289380
B. helichrysi	2448	JQ289428	JQ289476	JQ289525	JQ289381
B. helichrysi	2458	JQ289429	JQ289477	JQ289526	JQ289382
B. helichrysi	2461	JQ289430	JQ289478	JQ289527	JQ289383
B. helichrysi	2463	JQ289431	JQ289479	JQ289528	JQ289384
B. helichrysi	2464	JQ289432	JQ289480	JQ289529	JQ289385
B. helichrysi	2465	JQ289433	JQ289481	JQ289530	JQ289386
B. helichrysi	2468	JQ289434	JQ289482	JQ289531	JQ289387
B. helichrysi	2469	JQ289435	JQ289483	JQ289532	JQ289388
B. helichrysi	2470	JQ289436	JQ289484	JQ289533	JQ289389
B. helichrysi	2474	JQ289437	JQ289485	JQ289534	JQ289390
B. helichrysi	2475	JQ289438	JQ289486	JQ289535	JQ289391
B. helichrysi	2476	JQ289439	JQ289487	JQ289536	JQ289392
B. helichrysi	2477	JQ289440	JQ289488	JQ289537	JQ289393
B. helichrysi	2487	JQ289441	JQ289489	JQ289538	JQ289394
B. helichrysi	2505	JQ289442	JQ289490	JQ289539	JQ289395
B. helichrysi	2523	JQ289443	JQ289491	JQ289540	JQ289396
B. helichrysi	2528	JQ289444	JQ289492	JQ289541	JQ289397
B. helichrysi	2590	GU568532.1	GU568600.1	GU568635.1	GU568456.1

B. helichrysi	2595	JQ289445	JQ289493	JQ289542	JQ289398
B. helichrysi	2597	JQ289446	JQ289494	JQ289543	JQ289399
B. helichrysi	2791	JQ289447	JQ289495	JQ289544	-
B. helichrysi	2793	JQ289448	JQ289496	JQ289545	JQ289400
B. helichrysi	2794	JQ289449	JQ289497	JQ289546	JQ289401
B. helichrysi	-	EU701532	-	-	-
B. helichrysi	-	EU701533	-	-	-
B. helichrysi	-	EU701534	-	-	-
B. helichrysi	-	GU978957	-	-	-
B. helichrysi	-	GU978792	-	-	-
B. helichrysi	-	HQ632652	-	-	-
B. spiraeae	1775	EU189672.1	EU189608.1	EU998902.1	GU568425.1
B. spiraeae	2143	EU189686.1	EU189622.1	EU998911.1	GU568436.1
B. spiraeae	2226	GU568518.1	GU568585.1	GU568620.1	GU568442.1
B. spiraeae	2240	GU568519.1	GU568586.1	GU568621.1	GU568443.1
B. spiraeae	2586	GU568531.1	GU568599.1	GU568634.1	GU568455.1
B. salicinae	s307	EU189694.1	EU189630.1	EU998864.1	GU568464.1

Table S2. Information on *B. helichrysi* microsatellite markers. Multiplex PCR conditions: Ta, annealing temperature; nb cycles, number of cycles. Nb alleles H1 and H2: number of alleles for each marker, for individuals within sampled colonies of H1 and H2, respectively. In bold, the microsatellite markers developed for this study.

Locus	Primer sequence (5'-3') "F: Forward; R: Reverse"	Repeat motif	Dye	Ta (°C)	nb cycles	Size range	Nb alleles H1	H2
Bh-GT3F8	F: ATGGAGCAGAAAAAGAGACG R: TAAAAATCGAGCAGGACACA	AC	Vic	60	37	327-420	23	17
Bh-CT3H5	F: AATCACTCTCGGCACAACCTC R: CGCTCACGAATTAATCAATG	GA	FAM	60	37	200-240	22	10
Bh-GT2E6	F: TTCTCGTATCATCTCCCAT R: TGGGCACCTACACAATGATA	AC	Pet	60	35	65-110	11	9
Bh-GT3E11	F: TTTTCGCGTTTCAACAGTAG R: TTATGCACGCGTTTTATACA	AC	FAM	60	35	105-150	7	4
Bh-GT3G9	F: ATGCCACGTCTGTCAGCCA R: TGTCCGAGTATAGCAGACG	(CT) ₆ (CA) ₁₁	Vic	60	37	140-230	20	11
Bh-GT3D8	F: TAGGAGACCGGAACCTGCAGA R: CACTCGCACTTCAGACACGC	CA	Ned	60	37	300-365	24	10
Bh-GT3C9	F: GCGCAGGGATATGTCTTCTT R: TGCGTCTCAATACAGAACCG	AC	Ned	60	37	175-230	18	16
Bh-GT3B5	F: ATCTCCTCATCCAATCGGTG R: CACCAACAGACTTCACGTAT	AC	Ned	60	37	97-159	22	9
Bh-GT3B4	F: GAATTGCCGGCTATCAAGAC R: GTATCTCATCTGCTGCGCGT	(TG) ₆ CG (TG) ₃	Pet	60	37	215-295	30	11
Bh-GT3A1	F: CCGTATACTCGTAGCGTTCG R: GCACGTGTGGTAGCCATTG	CA	FAM	60	37	150-200	15	7
Bh-CT4B9	F: ACAAGTGCTGGCCATGTGTT R: TCGTCACACGCCTAGTCAAC	CT	FAM	63	40	320-385	15	13
Bh-CT3H7	F: CTTAAGACGACGCGATGACG R: TCACACTCTACGACTGCTGT	(CT) ₁₂ (AC) ₅	Vic	63	40	245-300	17	11
Bh-CT2B4	F: AAACCGCCGCTACAAACAA R: ATTATAACGACGTGCGGTGC	TAA	Vic	63	40	115-170	6	3
Bh-GT3D5	F: CGAGAAACGGGTGGTGTGA R: AACCGCACACAGAATGTCAC	(TA) ₆ TG (TA) ₄	FAM	63	40	155-190	7	4

Table S3. P-distances within and between groups for COI sequences. The p-distances are given with their standard error. N: number of sequences used. (For the p-distances between *B. salicinae*, *B. spiraea*, *B. helichrysi* H1 and H2 see Table 2). *B. helichrysi* India (HQ632652), *B. helichrysi* USA (EU701532, EU701533 and EU701534), *B. helichrysi* Korea (GU978957 and GU978792).

	N	<i>B. helichrysi</i> H1	<i>B. helichrysi</i> H2	<i>B. spiraea</i>	<i>B. salicinae</i>	<i>B. helichrysi</i> India	<i>B. helichrysi</i> USA	<i>B. helichrysi</i> Korea
<i>B. helichrysi</i> India	1	0.0258 ± 0.0074	0.0153 ± 0.0054	0.0163 ± 0.0057	0.0265 ± 0.0073	-		
<i>B. helichrysi</i> USA	3	0.0279 ± 0.0074	0.0006 ± 0.0003	0.0186 ± 0.0060	0.0331 ± 0.0083	0.0155 ± 0.0055	0 ± 0	
<i>B. helichrysi</i> Korea	2	0.0258 ± 0.0073	0.0153 ± 0.0054	0.0163 ± 0.0059	0.0265 ± 0.0072	0.0088 ± 0.0043	0.0155 ± 0.0055	0 ± 0

Annexe Supplementary data article n°2

Figure S1: Alignment of the partial nucleotide sequence for *CytB* from *B. helichrysi* H1 and H2 (nucleotides identical to the reference sequence are indicated by ‘.’). A. Details of the *RsaI* restriction site. B. Details of the *BstXI* restriction site.

A.

RsaI

	270	280	290	300	310	320
1716 <i>B. helichrysi</i> H1	TAA	CAGCTTTT	GTAGGATAT	GTAC	TACCTTGAGGAC	AAATATCATT
1749 <i>B. helichrysi</i> H1
2408 <i>B. helichrysi</i> H1
2477 <i>B. helichrysi</i> H1
Bh118 <i>B. helichrysi</i> H1
Bh124 <i>B. helichrysi</i> H1
Bh353 <i>B. helichrysi</i> H1
Bh377 <i>B. helichrysi</i> H1
1608 <i>B. helichrysi</i> H2	G.
1809 <i>B. helichrysi</i> H2	G.
2791 <i>B. helichrysi</i> H2	G.
RF5 <i>B. helichrysi</i> H2	G.
RF9 <i>B. helichrysi</i> H2	G.
Bh98 <i>B. helichrysi</i> H2	G.
Bh203 <i>B. helichrysi</i> H2	G.
Bh439 <i>B. helichrysi</i> H2	G.

B.

BstXI

	110	120	130	140	150	160
1716 <i>B. helichrysi</i> H1	GAAATATCA	ATTTCGGATG	ACTAATCCG	TTCATTTC	CATGCTAAT	TGGAGCATCA
1749 <i>B. helichrysi</i> H1
2408 <i>B. helichrysi</i> H1
2477 <i>B. helichrysi</i> H1
Bh118 <i>B. helichrysi</i> H1
Bh124 <i>B. helichrysi</i> H1
Bh353 <i>B. helichrysi</i> H1
Bh377 <i>B. helichrysi</i> H1
1608 <i>B. helichrysi</i> H2	T.	C.
1809 <i>B. helichrysi</i> H2	T.	C.
2791 <i>B. helichrysi</i> H2	T.	C.
RF5 <i>B. helichrysi</i> H2	T.	C.
RF9 <i>B. helichrysi</i> H2	T.	C.
Bh98 <i>B. helichrysi</i> H2	T.	C.
Bh203 <i>B. helichrysi</i> H2	T.	C.
Bh439 <i>B. helichrysi</i> H2	T.	C.

Table S1. Sampling details. nH1, number of individuals indentified as *B. helichrysi* H1 in the colony; nH2, number of individuals indentified as *B. helichrysi* H2 in the colony; class, (1) when only H1 individuals had been identified in the sample, (2) when only H2 individuals had been identified in the sample, (3) for mixed colonies.

sample	nH1	nH2	class	day	month	year	plant.family	plant.genera	plant.species	Departement County	region	country
Bh103	3	0	1	19	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh104	3	0	1	20	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh105	3	0	1	20	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh106	3	0	1	20	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh107	3	0	1	20	5	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh108	2	0	1	20	5	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh142	3	0	1	25	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh143	3	0	1	25	5	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh144	3	0	1	25	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh145	1	0	1	25	5	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	<i>sp</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh146	3	0	1	25	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh147	2	0	1	25	5	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh148	2	0	1	25	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh109	2	0	1	20	5	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh110	3	0	1	20	5	2010	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh111	3	0	1	20	5	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Almaty	Kazakhstan
Bh113	3	0	1	21	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh114	2	0	1	21	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh115	2	0	1	21	5	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	<i>sp</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh116	2	0	1	21	5	2010	Asteraceae	<i>Artemisia</i>	<i>sp</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh117	3	0	1	21	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh118	3	0	1	21	5	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	<i>sp</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh119	3	0	1	21	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh120	2	0	1	21	5	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh121	3	0	1	22	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh122	3	0	1	22	5	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh123	2	0	1	22	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh124	3	0	1	22	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh125	3	0	1	22	5	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	<i>sp</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh126	3	0	1	22	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh127	3	0	1	22	5	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	<i>sp</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh128	3	0	1	22	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh129	3	0	1	22	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
2583	2	0	1	2	7	2008	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh132	0	1	2	23	5	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh133	1	6	3	23	5	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh136	7	1	3	23	5	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
Bh140	1	0	1	24	5	2010	unknown	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	Ongtustik	Ongtustik	Kazakhstan
2142	2	0	1	12	8	2006	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	Kinlochewe	Ecosse	Royaune_Uni
Bh101	3	0	1	17	5	2010	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>tuberosus</i>	Seine	Ile_de_France	France
2486	3	0	1	5	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Orne	Basse_Normandie	France
2475	3	0	1	29	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Aube	Champagne_Ardennes	France
707	2	0	1	22	6	1999	Asteraceae	<i>Saussurea</i>	<i>alpina</i>	Vosges_	Lorraine	France
761	5	0	1	24	6	1999	Asteraceae	<i>Solidago</i>	<i>glomerata</i>	Vosges_	Lorraine	France
2598	3	0	1	25	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Loir_et_Cher	Centre	France
2599	1	0	1	25	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Indre_et_Loire	Centre	France
1716	1	0	1	29	4	2005	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Tarn_et_Garonne	Midi_Pyrenees	France
2596	1	0	1	18	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Gers	Midi_Pyrenees	France
2488	3	0	1	16	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Haute_Garrone	Midi_Pyrenees	France
Bh455	2	0	1	8	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh456	2	0	1	8	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh457	1	0	1	8	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh454	3	0	1	8	8	2011	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	<i>arenarium</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh441	0	2	2	6	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh442	3	0	1	6	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh443	3	0	1	6	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh444	3	0	1	6	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh447	0	1	2	6	8	2011	Asteraceae	<i>eucaanthemum</i>	<i>crassifolium</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh445	0	2	2	6	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh446	1	2	3	6	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh169	3	0	1	11	6	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh170	3	0	1	11	6	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	<i>sp</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh452	3	0	1	8	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh453	1	0	1	8	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh448	0	2	2	7	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh449	3	0	1	7	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh164	1	0	1	9	6	2010	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	<i>arenarium</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh165	3	0	1	9	6	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh166	3	0	1	9	6	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
Bh451	1	2	3	7	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Landes	Aquitaine	France
1695	4	0	1	7	4	2005	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Gard	LR	France
2791	0	5	2	10	9	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>sp</i>	Gard	LR	France
2793	0	5	2	29	10	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>sp</i>	Gard	LR	France

Table S1. continued.

sample	nH1	nH2	class	day	month	year	plant.family	plant.genera	plant.species	Departement County	region	country
1930	0	2	2	18	4	2006	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	Herauld	LR	France
2792	0	2	2	22	10	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>sp</i>	Herauld	LR	France
2794	0	6	2	22	10	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>sp</i>	Herauld	LR	France
1939	5	0	1	17	5	2006	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>spinosa</i>	Herauld	LR	France
1702	3	0	1	22	4	2005	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>spinosa</i>	Herauld	LR	France
1937	3	0	1	10	5	2006	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>spinosa</i>	Herauld	LR	France
Bh186	0	2	2	14	4	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Herauld	LR	France
Bh437	2	0	1	4	7	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Herauld	LR	France
Bh97	1	1	3	28	4	2010	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	Herauld	LR	France
Prades1	0	2	2	20	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Herauld	LR	France
Prades2	2	0	1	20	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Herauld	LR	France
Prades3	0	1	2	20	8	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Herauld	LR	France
1728	4	0	1	4	5	2005	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Herauld	LR	France
2406	3	0	1	22	4	2008	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Herauld	LR	France
2408	3	2	3	23	5	2008	Boraginaceae	<i>Myosotis</i>	<i>sp</i>	Herauld	LR	France
Bh100	3	0	1	1	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Herauld	LR	France
2412	1	0	1	5	5	2008	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Herauld	LR	France
2422	5	0	1	6	5	2008	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Herauld	LR	France
1681	2	1	3	4	4	2005	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>sp</i>	Bouches_du_Rhone	PACA	France
2425	0	3	2	15	5	2008	Asteraceae	<i>Santolina</i>	<i>amaecypariss</i>	Alpes_Maritimes	PACA	France
2433	2	2	3	15	5	2008	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	Alpes_Maritimes	PACA	France
1600	2	2	3	6	6	2002	Boraginaceae	<i>Myosotis</i>	<i>sp</i>	Ahaia	Peloponese	Grece
1608	2	2	3	6	6	2002	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Ahaia	Peloponese	Grece
1946	1	6	3	20	5	2006	Asteraceae	<i>Thysanthemum</i>	<i>sp</i>	Catania	Sicile	Italie
1987	3	1	3	24	5	2006	Asteraceae	<i>Asteraceae</i>	<i>sp</i>	Catania	Sicile	Italie
Bh432	0	2	2	NA	6	2011	Asteraceae	<i>Pallenis</i>	<i>spinosa</i>	Khenchela_Province	Khenchela_Province	Algerie
Bh433	0	3	2	NA	6	2011	Asteraceae	<i>Centaurea</i>	<i>solstitialis</i>	Khenchela_Province	Khenchela_Province	Algerie
Bh434	0	3	2	NA	6	2011	Asteraceae	<i>Pallenis</i>	<i>spinosa</i>	Khenchela_Province	Khenchela_Province	Algerie
Bh435	0	3	2	NA	6	2011	Asteraceae	<i>Centaurea</i>	<i>solstitialis</i>	Batna_Province	Batna_Province	Algerie
Bh436	0	3	2	NA	6	2011	Asteraceae	<i>Koelipinia</i>	<i>linearis</i>	Ghardaia_Province	Ghardaia_Province	Algerie
RF4	1	0	1	21	8	2007	Ericaceae	<i>Arctostaphylos</i>	<i>uva_ursi</i>	Parksville	British_Columbia	Canada
RF7	3	0	1	20	6	2008	Asteraceae	<i>Coreopsis</i>	<i>rosea</i>	Abbotsford	British_Columbia	Canada
RF8	3	0	1	10	7	2008	Asteraceae	<i>Solidago</i>	<i>canadensis</i>	Abbotsford	British_Columbia	Canada
RF5	0	4	2	29	5	2002	Asteraceae	<i>Eupatorium</i>	<i>maculatum</i>	Tamasee	South_Carolina	USA
Bh440	0	3	2	6	6	2011	Asteraceae	<i>Erechtites</i>	<i>hieracifolia</i>	Fort_Pierce	Florida	USA
Bh171	0	3	2	29	6	2010	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Denver	Colorado	USA
Bh172	0	1	2	29	6	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Denver	Colorado	USA
Bh173	0	3	2	29	6	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Denver	Colorado	USA
Bh174	4	0	1	31	6	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Roosevelt_National_Forest	Colorado	USA
Bh175	3	1	3	2	7	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Roosevelt_National_Forest	Colorado	USA
Bh176	3	0	1	3	7	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Rocky_Mountain_National_Park	Colorado	USA
Bh177	0	1	2	4	7	2010	Asteraceae	<i>Aster</i>	<i>sp</i>	Fort_Collins	Colorado	USA
2970	0	3	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Inula</i>	<i>sp</i>	San_Bernardino_County	California	USA
Bh282	0	2	2	7	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Placer_County	California	USA
Bh283	2	1	3	7	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yuba_County	California	USA
Bh284	0	3	2	7	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yuba_County	California	USA
Bh285	0	3	2	7	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yuba_County	California	USA
Bh286	2	0	1	7	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yuba_County	California	USA
Bh287	3	0	1	7	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yuba_County	California	USA
Bh288	1	2	3	7	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yuba_County	California	USA
Bh289	1	2	3	7	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yuba_County	California	USA
Bh290	0	3	2	8	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Siskiyou_County	California	USA
Bh291	3	0	1	8	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Siskiyou_County	California	USA
Bh292	2	0	1	8	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Siskiyou_County	California	USA
Bh293	0	3	2	8	6	2011	Boraginaceae	<i>Symphytum</i>	<i>sp</i>	Siskiyou_County	California	USA
Bh294	0	3	2	8	6	2011	Asteraceae	<i>Euryops</i>	<i>sp</i>	Siskiyou_County	California	USA
2978	3	0	1	3	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	San_Mateo_County	California	USA
2980	0	2	2	3	6	2011	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	<i>sp</i>	San_Mateo_County	California	USA
2973	0	1	2	2	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	San_Francisco_County	California	USA
Bh187	2	0	1	29	5	2011	Asteraceae	<i>Euryops</i>	<i>pectinatis</i>	Los_Angeles_County	California	USA
Bh188	0	3	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	<i>sp</i>	Riverside_County	California	USA
Bh189	0	1	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Riverside_County	California	USA
Bh190	1	1	3	29	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Riverside_County	California	USA
Bh192	0	3	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Riverside_County	California	USA
Bh193	0	2	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Riverside_County	California	USA
Bh194	0	2	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Aster</i>	<i>sp</i>	Riverside_County	California	USA
Bh195	0	3	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Riverside_County	California	USA
Bh196	1	0	1	30	5	2011	Asteraceae	<i>Euryops</i>	<i>pectinatis</i>	Los_Angeles_County	California	USA
Bh198	0	3	2	30	5	2011	Asteraceae	<i>Artemisia</i>	<i>sp</i>	Ventura_County	California	USA
Bh199	2	0	1	30	5	2011	Apocynaceae	<i>Vinca</i>	<i>sp</i>	Ventura_County	California	USA
Bh200	1	2	3	30	5	2011	Asteraceae	<i>Aster</i>	<i>sp</i>	Ventura_County	California	USA
Bh201	0	2	2	30	5	2011	Asteraceae	<i>Asterospermum</i>	<i>sp</i>	Ventura_County	California	USA
Bh202	0	3	2	30	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh203	0	3	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh204	0	3	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA

Table S1. continued.

sample	nH1	nH2	class	day	month	year	plant.family	plant.genera	plant.species	Departement County	region	country
Bh205	0	3	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh206	0	2	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh207	1	2	3	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh208	0	2	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh209	0	3	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Artemisia</i>	<i>sp</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh210	1	1	3	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh211	3	0	1	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh212	0	3	2	31	5	2011	unknown	unknown	unknown	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh213	0	3	2	31	5	2011	unknown	unknown	unknown	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh214	0	2	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	<i>sp</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh215	0	2	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Santa_Barbara_County	California	USA
Bh216	3	0	1	1	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	San_Luis_Obispo_County	California	USA
Bh217	1	0	1	1	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	San_Luis_Obispo_County	California	USA
Bh347	2	1	3	13	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Wasco_County	Oregon	USA
Bh348	1	1	3	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Wasco_County	Oregon	USA
Bh349	2	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Wasco_County	Oregon	USA
Bh350	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Wasco_County	Oregon	USA
Bh351	1	1	3	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Wasco_County	Oregon	USA
Bh352	0	1	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Wasco_County	Oregon	USA
Bh353	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>viscosus</i>	Wasco_County	Oregon	USA
Bh354	1	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Wasco_County	Oregon	USA
Bh360	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Umatilla_County	Oregon	USA
Bh361	2	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Umatilla_County	Oregon	USA
Bh364	2	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Umatilla_County	Oregon	USA
Bh366	0	2	2	14	6	2011	unknown	unknown	unknown	Umatilla_County	Oregon	USA
Bh367	0	2	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp</i>	Umatilla_County	Oregon	USA
Bh368	2	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Umatilla_County	Oregon	USA
Bh369	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Umatilla_County	Oregon	USA
Bh295	3	0	1	8	6	2011	Apocynaceae	<i>Vinca</i>	<i>sp</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh296	1	2	3	8	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh297	3	0	1	8	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh298	3	0	1	8	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh299	1	2	3	8	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh300	0	3	2	9	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh301	0	3	2	9	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh302	1	2	3	9	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh303	1	2	3	9	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Jackson_County	Oregon	USA
Bh304	3	0	1	9	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Josephine_County	Oregon	USA
Bh305	0	3	2	9	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Josephine_County	Oregon	USA
Bh306	3	0	1	9	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Josephine_County	Oregon	USA
Bh307	0	3	2	9	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp</i>	Josephine_County	Oregon	USA
Bh308	2	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Coos_County	Oregon	USA
Bh309	3	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Coos_County	Oregon	USA
Bh310	3	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Coos_County	Oregon	USA
Bh311	2	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Coos_County	Oregon	USA
Bh313	1	2	3	10	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Coos_County	Oregon	USA
Bh314	0	2	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>viscosus</i>	Coos_County	Oregon	USA
Bh316	0	3	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Douglas_County	Oregon	USA
Bh317	0	3	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Douglas_County	Oregon	USA
Bh318	0	2	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Douglas_County	Oregon	USA
Bh319	0	3	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Lane_County	Oregon	USA
Bh320	1	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Lane_County	Oregon	USA
Bh323	0	3	2	11	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Lane_County	Oregon	USA
Bh324	0	2	2	11	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Lane_County	Oregon	USA
Bh325	0	3	2	11	6	2011	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>viscosus</i>	Lane_County	Oregon	USA
Bh326	3	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh327	1	1	3	12	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh328	0	3	2	12	6	2011	Lamiaceae	<i>Stachys</i>	<i>byzantina</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh329	3	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh330	3	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	<i>sp</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh331	0	3	2	12	6	2011	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>viscosus</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh332	3	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh333	3	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh334	3	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh335	3	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh336	3	0	1	13	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh337	3	0	1	13	6	2011	Boraginaceae	<i>Myosotis</i>	<i>sp</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh338	3	0	1	13	6	2011	Asteraceae	<i>Artemisia</i>	<i>sp</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh339	2	1	3	13	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp</i>	Multnomah_County	Oregon	USA
Bh345	0	2	2	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh346	0	2	2	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh355	0	3	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh356	0	2	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh357	0	2	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh358	1	1	3	14	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Klickitat_County	Washington	USA

Table S1. continued.

sample	nH1	nH2	class	day	month	year	plant.family	plant.genera	plant.species	Departement County	region	country
Bh359	0	3	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh340	3	0	1	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh341	3	0	1	13	6	2011	Lamiaceae	<i>Stachys</i>	<i>byzantina</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh342	0	3	2	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh343	0	3	2	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh344	0	3	2	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Klickitat_County	Washington	USA
Bh370	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Walla_Walla_County	Washington	USA
Bh371	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Walla_Walla_County	Washington	USA
Bh372	2	1	3	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Walla_Walla_County	Washington	USA
Bh373	2	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Walla_Walla_County	Washington	USA
Bh374	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Walla_Walla_County	Washington	USA
Bh375	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Walla_Walla_County	Washington	USA
Bh376	3	0	1	14	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Walla_Walla_County	Washington	USA
Bh377	1	0	1	15	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Yakima_County	Washington	USA
Bh378	3	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>filipendulina</i>	Yakima_County	Washington	USA
Bh379	3	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>filipendulina</i>	Yakima_County	Washington	USA
Bh380	1	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Yakima_County	Washington	USA
Bh381	3	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Yakima_County	Washington	USA
Bh382	2	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yakima_County	Washington	USA
Bh383	1	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp</i>	Yakima_County	Washington	USA
Bh384	2	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Yakima_County	Washington	USA
Bh386	3	0	1	16	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Grays_Harbor_County	Washington	USA
Bh387	2	0	1	16	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Grays_Harbor_County	Washington	USA
Bh388	0	3	2	16	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Jefferson_County	Washington	USA
Bh389	1	0	1	16	6	2011	unknown	<i>unknown</i>	<i>sp</i>	Jefferson_County	Washington	USA
Bh390	1	0	1	16	6	2011	unknown	<i>unknown</i>	<i>sp</i>	Jefferson_County	Washington	USA
Bh391	2	0	1	16	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp</i>	Jefferson_County	Washington	USA
RF1	0	3	2	22	6	2006	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Jefferson_County	Washington	USA
3026	2	0	1	16	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Jefferson_County	Washington	USA
Bh394	0	2	2	17	6	2011	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>viscosus</i>	Clallam_County	Washington	USA
Bh396	1	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp</i>	Clallam_County	Washington	USA
Bh397	2	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Clallam_County	Washington	USA
Bh398	2	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Clallam_County	Washington	USA
Bh399	3	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp</i>	Clallam_County	Washington	USA
3027	1	0	1	16	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>sp</i>	Clallam_County	Washington	USA
3030	1	0	1	17	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Clallam_County	Washington	USA
3037	1	0	1	NA	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Kitsap_County	Washington	USA
Bh400	1	1	3	17	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Snohomish_King_County	Washington	USA
Bh402	1	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Snohomish_King_County	Washington	USA
Bh403	3	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp</i>	Snohomish_King_County	Washington	USA
Bh404	2	0	1	17	6	2011	Lamiaceae	<i>Stachys</i>	<i>byzantina</i>	Snohomish_King_County	Washington	USA
3045	3	0	1	20	6	2011	Asteraceae	<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Snohomish_King_County	Washington	USA
RF2	0	2	2	23	9	2006	Asteraceae	<i>Antennaria</i>	<i>lanata</i>	Skamania_County	Washington	USA
RF3	4	0	1	19	6	2006	Ranunculaceae	<i>Anemone</i>	<i>drummondii</i>	Lewis_County	Washington	USA
1828	0	4	2	22	10	2005	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>sp</i>	Queensland	Queensland	Australie
1805	0	5	2	11	10	2005	Goodeniaceae	<i>unknown</i>	<i>sp</i>	Western_Australia	Western_Australia	Australie
1809	0	4	2	11	10	2005	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Western_Australia	Western_Australia	Australie
2391	0	2	2	11	12	2007	Oenotheraceae	<i>Oenothera</i>	<i>sp</i>	NA	NA	Chili

Table S2. Eigenvalues of the 67 climatic variables for the First and second axis of the PCA. (The meaning of each variable are given in Figure 4 and Table S1).

variable	Comp1	Comp2
bio1	-0.9763864	0.19975840
bio2	-0.2198817	-0.60660183
bio3	-0.4759405	0.52892919
bio4	0.3802073	-0.84356817
bio5	-0.4698669	-0.75444755
bio6	-0.6825080	0.69149191
bio7	0.2379154	-0.91497213
bio8	-0.3467833	-0.03295088
bio9	-0.5917053	0.11487112
bio10	-0.6791814	-0.59948481
bio11	-0.7806676	0.59040546
bio12	0.3839358	0.82061925
bio13	0.3566036	0.79015581
bio14	0.2568882	0.55931142
bio15	-0.2856168	0.00089228
bio16	0.3696532	0.78969034
bio17	0.2589816	0.61921215
bio18	0.2663584	0.54954559
bio19	0.3016841	0.82120313
tmin1	-0.6829289	0.69120767
tmin2	-0.7122284	0.64203729
tmin3	-0.8137397	0.54142897
tmin4	-0.8215157	0.21969884
tmin5	-0.7200341	-0.05469175
tmin6	-0.6156947	-0.24601063
tmin7	-0.6075773	-0.35296287
tmin8	-0.7328307	-0.15987604
tmin9	-0.8351980	0.24515323
tmin10	-0.8137336	0.49173916
tmin11	-0.7577981	0.62013348
tmin12	-0.6991498	0.67895594
tmax1	-0.7994295	0.51828046
tmax2	-0.8200781	0.45772539
tmax3	-0.9191870	0.29078688
tmax4	-0.9221782	-0.23688070
tmax5	-0.6970866	-0.59008344
tmax6	-0.5193024	-0.74267653
tmax7	-0.4429396	-0.76779186
tmax8	-0.5199946	-0.70492547
tmax9	-0.7794264	-0.42587689
tmax10	-0.9357456	0.02631211
tmax11	-0.8959151	0.34411316
tmax12	-0.8268748	0.47796332
tmean1	-0.7594070	0.61503179
tmean2	-0.7820726	0.55616320
tmean3	-0.8935915	0.42260278
tmean4	-0.9463631	-0.02038902
tmean5	-0.7998967	-0.38306727
tmean6	-0.6321433	-0.59789575
tmean7	-0.5790005	-0.68684076
tmean8	-0.7078146	-0.56228586
tmean9	-0.9554569	-0.11073430
tmean10	-0.9510411	0.27961973
tmean11	-0.8618490	0.49062265
tmean12	-0.7909646	0.58892805
prec1	0.2881700	0.80961214
prec2	0.2453874	0.83057627
prec3	0.3375112	0.75626822
prec4	0.5235725	0.57921767
prec5	0.5756746	0.40273904
prec6	0.3865559	0.49916601
prec7	0.2852367	0.41199095
prec8	0.1699858	0.54729105
prec9	0.1840828	0.72061012
prec10	0.3666500	0.76208696
prec11	0.3753120	0.80601142
prec12	0.3505359	0.81301587

Table S3. Results of the one-way ANOVA for each climatic variables (p-value ANOVA, in bold p-value<0,05) and results of the Tukey's HSD test between colony class. For each pair of colony class, the value of the mean difference are given (in bold mean differences associated to a p-value<0,05 of the Tukey's HSD test)

climatic variable	p-value ANOVA	Tukey's HSD test between colony class		
		2 - 1	3 - 1	3 - 2
bio1	5.534e-08	20.6920929	21.4288581	0.7367652
bio2	0.002527	10.671108	8.354204	-2.316904
bio3	1.24e-09	6.968802	3.394140	-3.574662
bio4	5e-05	-1297.5619	-672.7999	624.7620
bio5	0.03604	8.062714	19.106161	11.043447
bio6	4.512e-06	33.742759	29.504716	-4.238043
bio7	0.042	-25.68004	-10.39856	15.28149
bio8	0.3635	9.374531	3.247843	-6.126689
bio9	0.0008953	27.85933	46.17660	18.31727
bio10	0.0253	5.683555	14.025286	8.341731
bio11	1.147e-08	39.460544	32.163355	-7.297189
bio12	0.2424	-20.37692	-193.39554	-173.01862
bio13	0.3363	8.039974	-20.175798	-28.215772
bio14	0.002905	-7.505226	-10.869958	-3.364732
bio15	1.151e-06	14.920610	12.363837	-2.556773
bio16	0.3171	21.74180	-61.66346	-83.40526
bio17	0.006254	-24.81130	-35.03291	-10.22161
bio18	0.01520	-24.78098	-40.27313	-15.49215
bio19	0.2793	38.83085	-45.38712	-84.21796
tmin1	4.282e-06	33.859651	29.586193	-4.273457
tmin2	1.297e-06	33.850475	29.605860	-4.244615
tmin3	8.03e-05	20.385383	19.355810	-1.029573
tmin4	0.05268	7.225884	10.275537	3.049653
tmin5	0.359	1.304237	7.330524	6.026287
tmin6	0.3931	-1.281178	6.148906	7.430084
tmin7	0.2262	-0.05776749	8.92434277	8.98211026
tmin8	0.07278	4.429506	11.444110	7.014604
tmin9	0.001850	13.160696	15.396548	2.235853
tmin10	3.01e-05	20.4879917	20.3277142	-0.1602775
tmin11	9.902e-06	24.4550387	23.5751555	-0.8798832
tmin12	1.291e-05	27.492300	25.842063	-1.650237
tmax1	2.094e-10	49.25940	36.19185	-13.06754
tmax2	6.635e-11	47.565148	37.824002	-9.741146
tmax3	1.532e-08	31.142903	25.902669	-5.240234
tmax4	2.373e-05	16.8511929	17.0804736	0.2292808
tmax5	0.00973	8.674459	15.336745	6.662286
tmax6	0.05515	6.119604	15.881196	9.761592
tmax7	0.04475	7.526211	19.580975	12.054765
tmax8	0.01472	9.604803	19.723460	10.118656
tmax9	3.359e-06	18.33424	23.31708	4.98284
tmax10	1.531e-11	31.417219	28.841461	-2.575758
tmax11	4.664e-11	40.28604	32.68071	-7.60533
tmax12	1.724e-10	45.49549	34.02890	-11.46659

Table S3. continued.

climatic variable	p-value ANOVA	Tukey's HSD test between colony class		
		2 - 1	3 - 1	3 - 2
tmean1	1.842e-08	41.52685	32.79410	-8.73275
tmean2	6.03e-09	40.65196	33.59683	-7.05513
tmean3	5.829e-07	25.876007	22.736905	-3.139102
tmean4	0.0006559	11.982367	13.726069	1.743702
tmean5	0.03938	4.994654	11.480233	6.485579
tmean6	0.1226	2.294104	10.939595	8.645491
tmean7	0.05541	3.790393	14.189444	10.399051
tmean8	0.008667	6.933615	15.501706	8.568091
tmean9	2.057e-06	15.758478	19.321092	3.562614
tmean10	2.427e-09	25.865715	24.459362	-1.406353
tmean11	8.41e-09	32.245113	27.961068	-4.284045
tmean12	2.09e-08	36.432299	29.899257	-6.533041
prec1	0.2243	16.72217	-13.56552	-30.28770
prec2	0.1344	15.93058	-11.85912	-27.78970
prec3	0.1504	9.413788	-16.796508	-26.210296
prec4	0.01331	-11.60472	-21.58318	-9.97846
prec5	6.015e-05	-16.719540	-22.987156	-6.267616
prec6	0.0007499	-11.079789	-16.519366	-5.439576
prec7	0.009937	-6.898588	-11.920128	-5.021541
prec8	0.04179	-7.104604	-12.115192	-5.010588
prec9	0.2087	-6.121759	-11.365643	-5.243885
prec10	0.2364	-10.880555	-15.247843	-4.367287
prec11	0.4463	2.154951	-20.400361	-22.555312
prec12	0.4839	5.811139	-19.035521	-24.846659

Annexe Supplementary data article n°3

Table S1.B. *helichrysi* sampling details. H1, MLL-A to MLL-H, India and other lineages correspond to genetic lineages. Total.indv corresponds to the total number of individual within each colony.

colony	H1	MLL-A	MLL-B	MLL-C	MLL-D	MLL-E	MLL-F	MLL-G	MLL-H	MLL-I	India	other lineage	total.indv	day	month	year	plant.family	plante.genus	plante.species	region	country
707	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	22	6	1999	Asteraceae	<i>Saussurea</i>	<i>alpina</i>	Lorraine	France
761	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	24	6	1999	Asteraceae	<i>Solidago</i>	<i>glomerata</i>	Lorraine	France
852	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	6	2000	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	<i>stoechas</i>	Aquitaine	France
1600	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	4	6	6	2002	Boraginaceae	<i>Myosotis</i>	sp.	Peloponese	Greece
1608	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	6	6	2002	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Peloponese	Greece
1681	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	2005	Asteraceae	<i>Senecio</i>	sp.	PACA	France
1684	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	6	4	2005	Scrophulariaceae	<i>Veronica</i>	sp.	PACA	France
1695	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7	4	2005	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Languedoc_Roussillon	France
1702	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	22	4	2005	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>spinosa</i>	Languedoc_Roussillon	France
1716	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	4	2005	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Mid_Pyrenees	France
1728	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	5	2005	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Languedoc_Roussillon	France
1805	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11	10	2005	Goodeniaceae	<i>Goodeniaceae</i>	sp.	Western_Australia	Australia
1809	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	11	10	2005	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Western_Australia	Australia
1828	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	22	10	2005	Asteraceae	<i>Senecio</i>	sp.	Queensland	Australia
1930	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	18	4	2006	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	Languedoc_Roussillon	France
1937	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	10	5	2006	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>spinosa</i>	Languedoc_Roussillon	France
1939	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	17	5	2006	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>spinosa</i>	Languedoc_Roussillon	France
1946	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	4	20	5	2006	Asteraceae	<i>Chrysanthemum</i>	sp.	Sicily	Italy
1987	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	24	5	2006	Asteraceae	<i>Asteraceae</i>	sp.	Sicily	Italy
2142	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12	8	2006	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	Ecosse	UK
2391	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	11	12	2007	Oenotheraceae	<i>Oenothera</i>	sp.	Cachapaal_Province	Chile
2398	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	14	12	2007	Asteraceae	<i>Haplopappus</i>	sp.	Cachapaal_Province	Chile
2406	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	22	4	2008	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Languedoc_Roussillon	France
2407	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	22	4	2008	Asteraceae	<i>Cynara</i>	<i>scolymus</i>	Languedoc_Roussillon	France
2408	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	23	5	2008	Boraginaceae	<i>Myosotis</i>	sp.	Languedoc_Roussillon	France
2412	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	5	2008	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Languedoc_Roussillon	France
2422	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6	5	2008	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Languedoc_Roussillon	France
2425	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	15	5	2008	Asteraceae	<i>Santolina</i>	<i>chamaecyparissus</i>	PACA	France
2433	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	15	5	2008	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	PACA	France
2438	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	19	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Poitou_Charentes	France
2463	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	15	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Bourgogne	France
2468	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	23	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Centre	France
2469	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	26	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Lorraine	France
2470	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	27	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Rhone_Alpes	France
2474	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	28	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Auvergne	France
2475	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	29	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Champagne_Ardennes	France
2476	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	29	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Champagne_Ardennes	France
2477	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	29	5	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Aquitaine	France
2486	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Basse_Normandie	France
2487	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Pays_de_Loire	France
2488	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	16	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Mid_Pyrenees	France
2583	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	7	2008	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Ongtustik	Kazakhstan
2595	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	16	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Centre	France
2596	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	18	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Mid_Pyrenees	France
2597	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	25	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Centre	France
2598	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	25	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Centre	France
2599	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	25	6	2008	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Centre	France
2683	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	7	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	sp.	PACA	France
2791	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	9	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	sp.	Languedoc_Roussillon	France
2792	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	22	10	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	sp.	Languedoc_Roussillon	France
2793	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	10	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	sp.	Languedoc_Roussillon	France
2794	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	22	10	2009	Asteraceae	<i>Senecio</i>	sp.	Languedoc_Roussillon	France
2970	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Inula</i>	sp.	California	USA
2973	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	California	USA
2976	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	3	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	California	USA
2977	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
2978	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	California	USA
2980	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3	6	2011	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	sp.	California	USA
3026	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	16	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Washington	USA
3027	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Washington	USA
3030	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Washington	USA
3037	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	NA	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Washington	USA
3045	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	20	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Washington	USA
Bh100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	NA	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Languedoc_Roussillon	France
Bh101	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	5	2010	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>tuberosus</i>	Ile_de_France	France
Bh103	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	19	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>domestica</i>	Almaty	Kazakhstan
Bh104	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	20	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	sp.	Almaty	Kazakhstan
Bh105	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	sp.	Almaty	Kazakhstan
Bh106	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	sp.	Almaty	Kazakhstan
Bh107	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	5	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Kazakhstan
Bh108	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	5	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Almaty	Kazakhstan
Bh109	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	20	5	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Kazakhstan
Bh110	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	20	5	2010	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	Almaty	Kazakhstan
Bh111	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	5	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Kazakhstan
Bh113	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	21	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	sp.	Ongtustik	Kazakhstan
Bh114	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	21	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	sp.	Ongtustik	Kazakhstan
Bh115	2	0	0	0	0																

Table S1. continued.

colony	H1	MLL-A	MLL-B	MLL-C	MLL-D	MLL-E	MLL-F	MLL-G	MLL-H	MLL-I	India	other lineage	total indiv	day	month	year	plant.family	plante.genus	plante.species	region	country
Bh147	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	5	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Almaty	Kazakhstan
Bh148	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	25	5	2010	Rosaceae	<i>Prunus</i>	sp.	Almaty	Kazakhstan
Bh152	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	4	6	6	2010	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	PACA	France
Bh155	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14	6	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Languedoc_Roussillon	France
Bh160	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	6	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	sp.	Aquitaine	France
Bh162	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8	6	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	sp.	Aquitaine	France
Bh163	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	6	2010	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	<i>arenarium</i>	Aquitaine	France
Bh164	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	6	2010	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	<i>arenarium</i>	Aquitaine	France
Bh165	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	9	6	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh166	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	9	6	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	9	6	2010	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	Aquitaine	France
Bh168	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	6	2010	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	<i>arenarium</i>	Aquitaine	France
Bh169	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11	6	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh170	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11	6	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	sp.	Aquitaine	France
Bh171	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	6	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Colorado	USA
Bh172	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	6	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Colorado	USA
Bh173	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	6	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Colorado	USA
Bh175	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	7	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Colorado	USA
Bh176	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	7	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Colorado	USA
Bh177	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	7	2010	Asteraceae	<i>Aster</i>	sp.	Colorado	USA
Bh178	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	7	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Colorado	USA
Bh179	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	7	2010	Asteraceae	<i>Pseudognaphalium</i>	sp.	Colorado	USA
Bh180	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	7	2010	Asteraceae	<i>Grindelia</i>	sp.	Colorado	USA
Bh181	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	7	2010	Asteraceae	<i>Pseudognaphalium</i>	sp.	Colorado	USA
Bh182	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	7	2010	Asteraceae	<i>Matricaria</i>	sp.	Colorado	USA
Bh184	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12	7	2010	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>speciosus</i>	New_Mexico	USA
Bh185	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	17	8	2010	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	PACA	France
Bh186	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14	4	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Languedoc_Roussillon	France
Bh187	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	5	2011	Asteraceae	<i>Euryops</i>	<i>pectinatis</i>	California	USA
Bh188	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	sp.	California	USA
Bh189	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh190	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh192	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	29	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh193	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh194	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	5	2011	Asteraceae	<i>Aster</i>	sp.	California	USA
Bh195	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh196	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	30	5	2011	Asteraceae	<i>Euryops</i>	<i>pectinatis</i>	California	USA
Bh198	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	30	5	2011	Asteraceae	<i>Artemisia</i>	sp.	California	USA
Bh199	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	30	5	2011	Apocynaceae	<i>Vinca</i>	sp.	California	USA
Bh200	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	30	5	2011	Asteraceae	<i>Aster</i>	sp.	California	USA
Bh201	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	30	5	2011	Asteraceae	<i>Osterospermum</i>	sp.	California	USA
Bh202	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	30	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh203	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh204	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh205	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh206	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh207	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh208	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh209	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	31	5	2011	Asteraceae	<i>Artemisia</i>	sp.	California	USA
Bh210	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	sp.	California	USA
Bh211	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	sp.	California	USA
Bh212	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	California	USA
Bh213	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	31	5	2011	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	California	USA
Bh214	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	31	5	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	sp.	California	USA
Bh215	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	31	5	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh216	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh217	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh218	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh219	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	California	USA
Bh220	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh221	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh222	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	6	2011	Asteraceae	<i>Eriophyllum</i>	<i>stoechadifolium</i>	California	USA
Bh224	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	6	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	sp.	California	USA
Bh225	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh226	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh227	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh228	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh229	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh230	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	sp.	California	USA
Bh231	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh232	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	sp.	California	USA
Bh233	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh234	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	6	2011	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	California	USA
Bh235	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	California	USA
Bh236	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Eriophyllum</i>	<i>stoechadifolium</i>	California	USA
Bh237	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	6	2011	Asteraceae	<i>Artemisia</i>	sp.	California	USA
Bh238	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	sp.	California	USA
Bh239	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	2011	Asteraceae	<i>Eriophyllum</i>	<i>stoechadifolium</i>	California	USA
Bh240	0</																				

Table S1. continued.

colony	H1	MLL-A	MLL-B	MLL-C	MLL-D	MLL-E	MLL-F	MLL-G	MLL-H	MLL-I	India	other lineage	total. indiv	day	month	year	plant.family	plante.genus	plante.species	region	country
Bh265	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	6	2011	Asteraceae	<i>Euryops</i>	<i>pectinatis</i>	California	USA
Bh266	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	California	USA
Bh267	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	California	USA
Bh268	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh270	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	5	6	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	sp.	California	USA
Bh271	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh272	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh274	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh275	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh276	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh277	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh279	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh280	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh281	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh282	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh283	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh284	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh285	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh286	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh287	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh288	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh289	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh290	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	8	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	California	USA
Bh291	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	California	USA
Bh292	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	California	USA
Bh293	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	8	6	2011	Boraginaceae	<i>Symphytum</i>	sp.	California	USA
Bh294	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	8	6	2011	Asteraceae	<i>Euryops</i>	sp.	California	USA
Bh295	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	6	2011	Apocynaceae	<i>Vinca</i>	sp.	Oregon	USA
Bh296	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh297	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh298	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh299	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh300	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh301	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh302	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	9	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh303	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	9	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh304	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh305	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh306	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	9	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh307	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	sp.	Oregon	USA
Bh308	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Oregon	USA
Bh310	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh311	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh313	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh314	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	6	2011	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>viscosus</i>	Oregon	USA
Bh316	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Oregon	USA
Bh317	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Oregon	USA
Bh318	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Oregon	USA
Bh319	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	sp.	Oregon	USA
Bh320	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh323	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	11	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Oregon	USA
Bh324	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	11	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Oregon	USA
Bh326	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh327	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh328	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	6	2011	Lamiaceae	<i>Stachys</i>	<i>byzantina</i>	Oregon	USA
Bh330	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12	6	2011	Asteraceae	<i>Anaphalis</i>	sp.	Oregon	USA
Bh331	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	6	2011	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>viscosus</i>	Oregon	USA
Bh332	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh333	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh334	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Oregon	USA
Bh335	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh336	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	13	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh337	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	13	6	2011	Boraginaceae	<i>Myosotis</i>	sp.	Oregon	USA
Bh338	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	13	6	2011	Asteraceae	<i>Artemisia</i>	sp.	Oregon	USA
Bh339	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	13	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	sp.	Oregon	USA
Bh340	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh342	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh343	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh344	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh345	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh346	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	13	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh347	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	13	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh348	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh349	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh350	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	14	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh351	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	14	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Oregon	USA
Bh352	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14	6	2011	Asteraceae				

Table S1. continued.

colony	H1	MLL-A	MLL-B	MLL-C	MLL-D	MLL-E	MLL-F	MLL-G	MLL-H	MLL-I	India	other lineage	total. indiv	day	month	year	plant.family	plante.genus	plante.species	region	country
Bh379	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>filipendulina</i>	Washington	USA
Bh380	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh381	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh382	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	15	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Washington	USA
Bh383	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	15	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp.</i>	Washington	USA
Bh384	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	15	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Washington	USA
Bh386	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	16	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Washington	USA
Bh387	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	6	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>cerasifera</i>	Washington	USA
Bh388	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	16	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh389	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	6	2011	unknown	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	Washington	USA
Bh390	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	6	2011	unknown	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	Washington	USA
Bh391	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp.</i>	Washington	USA
Bh394	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>viscosus</i>	Washington	USA
Bh396	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp.</i>	Washington	USA
Bh397	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	17	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh398	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	17	6	2011	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
Bh399	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	17	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp.</i>	Washington	USA
Bh400	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	17	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Washington	USA
Bh402	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	6	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Washington	USA
Bh403	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	17	6	2011	Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>sp.</i>	Washington	USA
Bh404	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	6	2011	Lamiaceae	<i>Stachys</i>	<i>byzantina</i>	Washington	USA
Bh407	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	15	3	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Jammu_and_Kashmir	India
Bh408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	15	3	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Jammu_and_Kashmir	India
Bh409	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	15	3	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Jammu_and_Kashmir	India
Bh410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	15	3	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Jammu_and_Kashmir	India
Bh411	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	15	3	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Jammu_and_Kashmir	India
Bh412	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	15	3	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Jammu_and_Kashmir	India
Bh413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	15	3	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Jammu_and_Kashmir	India
Bh414	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	15	3	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Jammu_and_Kashmir	India
Bh436	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	NA	6	2011	Asteraceae	<i>Koelipinia</i>	<i>linearis</i>	Ghardaia_Province	Algeria
Bh437	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	7	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Languedoc_Roussillon	France
Bh438	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	7	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Languedoc_Roussillon	France
Bh439	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	6	6	2011	Asteraceae	<i>Erechtites</i>	<i>hieracifolia</i>	Florida	USA
Bh440	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	6	6	2011	Asteraceae	<i>Erechtites</i>	<i>hieracifolia</i>	Florida	USA
Bh441	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh442	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh443	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh444	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh445	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh446	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh447	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	8	2011	Asteraceae	<i>Leucanthemum</i>	<i>crassifolium</i>	Aquitaine	France
Bh448	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh449	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh451	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh452	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh454	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	8	2011	Asteraceae	<i>Helichrysum</i>	<i>arenarium</i>	Aquitaine	France
Bh455	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh456	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh457	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	8	2011	Asteraceae	<i>Coryza</i>	<i>canadensis</i>	Aquitaine	France
Bh538	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	5	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>americana</i>	Colorado	USA
Bh540	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	5	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>americana</i>	Colorado	USA
Bh541	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	5	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>americana</i>	Colorado	USA
Bh542	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	5	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>americana</i>	Colorado	USA
Bh545	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	25	5	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>americana</i>	Colorado	USA
Bh546	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	5	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>americana</i>	Colorado	USA
Bh547	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	5	2011	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>americana</i>	Colorado	USA
Bh548	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	4	2012	Asteraceae	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	Rhone_Alpes	France
Bh552	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	4	2012	Asteraceae	<i>Cirsium</i>	<i>arvense</i>	Rhone_Alpes	France
Bh97	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	28	4	2010	Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	Languedoc_Roussillon	France
Bh99	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	5	2010	Boraginaceae	<i>Symphytum</i>	<i>orientale</i>	Languedoc_Roussillon	France
RF1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	22	6	2006	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>millefolium</i>	Washington	USA
RF10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	NA	7	2006	Asteraceae	<i>Chrysanthemum</i>	<i>sp.</i>	New_South_Wales	Australia
RF2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	23	9	2006	Asteraceae	<i>Antennaria</i>	<i>lanata</i>	Washington	USA
RF3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	19	6	2006	Ranunculaceae	<i>Anemone</i>	<i>drummondii</i>	Washington	USA
RF4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	21	8	2007	Ericaceae	<i>Arctostaphylos</i>	<i>uva-ursi</i>	British_Columbia	Canada
RF5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	29	5	2002	Asteraceae	<i>Eupatorium</i>	<i>maculatum</i>	South_Carolina	USA
RF7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	20	6	2008	Asteraceae	<i>Coreopsis</i>	<i>rosea</i>	British_Columbia	Canada
RF8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	7	2008	Asteraceae	<i>Solidago</i>	<i>canadensis</i>	British_Columbia	Canada

Table S2. Genetic diversity within H1 populations. MLG, multilocus genotype; MLL, multilocus lineage; HWE, Hardy Weinberg disequilibrium; Htz, heterozygote; LD, linkage disequilibrium.

	N	MLGs	MLLs + MLGs	RMLG	RMLL	1-Qinter	HWE	Htzexcess	Htzdeficit	Fis multilocus	LD
unique copies											
K=2											
Kazakhstan	72	72	72	1	1	0,5431	p=0,0241	p=0,8622	p=0,1357	0,0647	1 / 91
Europe-USA	332	332	318	1	0,958	0,6804	p=0	p=1	p=0	0,0498	41 / 91
K=3											
Kazakhstan	72	72	72	1	1	0,5429	p=0,0241	p=0,8622	p=0,1357	0,0647	1 / 91
Europe-California	133	133	127	1	0,955	0,6349	p=0	p=1	p=0	0,0397	23 / 91
USA-UK	184	184	177	1	0,962	0,713	p=0	p=0,997	p=0,0036	0,0284	14 / 91
K=4											
Kazakhstan	72	72	72	1	1	0,5429	p=0,0241	p=0,8622	p=0,1357	0,0647	1 / 91
USA-UK	160	160	158	1	0,987	0,6269	p=0,1165	p=0,9597	p=0,0339	0,0251	6 / 91
California-France	19	19	12	1	0,611	0,5797	p=0,0006	p=0	p=1	-0,2257	24 / 78
Europe-USA	124	124	119	1	0,96	0,7153	p=0	p=1	p=0	0,0473	21 / 91

Table S3. Fst between H1 populations.

K=2	Kazakhstan	Europe-USA		
Kazakhstan		high sign		
Europe-USA	0,129			
K=3	Kazakhstan	USA-UK	Europe-California	
Kazakhstan		high sign	high sign	
USA-UK	0,1464		high sign	
Europe-California	0,1381	0,0399		
K=4	Kazakhstan	USA-UK	California-France	Europe-USA
Kazakhstan		high sign	high sign	high sign
USA-UK	0,1487		high sign	high sign
California-France	0,2168	0,0961		high sign
Europe-USA	0,138	0,0457	0,0667	

Table S4. Genetic diversity within H2 populations for K=16. MLG, multilocus genotype; MLL, multilocus lineage; HWE, Hardy Weinberg disequilibrium; Htz, heterozygote; LD, linkage disequilibrium. In grey, populations comprising too few individuals to be relevant.

	N	MLGs	MLLs + MLGs	RMLG	RMLL	1-Qinter	HWE	Htzexcess	Htzdeficit	Fis multilocus	LD
multicopies											
MLLA	47	8	1	0,152	0		p=0	p=0	p=1	-0,915	0/6
MLLB	25	5	1	0,167	0		p=0	p=0	p=1	-0,959	0/3
MLLC	78	12	1	0,143	0		p=0	p=0	p=1	-0,93	0/21
MLLD	5	4	1	0,75	0		p=0,01	p=0	p=1	-0,654	0/12
MLLE	3	2	1	0,5	0		p=0,731	p=0	p=0,999	-0,622	0/6
MLLF	11	10	1	0,9	0		p=0	p=0	p=1	-0,65	1 sur 21
MLLG	27	9	1	0,308	0		p=0	p=0	p=1	-0,889	0 sur 10
MLLH	4	3	1	0,667	0		p=0,553	p=0	p=1	-0,881	0 sur 1
India	14	11	11	0,769	0,7692		p=0	p=0,999	p=0	0,212	2 sur 78
Algeria-France	2	2	2	1	1		p=0,36	p=1	p=0,037	0,546	-
unique copies											
MLLA	8	8	1	1	0	0.4241	p=0	p=0	p=1	-0,8316	0 sur 6
MLLB	5	5	1	1	0	0.4018	p=0,027	p=0	p=1	-0,8489	0 sur 3
MLLC	12	12	1	1	0	0.4364	p=0	p=0	p=1	-0,7867	0 sur 21
MLLD	4	4	1	1	0	0.3810	p=0,265	p=0	p=0,999	-0,5938	0 sur 6
MLLE	2	2	1	1	0	0.4821	p=1	p=0,052	p=0,974	-0,4815	-
MLLF	10	10	1	1	0	0.3849	p=0	p=0	p=1	-0,6515	0 sur 21
MLLG	9	9	1	1	0	0.4216	p=0	p=0	p=1	-0,8259	0 sur 10
MLLH	3	3	1	1	0	0.3452	p=0,685	p=0	p=1	-0,8621	0 sur 1
India	11	11	11	1	1	0.4821	p=0,007	p=1	p=0	0,2189	0 sur 78
Algeria-France	2	2	2	1	1	0.3929	p=0,36	p=1	p=0,036	0,5455	-

Table S5. Fst between H2 populations for K = 16. In grey, populations comprising too few individuals to be relevant.

multicopies	MLLA	MLLB	MLLC	MLLD	MLLE	MLLF	MLLG	MLLH	India	Algeria-France
MLLA		high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	high sign
MLLB	0.4208		high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	0
MLLC	0.4134	0.3775		high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	high sign	high sign
MLLD	0.5345	0.5415	0.5302		0	high sign	high sign	high sign	high sign	0
MLLE	0.3503	0.3919	0.4019	0.5414		high sign	high sign	0	high sign	0
MLLF	0.4329	0.3898	0.419	0.556	0.4279		high sign	high sign	high sign	0
MLLG	0.3062	0.3934	0.4541	0.5384	0.3506	0.4439		high sign	high sign	high sign
MLLH	0.5008	0.5501	0.5453	0.5699	0.5641	0.5389	0.5457		high sign	0
India	0.4231	0.4518	0.4244	0.3544	0.4008	0.4355	0.4633	0.4124		0
Algeria-France	0.4808	0.5067	0.4843	0.5383	0.4596	0.5675	0.492	0.5899	0.3473	
unique copies										
MLLA		high sign	high sign	high sign	0	high sign	high sign	high sign	high sign	0
MLLB	0.4219		high sign	0	0	high sign	high sign	0	high sign	0
MLLC	0.3915	0.3563		high sign	0	high sign	high sign	high sign	high sign	0
MLLD	0.5344	0.5395	0.5116		0	high sign	high sign	0	high sign	0
MLLE	0.3410	0.3596	0.3690	0.5208		0	high sign	0	0	0,008195
MLLF	0.4384	0.3945	0.4064	0.5557	0.4189		high sign	high sign	high sign	0
MLLG	0.2809	0.3812	0.4217	0.5205	0.3290	0.4320		high sign	high sign	0
MLLH	0.5083	0.5604	0.5320	0.5663	0.5565	0.5457	0.5355		high sign	0
India	0.3972	0.4160	0.3824	0.3367	0.3628	0.4357	0.4243	0.3976		0
Algeria-France	0.4827	0.5042	0.4635	0.5239	0.4096	0.5725	0.4785	0.5831	0.3299	

Annexe Chapitre 3

Methodologie T-RFLP et PCR spécifiques des bactéries endosymbiotiques secondaires.

- Extraction d'ADN, amplification aspécifique et T-RFLP

L'ADN génomique total est extrait à partir d'un individu unique grâce au kit d'extraction Bio Basics (Bio Basic Inc., Ontario, Canada) en plaques 96 puits dans 50 µl de tampon d'extraction, ou grâce aux billes d'extraction Chelex[®] 100 à 10 % (w/v) en solution (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) en plaque 96 puits (voir Piffaretti et al. (2012) pour les détails Chap1, article n°1). Tous les échantillons d'adn sont conservés à – 20°C.

Un fragment du 16S bactérien est amplifié de manière aspécifique grâce aux amorces universelles 16SB1 et Y2mod* (seq et ref). Un volume réactionnel de 25µl est préparé, contenant 3 µl d'adn extrait, les amorces forward et reverse à 0.2 µM, 12,5µl de tampon multiplex contenant la Taq Multiplex à cc, qsp H2O. Les PCR se font dans des thermocycleurs Eppendorf comme suit : dénaturation initiale à 95°C pendant 15 min, suivie par 37 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30s, hybridation à 55°C pendant 90s et élongation à 72°C pendant 60s, puis une élongation finale à 60°C pendant 30 min.

Nous digérons ensuite 10 µl de produit de PCR dans un mix de digestion contenant 2µl de tampon Neb4, 2 µl d'enzyme Bfal (à 2 U), 1 µl d'enzyme TaqI (à 2 U) et 5 µl H2O, le tout est incubé à 37°C pendant 3h, puis à 60°C pendant 2h. Une seconde digestion se fait à partir de 10 µl de produit de PCR dans un mix de digestion contenant 2µl de tampon Neb4, 2 µl d'enzyme AluI (à 2 U), et 6 µl H2O, le tout est incubé à 37°C pendant 3h, puis à 60°C pendant 2h.

- Lecture des profils

Deux microlitres de produit de digestion sont ajoutés à 15 µl de Formamide et 0.2 µl de marqueur de taille Liz500. Les mix sont analysés sur un séquenceur à capillaires ABI par la plateforme SeqGen (CeMEB Labex, Montpellier, France). La lecture de la taille et l'identification des fragments est effectuée avec GENEMAPPER v4.0 (Applied Biosystems), les résultats générés par le logiciel sont revérifiés à l'œil.

○ PCR spécifique

Organism	Gene	Gene product	Primer (5' - 3')	Annealing temperature	Size	Reference
<i>Wolbachia pipientis</i>	<i>wsp</i> 16S 16S	Surface protein	81F – TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC 691R – AAAAATTAACGCTACTCCA W-Specf CATACTATCGAAGGGATAG W-specr AGCTTCGAGTAAACCAAT wolpuc_16SF ATTGCTATTAKATGAGCCTATATTAG wolpuc_16SR TGCTGATCCACGATTACTAGCGA	50°C	602bp 438bp	Zhou et al. (1998) Werren & Windsor (2000) défini d'après séquences déposées par Augustinos et al, 2011
<i>Arsenophonus spp.</i>	<i>ftsK</i>	Cell division protein (DNA translocase)	ftsKf – GTTGYATGGTYGATGAATTTGC ftsKr – GCTCTTCATCACYATCAWAACC	52°C	445bp	Duron et al. (2010)
<i>Rickettsia spp.</i>	<i>gltA</i>	Citrate synthase	RICS741F – CATCCGGAGCTAATGGTTTTGC RCIT1197R – CATTCTTTCCATTGTGCCATC	50°C	470bp	Davis et al. (1998)
<i>Serratia symbiotica</i>	16S		16SA1 AGAGGTTGATCMTGGCTCAG PASScmp GCAATGTCTTATTAACACAT	55°C	480pb	Tsuchida et al., (2002)
<i>Regiella insecticola</i>	16S		U99F - ATCGGGGAGTAGCTTGCTAC 16SB4 - CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA	52°C	200 pb	Tsuchida et al., (2002)
<i>Hamiltoniella defensa</i>	16S		16ShdF - AGCGCAGTTTACTGAGTTCA 16SB1 - TACGGYTACCTTGTTACGACTT	50°C	1500pb	Darby (2001) Tsuchida et al., (2002)

Annexe Supplementary data article n°4

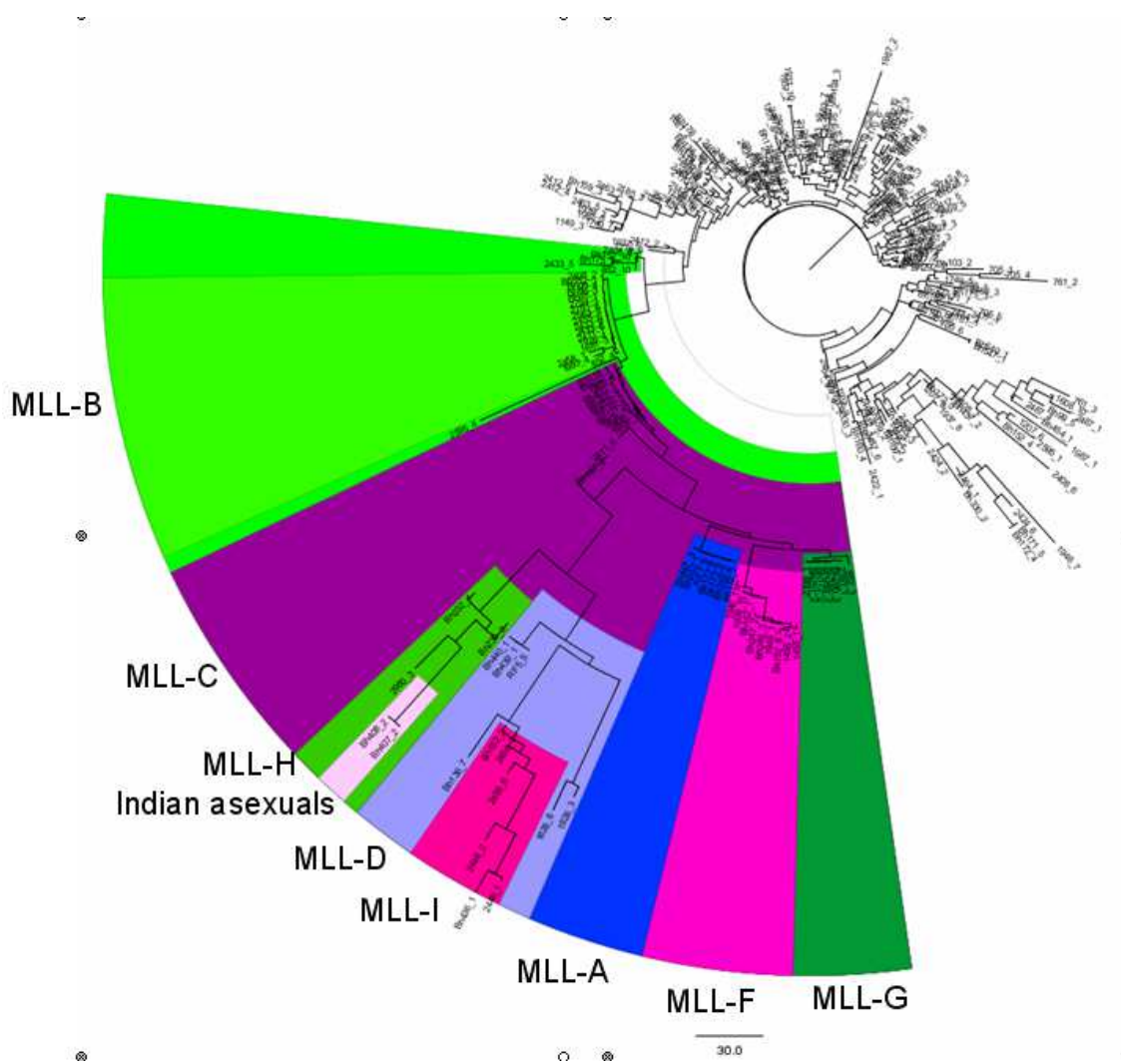


Figure S1. Phylogenetic reconstructions based on microstaellites data giving relationship between *B. helichrysi* H1 et *B. helichrysi* H2. The topology is the one inferred by Neighbour Joining using the Goldstein distance matrix. In yellow: H1.

Table S1. PCR details.

gene	name	primers Forward/Reverse (5' - 3')	size (bp)	initial denaturation of cycles	number of cycles	denaturation	hybridization	elongation	final elongation	references
cytochrome oxidase subunit I	COI	LepF ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG LepR TAAACTTCTGGATGTCACAAAATCA	658	94°C, 4 min	40	94°C, 30s	48°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	(Sheffield <i>et al.</i> , 2009)
	CytB	CP1 GATGATGAAATTTGGATC CB2 ATTACACCTCCTAAATTTATTAGGAAT CytBhelicF ATCCTAACAGGATATTTTTAGCTT CytBhelicR TGAGAAATCCTCCTCAGATTCAA	750 375	94°C, 4 min 94°C, 4 min	30 30	94°C, 30s 94°C, 30s	48°C, 1 min 48°C, 1 min	72°C, 1 min 72°C, 1 min	72°C, 5 min 72°C, 5 min	(Harry <i>et al.</i> , 1998) (Jermin & Crozier 1994) piffaretti <i>et al.</i> this paper
para-type gene encoding the IIS2-S6 region	Aph	aph13 GATTGAATCAATGCGGACTGCTTAC Aph15 ACTCAGCAACAACGCCAAGAAAAG AphelicF TGTAATGGGAATAACACATGGAG AphelicR TTATAACACTGTAGTAGCTGGT	770	94°C, 4 min	40	94°C, 30s	54°C, 30 s	72°C, 1 min	72°C, 5 min	(Carletto <i>et al.</i> , 2009)
	sdna	sbf CGAACWTCVGGATCTTGWG dnaB-R ATCCCATTTGTCATTATCTAACAT	600	94°C, 4 min	30	94°C, 30s	52°C, 30 s	72°C, 1 min	72°C, 5 min	(Jousselin <i>et al.</i> , 2009)
MethionineE	MetE	MethelF CAGCATAAAGTCTYCCCATATA MethelR GCCAYAGTGTATTCAAT	480	94°C, 4 min	40	94°C, 30s	55°C, 1 min	72°C, 2 min	72°C, 5 min	(Jousselin <i>et al.</i> , 2009)
	TrpB	Trpbel_F GCATGAAATTAATGGGTGCAG Trpbel_R ATCCTGCTGAAATKGCACAA	450	94°C, 4 min	40	94°C, 30s	55°C, 1 min	72°C, 2 min	72°C, 5 min	(Jousselin <i>et al.</i> , 2009)
LeucineC	pLeuC	Leu3F ACWATGGATCATAAATGTWTC Leu5R GCAGMTCITARATCTTCTAT	850	94°C, 4 min	40	94°C, 30s	45°C, 30 s	72°C, 1,25 min	72°C, 5 min	piffaretti <i>et al.</i> this paper

Abstract

Brachycaudus helichrysi is a worldwide polyphagous aphid pest that seriously damages its primary hosts (*Prunus* spp.) and the various cultivated plants among its secondary hosts (e.g. sunflower, chrysanthemums).

In a phylogeographic study based on a worldwide sampling, I have shown that this species is actually an amalgamation of two sibling taxa called *B. helichrysi* H1 and *B. helichrysi* H2. This study based on mitochondrial, nuclear and *Buchnera aphidicola* (the primary symbiont of aphids) DNA markers revealed that these two taxa display levels of genetic divergence as great as those generally found between sister species in the *Brachycaudus* genus, suggesting that they actually correspond to two distinct sibling species. As these two species are morphologically indistinguishable, we developed a PCR-RFLP test to genetically discriminate them.

Further investigations, based on microsatellites data combined with ecological information suggest that these two species have two very different evolutionary histories. *Brachycaudus helichrysi* H1 exhibits a typical signature of cyclical parthenogenesis, using plum trees during the sexual phase, and we demonstrate the existence of distinct geographic genetic clusters within this species. By contrast *B. helichrysi* H2 comprises two types of lineages. First, it gathers several persistent obligate clonal lineages distributed worldwide (i.e. superclones) and highly polyphagous, and second, we reveal the existence of a cyclical parthenogenetic H2 lineage that uses peach trees as primary hosts and has so far only been found in India. All *B. helichrysi* lineages of H1 and H2 co-occurred in mixed colonies on herbaceous hosts all around the world.

This study will shed light on how life cycle evolution, especially the loss of sexual reproduction, could explain the ongoing speciation process in the *B. helichrysi* species complex.

Key-words: life cycle; reproductive mode; speciation; superclones; host-plant association; aphids

Résumé

Brachycaudus helichrysi est un puceron ravageur des cultures qui inflige de sérieux dégâts à ses hôtes primaires (arbres fruitiers du genre *Prunus*) ainsi qu'à plusieurs herbacées cultivées correspondant à ses hôtes secondaires (par exemple les tournesols et les chrysanthèmes).

L'étude phylogéographique de l'espèce basée sur un échantillonnage mondial, montre que *B. helichrysi* rassemble deux taxa appelés *B. helichrysi* H1 et H2. Cette étude, basée sur plusieurs marqueurs génétiques (mitochondriaux, nucléaire et bactériens), révèle une divergence génétique de l'ordre de celle observée entre espèce du genre *Brachycaudus*. Ceci suggère que *B. helichrysi* H1 et H2 sont deux espèces sœurs. Comme H1 et H2 sont morphologiquement indistinguables, nous avons mis au point un test de discrimination génétique par PCR-RFLP.

L'analyse des génotypes (14 loci microsatellites) combinés aux données écologiques suggère que ces deux espèces sœurs ont des histoires évolutives différentes. Le cycle de vie de *B. helichrysi* H1 correspondrait à la parthénogenèse cyclique, utilisant les pruniers comme hôte primaire. Nous avons montré qu'il existe chez H1 des clusters génétiques structurés géographiquement. Au contraire, *B. helichrysi* H2 rassemble principalement des lignées clonales polyphages, persistantes et largement distribuées dans le monde (i.e. superclones), ainsi qu'une lignée sexuée, probablement hétéroécique, qui a été trouvée sur pêchers en Inde. Les individus des deux espèces colonisent fréquemment une même plante herbacée, composant ainsi des colonies « mixtes ».

Cette étude apportera un éclairage sur comment l'évolution des cycles de vie, en particulier la perte de la reproduction sexuée, a pu jouer un rôle dans les processus de spéciation au sein du complexe *B. helichrysi*.

Mots clés : cycle de vie ; mode de reproduction ; speciation ; superclones ; association de plantes hôtes ; pucerons