



Influence de la plante hôte sur les performances sexuelles des mâles et conséquences sur le potentiel reproductif des femelles phytophages

Karen Muller

► To cite this version:

Karen Muller. Influence de la plante hôte sur les performances sexuelles des mâles et conséquences sur le potentiel reproductif des femelles phytophages. Biologie de la reproduction. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS021 . tel-01484286

HAL Id: tel-01484286

<https://theses.hal.science/tel-01484286>

Submitted on 7 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT

DISCIPLINE : SCIENCES DE LA VIE

SPÉCIALITÉ : ÉCOLOGIE ET ÉVOLUTION

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

INFLUENCE DE LA PLANTE HÔTE SUR LES PERFORMANCES
SEXUELLES DES MÂLES ET CONSÉQUENCES SUR LE POTENTIEL
REPRODUCTIF DES FEMELLES PHYTOPHAGES

KAREN MULLER

Soutenue publiquement le 13/05/2016

Jury

Loïc Bollache, Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
Marlène Goubault, Maître de Conférences, Université de Tours	Rapporteur
Marie-Jeanne Holveck, Chargée de recherche FNRS, Louvain (Belgique)	Examineur
Jérôme Moreau, Maître de Conférences, Université de Bourgogne	Directeur
Denis Poinot, Maître de Conférences, Université de Rennes	Examineur
Christophe Thébaud, Professeur, Université de Toulouse	Rapporteur
Denis Thiéry, Directeur de recherches INRA, Bordeaux	Co-Directeur
Joan Van Baaren, Professeur, Université de Rennes	Rapporteur

REMERCIEMENTS

Terminer sa thèse, c'est un peu comme accoucher... Ca peut être long, difficile et épuisant, mais on finit par oublier la douleur pour ne garder que le meilleur... Ainsi, par une nuit froide et pluvieuse proche de l'automne, naquit Thèse (et non pas Thérèse), un beau bébé d'un peu moins de 300 pages. J'espère que vous trouverez « *qu'elle me ressemble* », même si elle ne se décline pas en douze Chapitres.

Accoucher d'une thèse fut pour moi une longue aventure, certes personnelle mais certainement pas solitaire. Je vais tenter de remercier toutes les personnes qui m'ont suivie, soutenue et aidée au cours de cette « grossesse doctorale », depuis sa création jusqu'à son éclosion finale. Il n'est possible d'enfanter une thèse que si des sages-femmes et des sages-hommes sont présents tout au long de la grossesse, autant dans les moments délicieux des premiers coups de pieds et des échographies que dans les périodes plus difficiles, animées de contractions, de nausées, de risques d'avortement et d'épisiotomie... Que votre soutien ait été scientifique, logistique, pédagogique, ou de toute autre forme en hic, vous avez chacun contribué au bon développement embryonnaire de cette thèse. J'espère parvenir, à travers ces quelques pages de remerciements, à exprimer tout la reconnaissance que je porte à chacun d'entre vous.

Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans un environnement de travail chaleureux. Merci donc au Professeur Pascal Neige, directeur du laboratoire Biogéosciences pour son accueil et sa gentillesse. Je remercie également Alain Bonin, président de l'Université de Bourgogne, et son lointain prédécesseur, le recteur Marcel Bouchard, à l'origine de la création du bâtiment Gabriel, inauguré en 1947 et qui depuis, n'a pas pris une ride. Le bureau 314c que j'occupe depuis maintenant plus de trois ans est un environnement de travail idéal, spacieux et riche en diversité (je pense notamment aux cimetières d'insectes et surtout de mouches qui donnent du cachet aux fenêtres). Convoité par certain(e)s, occupé par d'autres, ce bureau a vu défiler de nombreuses personnes et j'espère qu'il restera un lieu animé où il fait bon travailler !

Un grand merci aux 5 chercheurs scientifiques qui m'ont fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Je voudrais d'abord remercier les deux rapporteurs de mon travail qui ont certainement consacré beaucoup de temps et d'énergie à la lecture de mon manuscrit et à l'élaboration de critiques constructives. Merci donc à Joan Van Baaren, Professeur à l'Université de Rennes, et à Christophe Thébaud, Professeur à l'Université de Toulouse. Merci également à Loïc Bollache, Professeur à l'Université de Bourgogne, à Marlène Goubault, Maître de Conférences à l'Université de Tours et à Marie-Jeanne Holveck, Chargée de Recherche, à l'Université de Louvain pour avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont fait partie de mon comité de thèse, François-Xavier Dechaume Moncharmont, Emmanuel Desouhant, Yannick Moret et Thierry Rigaud pour leurs conseils avisés. J'en profite ici pour remercier Yannick pour l'accueil au sein de l'équipe « Écologie Évolutive » (et non pas « Éclopés Évolutifs »), Thierry, pour avoir accepté chaque année ma réinscription en doctorat (grâce aux supers pouvoirs conférés par ta casquette de Directeur de l'école doctorale « Environnements-Santé ») et FX pour nos discussions animées sur l'*assortative mating* et pour ta précieuse aide statistique.

Évidemment, je voudrais remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse, Jérôme et Denis, en commençant par mon Maître, qui me supporte depuis 4 ans déjà. Même si tu m'as un peu mis la pression avec ces remerciements, j'espère réussir à exprimer toute la gratitude que je te porte par ces quelques poignées de mots. Maître, c'est une fine appellation, dont l'origine étymologique latine *magister* signifie « celui qui commande ou dirige, maître qui enseigne ». Tu incarnes plutôt la seconde partie de cette description, j'ai appris énormément de choses avec toi ces trois dernières années, que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain. Mais avant de commencer mes élucubrations, je te propose une petite gymnastique des neurones pour t'échauffer un peu : M. et Mme Zeublouze ont une fille... Je suis sûre que tu as trouvé la réponse en une fraction de seconde, et tu as donc un aperçu de mon ressenti en cette fin de rédaction de thèse... Je voudrais particulièrement te remercier pour ton « côté humain » (une qualité qui, de nos jours, se fait de plus en plus rare) et plus qu'un super Directeur, tu as été un soutien moral sans faille tout au long de ma thèse. Nous avons énormément interagi scientifiquement, que ce soit pour élaborer des protocoles, pour ramasser des chenilles pliées en quatre dans les vignes, pour observer des accouplements de papillons dans le noir pendant des heures les week-ends, pour discuter des résultats ou encore pour écrire des papiers. Nous avons également partagé de nombreux moments un peu moins scientifiques, mais tout autant stimulants intellectuellement, lors des soirées passées à se poser des énigmes, à résoudre celles de Sherlock (avec l'aide de trois autres Watson, Cécile, Karine et Manu) ou à regarder des matchs de rugby. Merci aussi pour tes blagues très fines, qui furent parfois exaspérantes mais qui, il faut bien l'avouer, m'ont souvent bien fait rire ! Merci pour ton investissement, tes conseils avisés, ton soutien omniprésent, nos longues discussions par sms, ton humour berrichon, ton écoute, ta gentillesse, et pour avoir toujours cru en moi. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble le plus longtemps possible !

Denis, en raison d'un éloignement physique un peu plus important, nous avons partagé moins de moments ensemble mais tu as tout de même largement contribué au bon déroulement de cette thèse. J'ai énormément apprécié la petite semaine passée à Bordeaux (quand j'étais handicapée du poignet) pendant laquelle j'ai pu voir à quel point tu bouillonnais d'idées de manip'. Tu as toujours été enthousiasmé par ce projet et ton aide pour la rédaction des papiers a été précieuse. Merci également pour tout ce que tu as pu m'apprendre sur la biologie des vers de la grappe, tu es un véritable expert de ces petits ravageurs ! J'en profite aussi pour remercier Lionel pour la super gestion de l'élevage d'Eudémis, et bien sûr Marc-Etienne, qui a apporté un peu de stochasticité dans l'organisation des plannings de manip's.

Merci également à toutes les personnes qui ont logistiquement contribué au bon déroulement de cette thèse, je pense tout d'abord aux secrétaires, Isabelle et Monique, pour la gestion des financements et à Nicole, toujours présente avant tout le monde dans l'Aile Nord le matin. Pour le soutien technique, merci à Séb, Maria et Aude. Séb, ton efficacité sur le terrain m'impressionnera toujours, toi qui remplis les bacs de glomérules plus vite que ton ombre. Merci également pour tes supers dispositifs expérimentaux et pour l'installation de la « Porn Zone ». Enfin, merci de m'avoir fait découvrir la plongée, c'était une superbe expérience ! Maria, merci pour ton aide technique, faire de la « bioch' qui tâche » à deux, c'est plus marrant que tout seul ! Aude, merci pour les heures passées à trier des chenilles dans des grappes plus ou moins fermentées, ce n'est pas toujours plaisant de remuer des moisissures !

Merci à tous les stagiaires que j'ai pu encadrer au cours de ces trois années, je vais essayer de n'oublier personne : Alexandre, Bérénice, Caroline, Charlène, Déborah, Jordane, Laura, Marie-Line, Manon, Mathilde, Maxime, Nina, Simon, Steven, Sarah, Soline, Sophie. Laura, rayon de soleil Perpignanaise, merci pour ta bonne humeur et pour le super travail que tu as fait. Merci également à Sophie, pour les nombreuses heures passées à regarder des femelles en position d'appel, j'espère que ton stage de M2 en Australie va faire de toi une experte en compétition spermatique ! Merci également à Fanny, pour qui j'ai été la stagiaire pendant mon M2, je garde de nombreux souvenirs de toi (Tizi-Ouzou power, « elle vomit »).

Je souhaite également remercier mes collègues et avant tout amis, avec qui nous avons partagé de nombreux supers moments au labo et surtout hors du labo. Je remercie donc toute l'aile Nord du 3^{ème} étage du bâtiment Gabriel, et notamment ceux qui sont passés par le bout du couloir. Chronologiquement parlant, merci à Fanny, Caroline, Lucile, Matthias, Aurélie, Manu, Sophie, Julien et Chloé qui ont occupé ou occupent actuellement le bureau 314c. Merci également à nos voisins directs, Émilie, Juliette, Adrien, Cédric, Paul-Yannick, Pauline, Aurore, Karine, Cécile et Philippe (le seul titulaire du « bout du couloir des précaires »).

Merci Cécile pour la virée à Prague, ce voyage restera mon meilleur colloque, je garde de nombreux souvenirs de cette escapade dans la ville pavée des amoureux. Je tiens à te remercier pour ton amitié et pour toutes les choses que nous avons pu partager ensemble, la Fine Heure, les soirées jeux, les cinés, le badminton (même si tu n'es pas un partenaire très fiable !), la piscine, les marchés bios, le théâtre, la virée en kayak, la fête des Lumières, les concerts et les festivals et surtout pour toutes ces bonnes bières dégustées aux BerThoms, au Barbarian's, au Flan', à l'Antre II ou dans la Péniche... J'ai une petite requête pour toi : peux-tu s'il te plaît nous donner à haute voix le nombre de lignes de ce paragraphe ? :)

Merci Manu pour les multiples pauses cafés que nous avons prises ensemble à toute heure et qui parfois ont duré bien longtemps ! Merci d'avoir été quelques mois un partenaire cette fois-ci fiable de badminton, j'espère que tu vas te réparer, j'aimais bien notre duo compétitif ! Merci aussi pour les courses à pied et pour plus récemment les quelques « cardio killer » qui nous ont bien épuisés ! Après l'effort, le réconfort, ce fut donc un plaisir de partager de bons French Burgers avec toi !

Merci Émilie, nous avons partagé de nombreuses heures à dépenser des calories ensemble, parfois dans la douleur ! Merci également pour tes sublimes recettes de pâtisserie et pour les repas quasiment gastronomiques que tu nous as concocté !

Merci également à ceux avec qui j'ai pu faire de nombreuses randonnées, véritables bouffées d'oxygène dans cette thèse. Je pense notamment à Cécile et Aurélie pour notre semaine itinérante dans le Jura, à Pierre, pour le magistral Félix Batier, qui fut de loin la randonnée la plus difficile (surtout en dormant dans une tente posée sur un sol en pente), à Cécile, Manu et Émilie pour les nombreuses autres randonnées ou balades, parsemées de géo-caches et à Thomas pour la découverte des montagnes Grenobloises. L'année prochaine, on fait tous le GR 20 ! Puisqu'on parle de sport, je voudrais aussi remercier Sandra, prof au Suaps, qui nous fait souffrir chaque mardi midi en gym d'entretien (une petite pensée pour les cuisses de Juliette, Émilie, Maria et Cécile qui je suis sûre, compatissent à ces propos).

Merci pour toutes les soirées passées à jouer, au Dé masqué (avec la secte ovésienne), chez Jérôme ou même dans l'herbe à la fac pendant la pause de midi. Merci Cédric pour tous les Loup-Garous à la Comédie, qui m'ont fait rencontrer plein de personnes sympathiques. Merci à Pauline de nous avoir fait découvrir les règles du cul de chouette. Merci à mes partenaires de mots-fléchés, Thomas, Cécile et Manu, ces moments d'intense réflexion sont à mon avis très bénéfiques à notre entretien cérébral ! Merci aussi à vous trois pour les dernières relectures de la thèse, promis la prochaine tournée est pour moi !

Merci à mes « taxis », Cécile, Manu, Émilie et Sophie qui m'ont trimballée en rando, au Noz, à la piscine ou à la salle de sport, bref, là où la trottinette seule ne suffisait pas !

Passons maintenant par la Lorraine, merci à tous mes copains meusiens, je ne vais pas tous les citer mais je pense surtout aux Pep's (Roro, Mathieu, Tssoune, Vincent et Thib). On ne se voit certes pas souvent mais à chaque fois, on passe de superbes soirées ! Merci également à « l'autre bande » du lycée, avec qui nous fêtons chaque année Noël ! Je pense surtout à Caro, Flav', Yo, Hélène, Marine, Cécilia, Quentin et Gauthier. Merci également à Pierre pour les quelques récits mythologiques et pour les moments rares mais sympathiques que nous avons passés ensemble ces dernières années. Je remercie aussi mes « femmes », Maria et Fanny qui acceptent encore de me voir une fois par an, malgré le peu de nouvelles que je leur donne ! C'est toujours sympa de se raconter les derniers potins dans des bains bouillonnants. Enfin merci à Thomas, qui a été plus ou moins présent ces trois dernières années, qui a un peu été stagiaire à ses heures perdues, et qui a incarné le rôle de correcteur orthographique de cette thèse. Merci pour cette aide et merci pour tout le reste...

Je tiens également à remercier ma famille et d'abord celle que j'ai adoptée à Dijon. Je pense bien sûr à tous les monstres poilus à 4 pattes qui se sont succédés et qui ont largement animé ma grossesse doctorale, certains sans doute jaloux du bébé qui grandissait en moi et occupait par moments un peu trop mon attention. Merci, mes Croûûû's, Nounou, et le léopard récemment adopté, Litchi... Puisqu'on parle d'animaux, une petite pensée pour les milliers de papillons sacrifiés « pour la science », qui ont quand même eu une vie plutôt sympathique, vivant d'amour et d'eau fraîche au sous-sol dans des tubes en verre.

Enfin, un grand merci à ma famille, mes deux grands-mères, mes nombreux oncles, tantes et cousins, cousines des deux côtés, les repas de famille sont toujours épiques. Et bien sûr merci à mes parents et à mon frère pour leur soutien infaillible pendant cette thèse. Merci à toi Jojo, même si on ne se voit pas souvent, tu es un super petit frère ;) . J'espère qu'on aura l'occasion de refaire de l'escalade ensemble ! Merci pour les longues discussions téléphoniques avec toi, Maman (dans le bain, pendant mes trajets piétons qu'il fallait occuper, un peu partout en fait). Merci Papa, pour les quelques fois où tu es venu me voir à Dijon (je me souviendrai notamment d'une séance de cinéma où nous étions seuls dans la grande salle du Darcy). Vous êtes des parents géniaux, aucun enfant ne pourrait rêver mieux ! Merci pour tout ce que vous m'avez apporté et que vous continuez à m'apporter chaque jour ! Merci pour les séjours au ski les années passées, la Pologne c'était vraiment chouette ! Merci également pour tous les concerts et les festivals (on se souviendra de l'Oeno Music 2015 et du long retour depuis le Zénith à 4 heures du mat'). Et pour finir, le plus important, merci pour votre amour (ça mérite bien de se mettre un petit coup « la 14 »).

RÉSUMÉ

L'abondance des insectes phytophages est déterminée par l'influence de facteurs biotiques et abiotiques qui affectent leurs traits d'histoire de vie. Chez les espèces phytophages à reproduction sur capital, la qualité de la plante hôte sur laquelle les individus effectuent leur développement larvaire est un facteur critique affectant le succès reproducteur des adultes. Curieusement, si l'effet de la plante hôte sur le potentiel reproductif des femelles a été largement décrit, il n'a été que peu étudié sur celui des mâles. Par ailleurs, chez les lépidoptères, lors de l'accouplement, la femelle reçoit du mâle un cadeau nuptial sous la forme d'un spermatophore contenant des spermatozoïdes ainsi que des sécrétions produites par les glandes accessoires. Ces sécrétions constituent des bénéfices directs pour la femelle qui pourra les remobiliser pour augmenter sa fécondité. Mon projet de thèse vise à déterminer l'influence de la plante hôte sur les performances reproductives des mâles et d'en évaluer les conséquences sur le potentiel reproductif des femelles et sur l'évolution des stratégies de choix de partenaire chez un papillon ravageur de la vigne, l'Eudémis (*Lobesia botrana*).

Les expériences menées au cours de ces trois années de thèse révèlent que la nutrition larvaire sur différents cépages de vigne module fortement les réserves énergétiques des mâles, affectant leur potentiel reproductif à travers la taille et le contenu des spermatophores qu'ils transfèrent aux femelles pendant l'accouplement. De plus, l'investissement du mâle dans la production de spermatophores décline au cours d'accouplements successifs, les mâles n'étant capables de produire qu'un seul spermatophore riche en nutriments au cours de leur vie. Ces deux facteurs (nutrition larvaire et expérience sexuelle), qui affectent fortement la qualité reproductive des mâles, ont d'importantes conséquences sur le potentiel reproductif de leur partenaire. En effet, les femelles recevant des spermatophores riches en nutriments et en spermatozoïdes ont plus de descendants que celles recevant des spermatophores de moins bonne qualité. Enfin, les femelles semblent capables de discriminer parmi les mâles en se basant sur des critères reflétant leur qualité reproductive, s'accouplant préférentiellement avec ceux leur procurant le plus de bénéfices directs.

Ainsi, les résultats de cette thèse confirment l'importance d'intégrer l'effet mâle quand on s'intéresse à l'évolution des populations de phytophages. De plus, identifier les facteurs écologiques modulant les interactions entre les partenaires sexuels chez les espèces menaçant les cultures est crucial pour pouvoir optimiser les programmes de gestion de ces ravageurs.

Mots-clés : bénéfices directs, comportements précopulatoires, interactions plantes-insectes, *Lobesia botrana*, qualité du mâle, nutrition larvaire, succès reproducteur, spermatophore.

ABSTRACT

The abundance of phytophagous insects is determined by numerous interacting biotic and abiotic factors. In capital-breeding phytophagous insects, larval host plant quality is a key determinant of the adult phenotype and the performance of both males and females. Curiously, if the effect of host plant quality on female reproductive success is well-established, little effort has been conducted to determine this effect on male reproductive success. Moreover, in Lepidoptera, males transfer to females a spermatophore containing sperm and accessory gland products rich in nutrients that could be reinvested into female reproduction. The aim of this thesis was to evaluate how male larval nutrition on different host cultivars affects male reproductive traits which could, in turn, influence female reproductive output and mate choice strategies in an important grapevine pest, the European grapevine moth (*Lobesia botrana*).

During these three years, we found that the host cultivar for the larvae strongly influences the energy reserves of male adult moths, affecting ultimately their reproductive potential through the size and content of spermatophores they transfer to females at mating. Moreover, male investment in the spermatophore declines over consecutive matings, suggesting that spermatophores are energetically expensive to produce in this monandrous capital breeding species. Thus ‘male quality’ depends on both the male larval origin and mating history, and females receiving protein-rich spermatophores at mating have an overall greater reproductive output than females mated with poor quality males producing less nutritionally rich spermatophores. Finally, females are able to discriminate among males and mate more with males having high sperm quality (virgin males or males from specific cultivars or geographical origins) to obtain substantial direct benefits.

The results of this thesis confirm the importance of considering the “male effect” when trying to understand the evolution of phytophagous populations. Moreover, identifying the ecological conditions that influence the mating success of male and female in crop-pest species may lead to a better management of these crop pests.

Key-words: direct benefits, insect-plant interactions, *Lobesia botrana*, larval nutrition, male quality, mating success, precopulatory behaviors, spermatophore.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	1
LISTE DES TABLEAUX.....	3
LISTE DES ANNEXES.....	3
 CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	5
Avant-propos.....	7
1. Insectes phytophages et ravageurs de culture.....	8
1.1. Évolution des méthodes de lutte contre les ravageurs.....	8
1.2. La protection intégrée : quels outils et quels moyens ?.....	9
1.3. Rôle des mâles dans les dynamiques évolutives de populations phytophages.....	10
2. Importance des mâles dans les interactions plantes-insectes.....	13
2.1. Stratégies de reproduction chez les insectes : une histoire de sexe.....	13
2.2. Le mâle en tant que partenaire sexuel : bénéfices directs pour les femelles.....	14
2.2.1.« <i>It takes two to tango</i> » : Effet de la « qualité » du partenaire sexuel.....	14
2.2.2.Capacité d'insémination des mâles et évolution de la polyandrie.....	15
2.2.3.Apports nutritifs par les cadeaux nuptiaux.....	16
2.3. Succès reproducteur des mâles : un investissement condition-dépendant.....	19
2.4. Un facteur clé du succès reproducteur des phytophages : la plante hôte.....	23
2.5. Choix de partenaire modulé par le contexte écologique.....	26
3. Principaux objectifs de la thèse.....	28
 CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES GÉNÉRALES.....	31
1. Modèles biologiques.....	33
1.1. Caractéristiques générales	33
1.1.1. La vigne (<i>Vitis vinifera</i>).....	33
1.1.2.L'Eudémis (<i>Lobesia botrana</i>).....	34
1.2. Modes de reproduction chez Eudémis.....	37
1.3. Eudémis : un modèle idéal pour étudier les relations plantes-insectes.....	40
2. Procédure générale.....	42
2.1. Conditions d'élevage en laboratoire.....	42
2.2. Collecte en populations naturelles.....	43
2.3. Suivi des accouplements et mesures du potentiel reproductif.....	44
2.3.1. Analyse des comportements précopulatoires.....	45
2.3.2. Investissement du mâle – Quantité et qualité du spermatophore.....	47
a. Mesure du volume du spermatophore.....	47
b. Comptage des spermatozoïdes.....	47
c. Mesure du contenu en protéines du spermatophore.....	48

2.3.3. Conséquences sur le potentiel reproductif des femelles.....	49
2.4. Mesures énergétiques des mâles.....	49
2.4.1. Préparation des échantillons.....	49
2.4.2. Quantification des protéines.....	50
2.4.3. Quantification des lipides.....	51
2.4.4. Quantification du glycogène.....	51

CHAPITRE III : INFLUENCE DE L'EXPÉRIENCE SEXUELLE DU MÂLE SUR LE POTENTIEL REPRODUCTIF DES FEMELLES.....53

<u>Manuscrit 1</u> : Direct benefits from choosing a virgin male in the European grapevine moth (<i>Lobesia botrana</i>).....	57
--	----

CHAPITRE IV : EFFET DU CÉPAGE DE VIGNE SUR LA QUALITÉ DES MÂLES ET RÉPERCUSSIONS SUR LE POTENTIEL REPRODUCTIF DES FEMELLES.....83

1. Effet du cépage de vigne sur le premier accouplement du mâle.....	86
--	----

<u>Manuscrit 2</u> : Muller K, Thiéry D, Moret Y & Moreau J (2015). Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth (<i>Lobesia botrana</i>). <i>Behavioral Ecology and Sociobiology</i> , 69 :39-47.....	89
--	----

2. Effet du cépage de vigne sur les ressources énergétiques des mâles.....	101
--	-----

<u>Manuscrit 3</u> : Linking male energy reserves and reproductive output in a polyphagous moth.....	103
---	-----

3. Qu'est-ce qu'un mâle de qualité en tant que partenaire sexuel ?.....	129
---	-----

<u>Manuscrit 4</u> : What makes a good mate? Factors influencing male and female reproductive success in a polyphagous moth.....	131
---	-----

4. Évolution du choix de partenaire chez les mâles	161
--	-----

4.1. Matériel & Méthodes	162
--------------------------------	-----

4.2. Résultats et Discussion	162
------------------------------------	-----

5. Bilan global du Chapitre IV.....	165
-------------------------------------	-----

CHAPITRE V : PATRONS D'APPARIEMENT ENTRE INDIVIDUS PROVENANT DE DIFFÉRENTS CÉPAGES ET DE DIFFÉRENTS SITES GÉOGRAPHIQUES.....169

<u>Manuscrit 5</u> : Mating patterns of the European grapevine moth (<i>Lobesia botrana</i>) in sympatric and allopatric populations.....	175
--	-----

CHAPITRE VI : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	203
1. Rôle du mâle chez les espèces phytophages.....	206
1.1. Le spermatophore : un paquet riche en bénéfices pour la femelle.....	206
1.2. Le spermatophore : un large investissement condition-dépendant modulé par le cépage de vigne.....	207
1.3. Bénéfices directs et choix de partenaire.....	214
1.4. Stratégies de reproduction et isolement reproductif.....	221
1.5. Intégration du 3 ^{ème} niveau trophique – Compromis reproduction/immunité.....	223
1.6. Bilan sur l’aspect fondamental de cette thèse.....	224
2. Importance du mâle dans les programmes de lutte contre les ravageurs, un exemple : L’Eudémis.....	225
2.1. Inclure le compartiment mâle dans les modèles théoriques.....	226
2.2. Inclure le compartiment mâle dans les études empiriques.....	228
2.2.1. Confusion sexuelle.....	228
2.2.2. Lutte autocide et stérilité héritée.....	229
2.2.3. Lutte biologique et utilisation conjointe de plusieurs méthodes.....	232
3. Conclusion.....	233
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	235
ANNEXES	263
Manuscrit 6 : Muller K, Vogelweith F, Thiéry D & Moreau J (2015). Immune benefits from alternative host plants could maintain polyphagy in a phytophagous insect. <i>Oecologia</i> , 177 :467-475.....	265

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Publicité vantant les mérites de l'un des tout premiers insecticides modernes utilisé en agriculture, le DDT (dichloro-diphényl-trichloroethane), qualifié à l'époque de « bienfaiteur pour l'humanité toute entière » et faisant aujourd'hui parti des Polluants Organiques Persistants.....8

Figure 2 : Schéma représentant les différents types d'approche (lutte biologique, physique, chimique, biopesticides et facteurs humains) en protection des végétaux pour une gestion intégrée des ravageurs.....9

Figure 3 : Divers cadeaux nuptiaux offerts par les mâles aux femelles chez plusieurs espèces d'insectes (Photographies d'après Lewis & South 2011): (a) une espèce de mouche (Diptera: Empididae) se nourrissant d'une proie morte offerte par son partenaire, (b) une femelle de criquet du chameau (Orthoptera: Rhaphidophoridae) consommant un spermatophylax gélatineux que le mâle a attaché à son ouverture génitale, (c) un spermatophore transféré dans le tractus génital d'une femelle de luciole (Coleoptera: Lampyridae) et (d) un mâle de mouche-scorpion (Mecoptera: Panorpididae) sécrétant une masse salivaire que la femelle consommera pendant l'accouplement.....16

Figure 4 : Schéma représentant les appareils reproducteurs des femelles (à gauche) et des mâles (à droite) chez les Lépidoptères. Le tracé en bleu foncé représente le transfert du spermatophore (formé de substances provenant des glandes accessoires et de spermatozoïdes produits par les testicules) du mâle à la femelle lors de l'accouplement.....18

Figure 5 : Tailles de l'effet (d de Hedge $\pm$ IC à 95%) calculées à partir d'études qui ont examiné l'influence de la taille de l'éjaculat sur la fécondité (à gauche) et la longévité (à droite) des femelles au sein de 4 ordres d'insectes (respectivement les Orthoptères, les Lépidoptères, les Coléoptères et les Diptères, les effectifs sont indiqués entre parenthèses). Si un intervalle de confiance ne recoupe pas l'axe 0, cela signifie qu'il existe un effet de la taille de l'éjaculat sur le trait mesuré ($p < 0.05$). Figure créée à partir d'un tableau issu de la méta-analyse de South & Lewis en 2011, crédit image : Andrew Howells ©).....19

Figure 6 : Différents composants formant l'éjaculat des mâles qui sont influencés et influencent une large variété de facteurs (représentés par les encadrés bleus pour les mâles, roses pour les femelles, et violets pour les individus non-appariés dans la population). L'encadré jaune contient la liste des composants présents dans l'éjaculat des mâles et la flèche jaune représente le transfert de l'éjaculat des mâles aux femelles. Les flèches noires indiquent les relations entre les facteurs et les individus. (Figure traduite à partir de celle présentée dans Perry et al. 2013).....21

Figure 7 : Représentation schématique des différents facteurs influençant le succès reproducteur des mâles et des femelles abordés au cours de cette thèse et chapitres associés (les flèches en jaunes concernent le chapitre III, celles en vertes le chapitre IV et celles en grise le chapitre V).....28

Figure 8 : Carte répertoriant les 16 différents vignobles français (modifié d'après www.vin-vigne.com).....33

Figure 9 : Distribution à l'échelle mondiale des populations de *L. botrana* avec une apparition récente en 2009 en Californie (étoile), image tirée du « Practical Winery & Vineyard » (Varela et al. 2010).....34

Figure 10 : Photographies de (a) perforations des baies avant véraison par des chenilles *L. botrana* et (b) dégâts caractéristiques de la pourriture grise *Botrytis cinerea* sur une grappe.....35

Figure 11 : Photographies des différents stades de développement chez Eudémis : a) chenille au 5^{ème} stade larvaire, b) de haut en bas, chrysalides d'une femelle et d'un mâle et c) femelle adulte.....35

Figure 12 : Cycle annuel de l'Eudémis, <i>L. botrana</i> avec trois générations s'étalant d'avril à octobre sur différents stades phénologiques de la vigne (modifié d'après Thiéry, 2008, photographies issues du site www.vins-bourgogne.fr).....	36
Figure 13 : Accouplement entre une femelle (au-dessus) et un mâle (en dessous) chez Eudémis.....	38
Figure 14 : Schéma représentant un spermatophore tel que transféré dans la bourse copulatrice de la femelle lors de l'accouplement. Le bulbe renferme les sécrétions des glandes accessoires produites par le mâle. Les deux types de spermatozoïdes (apyrènes et eupyryènes) sont contenus dans un sac spermatique proche du collum par lequel ces derniers sortiront pour rejoindre la spermathèque de la femelle.....	39
Figure 15 : Photographie de deux cages d'accouplement d'Eudémis dans une salle d'élevage.....	42
Figure 16 : Photographies des extrémités abdominales d'une femelle présentant son ovipositeur (à gauche) et d'un mâle (à droite) chez Eudémis (© K. Muller).....	43
Figure 17 : Points d'échantillonnage des chenilles <i>L. botrana</i> sur différents cépages (Carignan, Grenache Mourvèdre et Syrah) et dans différents sites géographiques en France (d'ouest en est, parcelle Polygone à Perpignan [rouge], parcelle à Gallician [bleu], parcelle à Estézargues [vert] et plateau de Roquemartine à Sénas [jaune]) lors des deux années de collecte (en mai/juin 2013 et 2014).....	44
Figure 18 : Photographie d'un tube d'accouplement fermée par un bouchon en coton et contenant une femelle en position d'appel (à gauche) et un mâle (à droite) avant l'accouplement.....	44
Figure 19 : Photographie d'une femelle d'Eudémis en position d'appel avec les ailes relevées et la glande à phéromone exposée (© S. Rauscher).....	45
Figure 20 : Photographies (a) d'un spermatophore contenu dans la bourse copulatrice d'une femelle après un accouplement avec un mâle vierge et (b) d'un spermatophore seul extrait de la bourse copulatrice avec les dimensions mesurées (L : longueur, l : largeur, e : épaisseur).....	47
Figure 21 : Photographies (a) d'un paquet contenant 256 spermatozoïdes eupyryènes (grossissement $\times 40$) et (b) d'une goutte de sperme non diluée contenant des milliers de spermatozoïdes apyrènes (grossissement $\times 100$) observés après dissection d'un spermatophore sous microscope optique.....	48
Figure 22 : Photographie d'œufs chez <i>L. botrana</i> à différents stades : en développement, au stade dit « tête noire » 1 ou 2 jours avant l'éclosion, éclos et non-éclos (contenant une larve décédée).....	49
Figure 23 : Schéma récapitulatif de la technique consistant à mesurer les réserves énergétiques (protéines, lipides, sucres et glycogène) des mâles adultes en fonction du cépage sur lequel ils ont effectué l'intégralité de leur développement larvaire.....	50
Figure 24 : (a) Nombre d'accouplements réussis entre un mâle contrôle et une femelle provenant d'un cépage donné (Carignan « CAR », Grenache « GRE » et Mourvèdre « MOU ») en proposant à chaque mâle dans un test de choix, deux femelles provenant de deux cépages différents et (b) probabilités globales d'accouplements du mâle avec les femelles provenant des trois cépages. (* : $p < 0,05$ après un test de χ^2)...162	
Figure 25 : Fécondité (moyenne $\pm$ erreur type) des femelles en fonction du cépage sur lequel elles ont effectué leur développement larvaire (Carignan, Mourvèdre et Grenache). Les lettres différentes au-dessus des moyennes indiquent des différences significatives de fécondité, $p < 0,05$).....	163
Figure 26 : Différents mécanismes d'isolement pré-zygotiques et post-zygotiques chez les Lépidoptères.....	171

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des cadeaux nuptiaux en fonction de leur origine (endogène ou exogène) et de la voie par laquelle ils sont obtenus par les femelles (orale ou génitale).....	17
Tableau 2 : Nombre d'études ayant examiné un ou plusieurs facteurs influençant la taille du spermatophore (ou la quantité de fluides séminaux libres) chez différents ordres d'insectes. Les études présentées proviennent de la base de données Web of Science, la recherche datant du 15/09/2015.....	22
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des études portant sur l'effet de la plante hôte (différents cépages ou différentes plantes hôtes alternatives) ou du stade phénologique de la vigne sur plusieurs traits d'histoire de vie des larves chez Eudémis.....	41
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études portant sur l'effet de la plante hôte (différents cépages ou différentes plantes hôtes alternatives) ou du stade phénologique de la vigne sur plusieurs traits d'histoire de vie des adultes, mâles et femelles, chez Eudémis. Les traits surlignés en gras concernent les mâles.....	41
Tableau 5 : Répertoire et description des comportements précopulatoires reflétant la motivation des femelles et des mâles à s'accoupler chez Eudémis.....	46
Tableau 6 : Différents traits mesurés chez des femelles Eudémis en fonction de leur cépage d'origine. Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).....	164
Tableau 7 : Synthèse des résultats obtenus au cours des trois expériences (Chapitre IV.1, 2 et 3) menées sur des mâles prélevés sur différents cépages en populations naturelles. Les effets de chaque cépage sur les différents traits mesurés sont exprimés relativement les uns par rapport aux autres.....	166
Tableau 8 : Synthèse de l'effet du cépage de vigne sur une multitude de traits reflétant la qualité du mâle et ses conséquences sur le potentiel reproductif des femelles chez Eudémis (Chapitre IV).....	208
Tableau 9 : Connaissances écologiques nécessaires à la mise en place des différentes méthodes de lutttes contre l'Eudémis, tirées des principales études visant à améliorer la réussite de ces programmes.....	226

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Manuscrit 6 - Muller K, Vogelweith F, Thiéry D & Moreau J (2015). Immune benefits from alternative host plants could maintain polyphagy in a phytophagous insect. <i>Oecologia</i> , 177:467- 475.....	265
--	-----

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

AVANT-PROPOS

À l'heure actuelle, les insectes phytophages sont considérés comme responsables de 20 à 50 % des pertes de récolte à l'échelle mondiale (Oerke 2006), les espèces concernées étant nommées à juste titre de « ravageurs de cultures ». Les plantes cultivées à travers le monde sont ainsi la cible de plus de 10 000 espèces d'insectes, leurs ravages favorisant au passage l'installation de nombreuses maladies (Dhaliwal et al. 2010). Toute une panoplie de moyens de lutte existe pour parvenir à contrôler ces bio-agresseurs, allant des méthodes classiques de lutte chimique à l'aide de pesticides à des méthodes de biocontrôle plus écologiques et moins invasives (Thacker 2002, Van Driesche et al. 2009). Avec l'augmentation exponentielle de la population humaine et les changements alimentaires dans les pays en développement (Tilman et al. 2011), protéger les cultures des dégâts causés par les ravageurs est un enjeu actuel majeur pour garantir un approvisionnement suffisant en nourriture dans les années à venir (Thomas 1999). Dans un contexte d'agriculture durable, la gestion d'un agrosystème implique une connaissance approfondie des relations qui existent entre les ravageurs et leurs plantes hôtes. Si certains programmes de biocontrôle ont échoué par le passé, c'est souvent à cause d'un manque d'études empiriques sur l'écologie et le système de reproduction des insectes d'intérêt et notamment des mâles (Ferguson et al. 2005, Howell & Knols 2009). Par exemple, dans le cadre des relations plantes-insectes, la plupart des travaux qui ont cherché à identifier les effets des plantes hôtes sur l'aptitude phénotypique des adultes chez les ravageurs de culture ne se sont focalisés que sur les femelles (Awmack et Leather 2002).

L'absence de prise en compte du rôle du mâle dans les interactions plantes-insectes est largement dommageable dans notre compréhension des effets de la plante sur la dynamique des populations de bio-agresseurs. Le principal objectif de cette thèse est de pallier le manque de connaissances sur cet « effet mâle » dans les relations plantes-insectes en utilisant comme modèle l'un des principaux ravageurs de la vigne, l'Eudémis. Ce projet vise ainsi à évaluer l'importance du rôle du mâle – à travers notamment le transfert de cadeaux nuptiaux – dans les stratégies de reproduction chez cette espèce phytophage. Pour introduire ce travail, les différentes méthodes de lutte utilisées à travers le temps contre les insectes ravageurs de culture seront détaillées, ainsi que les facteurs qui conditionnent la réussite des programmes de biocontrôle. Nous nous focaliserons sur la nécessité d'examiner les contraintes écologiques qui structurent les populations de ravageurs, en mettant en avant l'importance d'étudier les mâles qui sont, en général, largement ignorés dans les modèles théoriques et empiriques. Dans une seconde partie, nous identifierons les facteurs responsables des variations observées dans

le succès reproducteur des insectes phytophages, en se concentrant plus particulièrement sur le rôle potentiel de chaque partenaire sexuel, notamment chez les espèces où les mâles fournissent des cadeaux nuptiaux aux femelles. Les paramètres déterminants du succès reproducteur des mâles phytophages seront présentés avec une mise en lumière de l'importance de la plante hôte, pour enfin, dans une dernière partie, dresser les objectifs de cette thèse.

1. INSECTES PHYTOPHAGES ET RAVAGEURS DE CULTURE

1.1 ÉVOLUTION DES MÉTHODES DE LUTTE CONTRE LES RAVAGEURS

Depuis les débuts de l'agriculture, les hommes ont dû faire face au problème récurrent des insectes ravageant leurs cultures, s'en remettant tout d'abord aux instances divines et religieuses pour s'en débarrasser (Schwartz & Rodhain 2008). La première anecdote rapportée à ce sujet date de 1120, et évoque un procès au cours duquel l'évêque de Laon décidât d'excommunier mulots et chenilles, accusés d'avoir abîmé les récoltes du comté. Les procès contre les ravageurs ont ainsi jalonné les siècles sans pour autant rencontrer beaucoup de succès. Parallèlement, tout au long de l'histoire, de nombreuses recettes de compositions diverses (à base de cendres, d'urine d'animaux, d'arsenic...) ont été utilisées contre les insectes avec des efficacités plus qu'incertaines.

Ce n'est qu'à partir du milieu du XX^{ème} siècle qu'une nouvelle méthode plus radicale se développe, utilisant des insecticides pour lutter contre les insectes. Cette méthode classique de lutte chimique, jadis considérée comme l'arme miraculeuse et absolue contre les bio-agresseurs (Fig. 1), est aujourd'hui largement décriée en raison de ses multiples effets néfastes sur l'environnement et sur tous les niveaux de la chaîne trophique – depuis les végétaux jusqu'à l'homme (Hallenbeck & Cunningham-Burns 1995, Desneux et al. 2007, Geiger et al. 2010). De surcroît, suite à l'utilisation intempestive et souvent irrationnelle des pesticides, certaines espèces d'insectes ravageurs ont acquis des formes de résistance les rendant moins sensibles à cette forme de lutte (Roush & Tabashnik 1990, Boyer et al. 2012).



Figure 1 : Publicité vantant les mérites de l'un des tout premiers insecticides modernes utilisé en agriculture, le DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane), qualifié à l'époque de « bienfaiteur pour l'humanité toute entière » et faisant aujourd'hui parti des Polluants Organiques Persistants.

Depuis quelques décennies, l'utilisation de méthodes de lutte dites alternatives, moins invasives et plus écologiques, est recommandée par la communauté scientifique et par les instances gouvernementales – par exemple via le plan Écophyto proposé par le Grenelle de l'environnement qui vise à réduire l'utilisation de pesticides de 50% d'ici 2018. Le contrôle des bio-agresseurs à travers l'utilisation d'une lutte intégrée multidisciplinaire (« *Integrated Pest Management* ») (Fig. 2) semble être une solution raisonnable alliant différents types de lutte pour répondre au mieux aux préoccupations écologiques et sociétales actuelles (Kogan 1998, Thomas 1999, Way & Van Emden 2000, Brewer & Goodell 2012).

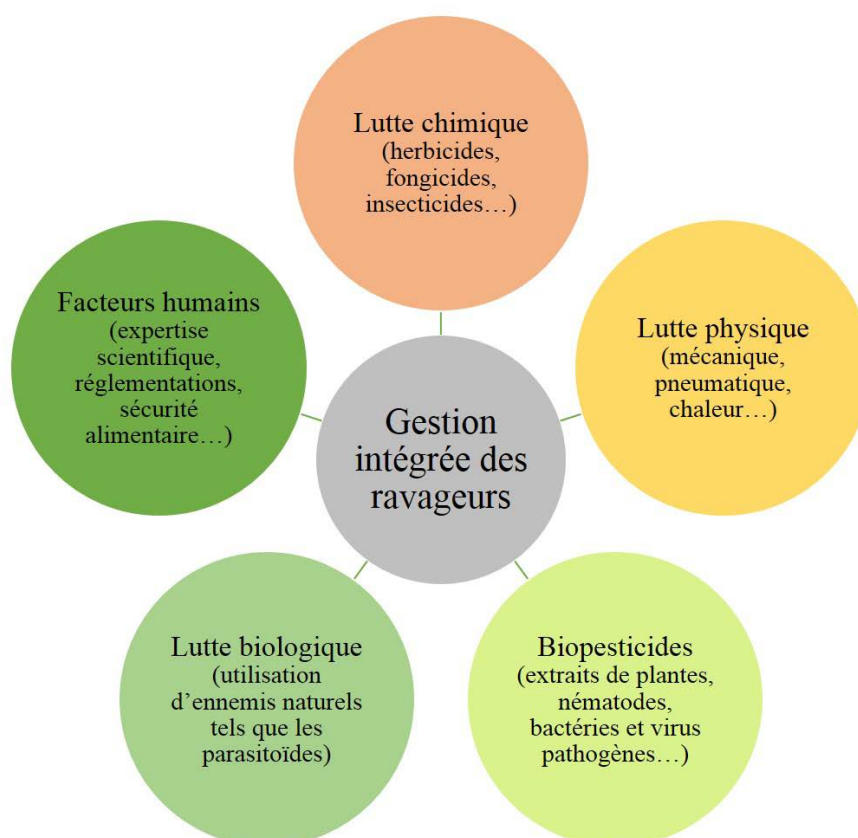


Figure 2 : Schéma représentant les différents types d'approche (lutte biologique, physique, chimique, biopesticides et facteurs humains) en protection des végétaux pour une gestion intégrée des ravageurs.

1.2 LA PROTECTION INTÉGRÉE : QUELS OUTILS ET QUELS MOYENS ?

La protection intégrée, apparue au début des années 60, dont les fondements reposent sur l'écologie, a pour objectif de gérer de façon optimale les bio-agresseurs tout en maintenant les fonctions des écosystèmes (Stern et al. 1959). Cette méthode s'est imposée dans le monde entier et apparaît comme la principale stratégie holistique de protection des cultures (Ehler 2006, Naranjo & Ellsworth 2009, Abrol & Shankar 2012). Dans un contexte d'agriculture durable, les stratégies de biocontrôle (*i.e.* l'ensemble des méthodes de protection des végétaux

par l'utilisation de mécanismes naturels) offrent de nombreuses alternatives aux insecticides de synthèse. Ainsi, les pesticides d'origine végétale ou microbienne, l'utilisation de macro-organismes auxiliaires, les médiateurs chimiques (phéromones d'insectes...) ou encore la lutte autocide (basée sur le lâcher de mâles stériles) sont autant de méthodes permettant de gérer la trop forte croissance des populations de bio-agresseurs (Thacker 2002, Walter 2005). Une gestion optimale des ravageurs peut également être appréhendée par l'utilisation d'outils mathématiques, permettant de modéliser les processus de dynamique des populations de ravageurs afin de mieux décrire leur fonctionnement et ainsi de prévoir leur évolution. Cette méthodologie permet ainsi de caractériser l'évolution des populations en se basant sur différents traits d'histoire de vie, décrits mathématiquement par des trajectoires dynamiques dépendant des valeurs des paramètres de l'environnement. Par exemple, la surveillance quotidienne du climat associée aux connaissances sur la biologie des ravageurs ont permis des avancées considérables permettant d'anticiper les pics d'émergence des insectes, et protéger ainsi les cultures plus efficacement en optimisant la pose de pièges dans les vignobles (Leskinen et al. 2011). La mise en œuvre de l'ensemble de ces outils de contrôle, qu'ils soient théoriques (via la modélisation des dynamiques des populations) ou pratiques (via l'utilisation de méthodes de biocontrôle) requiert une connaissance approfondie de l'écologie et des traits d'histoire de vie des espèces qui conditionnent leur succès reproducteur. Cela nécessite notamment de reconsidérer l'importance des mâles dans ces systèmes (Ferguson et al. 2005).

1.3 RÔLE DES MÂLES DANS LES DYNAMIQUES ÉVOLUTIVES DE POPULATIONS PHYTOPHAGES

La plupart des échecs des programmes pratiques de biocontrôle par le passé sont directement liés à un manque de compréhension de l'écologie du ravageur, et notamment parce que les chercheurs ont longtemps ignoré l'importance des mâles dans l'évolution des dynamiques de population des insectes (Ferguson et al. 2005, Rankin & Kokko 2007).

D'un point de vue théorique, dans la majorité des modèles de dynamique des populations en écologie, seule la femelle est prise en compte (Caswell 2001). Le rôle des mâles dans la plupart de ces modèles a longtemps été considéré comme négligeable, voire même inexistant, les chercheurs simplifiant leurs calculs mathématiques en excluant complètement le compartiment mâle de leurs simulations. Encore récemment, certains scientifiques, à partir de modèles simulés, ont suggéré que pour donner une image plus réaliste des processus évolutifs et démographiques des populations de ravageurs dans des environnements variables, il suffisait d'étudier les contraintes écologiques sur le potentiel reproductif des femelles, occultant le rôle potentiel des mâles dans l'évolution de ces populations (Berger et al.

2012). Les modèles centrés sur la femelle supposent de manière simpliste que la disponibilité en mâles n'est pas un facteur limitant de la reproduction des femelles, que la sex-ratio opérationnelle est toujours à l'équilibre et que les traits d'histoire de vie des mâles sont similaires à ceux des femelles (Caswell & Weeks 1986, Lindström & Kokko 1998, Engen et al. 2003). En réalité, les mâles, via leur comportement ou leur simple présence, jouent un rôle primordial sur la stabilité et l'équilibre des populations. La présence des mâles peut notamment avoir de nombreux effets, positifs (via le don de cadeaux nuptiaux, les soins parentaux...) ou négatifs (via la transmission de maladies, le harcèlement sexuel...) sur les densités de population. Récemment, une revue de Rankin & Kokko en 2007 a mis en exergue ces différents phénomènes démontrant ainsi la nécessité de s'intéresser au compartiment mâle. En effet, le postulat initial supposant qu'il y a toujours assez de mâles pour assurer la fécondation des femelles est loin d'être vérifié car, même si produire des spermatozoïdes se révèle moins coûteux que de produire des ovocytes, l'accouplement en lui-même, le don de cadeaux nuptiaux, les soins paternels, ou encore la compétition génèrent de nombreux coûts limitant la reproduction des mâles chez de nombreuses espèces (Dewsbury 1982, Wedell et al. 2002, Gerber et al. 2010). Dans ce contexte, les mâles apparaissent comme une ressource critique pour la reproduction des femelles et quels que soient les mécanismes proximaux à l'origine des systèmes de reproduction, la probabilité qu'une femelle s'accouple dépendra des contraintes imposées sur la reproduction des deux sexes (Miller & Inouye 2011). Ainsi, de plus en plus de scientifiques recommandent de mener des études empiriques sur le rôle potentiel des mâles dans les dynamiques de population de ravageurs. De plus, il est nécessaire d'intégrer cet « effet mâle » dans les modèles théoriques afin d'améliorer la prédiction de l'évolution des populations de ravageurs et ainsi d'affiner les programmes de lutte biologique d'un point de vue temporel et spatial (Ferguson et al. 2005, Rankin & Kokko 2007).

D'un point de vue pratique, si plusieurs programmes de biocontrôle ont échoué par le passé, c'est principalement à cause d'une mauvaise connaissance de l'écologie de l'espèce d'intérêt et plus particulièrement parce que l'importance des mâles dans ces systèmes a longtemps été ignorée (Ferguson et al. 2005). Prenons l'exemple d'une méthode classiquement utilisée dans le biocontrôle des ravageurs et des vecteurs de maladies à travers le monde, la technique de l'insecte stérile (TIS) (Dyck et al. 2005). Cette méthode repose sur le lâcher de mâles stériles dans les populations naturelles et sa réussite dépend principalement de la capacité de ces mâles à localiser, attirer, s'accoupler et rendre non-fertiles les femelles sauvages (Vreysen et al. 2006, Vreysen et al. 2007). En raison de la production en série des mâles stériles et du stress imposé par l'irradiation, la TIS produit généralement des mâles de

moins bonne qualité que les mâles sauvages (Liimatainen et al. 1997, Hendrichs et al. 2002). Ainsi, les premières tentatives de lâchers de mâles stériles pour contrôler par exemple le ver rose du cotonnier *Pectinophora gossypiella* dans les années 50, furent désastreuses, les mâles relâchés ne parvenant pas à s'accoupler *in natura* (Klassen & Curtis 2005). Afin d'optimiser l'efficacité de la TIS, il apparaît donc indispensable d'étudier à la fois le comportement reproducteur de ces mâles stériles (via notamment leur capacité à rivaliser et à gagner la compétition face aux mâles sauvages) et d'identifier les facteurs écologiques influant sur leurs traits d'histoire de vie (longévité, ressources énergétiques, capacités de dispersion...) en populations naturelles (Pérez-Staples et al. 2012). Ainsi, des connaissances sur le choix de partenaire en relation avec différents traits morphologiques ainsi que sur les capacités d'accouplement des mâles et des femelles contribuent également à l'amélioration de l'efficacité des lâchers d'insectes stériles (Kraaijeveld et al. 2005, Shelly et al. 2007). Chez les espèces qui ont recours à des comportements précopulatoires spécifiques pour parvenir à s'accoupler, il est essentiel que les mâles stériles soient capables d'adopter ces comportements pour être acceptés par les femelles sauvages. La clé du succès des programmes TIS implique ainsi de « façonner des mâles de meilleure qualité » (Pérez-Staples et al. 2012) et exige donc une connaissance parfaite du comportement et de la physiologie des mâles sauvages. De plus, il est indispensable que les femelles sauvages acceptent ces mâles stériles, ce qui nécessite de connaître précisément sur quels critères les femelles se basent pour choisir leur partenaire (Calkins & Parker 2005). Des efforts ont été faits pour quelques espèces, comme par exemple pour la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata*, fléau des plants d'agrumes. Grâce à une multitude de travaux de recherche ayant identifiés les principaux déterminants du succès reproducteur des mâles, à savoir leur âge et leur taille (Taylor et al. 2001), leur génotype (Cladera et al. 2002) et leur alimentation (Yval et al. 2002, Maor et al. 2004), des solutions ont été trouvées pour améliorer le succès des lâchers. Ainsi, la compétitivité des mâles stériles a été améliorée en les élevant au laboratoire sur des alimentations riches en protéines pour booster leurs performances reproductives (Yuval et al. 2007). Les mâles ont également été exposés à de l'huile essentielle de gingembre (contenant un composé attractif, l' α -copaène favorisant les rencontres entre partenaires chez cette espèce, Nishida et al. 2000), améliorant largement leur succès reproducteur (75% des mâles irradiés gagnant la compétition face aux mâles sauvages, Shelly & McInnis 2001, Shelly et al. 2004). L'ensemble de ces améliorations a permis de contrôler efficacement cette espèce par des lâchers de mâles stériles dans plusieurs pays, incluant le Chili, le Costa Rica, le Guatemala, le Pérou et les États-Unis (Hendrichs et al. 2002, Pereira et al. 2013).

Ces efforts, réalisés chez quelques espèces par le biais de recherches intensives, encouragent donc à poursuivre ce type d'études pour améliorer les programmes de contrôle des espèces à problème pour l'homme et les cultures tels que les vecteurs de maladie comme le moustique (Ferguson et al. 2005) ou les insectes ravageurs continuant à pulluler à travers le monde. On peut cependant légitimement se demander quelle est la réelle portée pratique des études fondamentales s'intéressant aux traits d'histoire de vie des individus sur le contrôle des insectes ravageurs. Nylin en 2001 a consacré une revue entière pour tenter de répondre à cette question et son constat est indéniable : comprendre comment le cycle de vie des ravageurs est régulé est essentiel pour anticiper l'évolution des populations de ravageurs et les contrôler. Depuis, de nombreuses preuves empiriques ont été apportées confirmant l'utilité et la nécessité d'étudier les traits d'histoire de vie des femelles et des mâles, notamment en lien avec leurs plantes hôtes pour appréhender l'évolution des populations de ravageurs (Walter 2005, Cerritos et al. 2012, Koricheva et al. 2012). Cependant, pour la plupart des espèces de ravageurs phytophages, nous ignorons encore quels sont les traits, pris individuellement ou collectivement, qui déterminent le succès reproducteur des mâles et le choix des femelles en populations naturelles (Nylin 2001).

2. IMPORTANCE DES MÂLES DANS LES INTERACTIONS PLANTES-INSECTES

2.1 STRATÉGIES DE REPRODUCTION CHEZ LES INSECTES : UNE HISTOIRE DE SEXE

Le succès reproducteur d'un individu représente sa capacité à transmettre ses gènes et à produire une descendance viable elle-même capable de se reproduire (Trivers 1972). En raison d'une anisogamie marquée entre les sexes – les gamètes mâles étant beaucoup moins coûteux à produire que les gamètes femelles – les stratégies de reproduction des deux sexes diffèrent drastiquement. Selon le principe de Bateman (1948) et l'hypothèse de l'investissement parental de Trivers (1972), l'importance de l'asymétrie d'investissement reproductif entre mâles et femelles influence directement l'intensité de la sélection sexuelle. En effet, les femelles sont limitées par la quantité de gamètes qu'elles peuvent produire et les mâles par le nombre de partenaires sexuels qu'ils pourront cumuler au cours de leur vie. Par conséquent, les mâles devraient chercher à maximiser leur succès reproducteur en multipliant les opportunités de reproduction afin de fertiliser le plus de femelles possible tandis que les femelles devraient plutôt privilégier la qualité des mâles en sélectionnant judicieusement leur partenaire sexuel afin d'obtenir des bénéfices directs et indirects (Andersson & Simmons 2006, Kokko et al. 2006).

La sélection sexuelle joue ainsi un rôle primordial dans l'évolution des stratégies reproductives adoptées par les organismes pour maximiser leur succès reproducteur. Ces stratégies sont contraintes à la fois par des composantes biologiques (comme la physiologie, l'anatomie ou le mode de reproduction de l'espèce considérée) mais également par des facteurs écologiques (comme la phénologie, la température, l'humidité ou encore la qualité des ressources nutritives). Les capacités reproductives des insectes phytophages dépendent de l'énergie qu'ils peuvent investir dans la reproduction (Boggs 1997^{a,b}) et donc avant tout des ressources nutritives qu'ils auront accumulées en se nourrissant sur différentes plantes hôtes au cours de leur vie. Chez les insectes phytophages holométaboles avec un cycle de vie complexe, les conditions éprouvées par les larves peuvent grandement influencer la morphologie et les traits reproductifs des adultes (Boggs & Freeman 2005, Tigreros 2013). Ces organismes sont en effet confrontés à une variété de challenges nutritifs tout au long de leur développement, qui ont non seulement un impact immédiat sur leur croissance larvaire mais également des implications considérables pour leur futur succès reproducteur (Metcalf & Monaghan 2001, Barrett et al. 2009). Ainsi, les ressources allouées à la reproduction proviennent de deux principales sources chez les insectes phytophages : (1) des nutriments accumulés pendant leur nutrition larvaire et (2) de la nourriture ingérée à l'état adulte. Pour de nombreuses femelles, une 3^{ème} source d'énergie est disponible et dépend directement de leur partenaire sexuel, capable de leur procurer des bénéfices directs à travers des apports nutritifs offerts en plus des spermatozoïdes lors de la reproduction (Boggs 1990, Vahed 1998).

2.2 LE MÂLE EN TANT QUE PARTENAIRE SEXUEL : BÉNÉFICES DIRECTS POUR LES FEMELLES

2.2.1 « *It takes two to tango* » : Effet de la "qualité" du partenaire sexuel

La reproduction sexuée implique en effet la participation de deux organismes de sexes différents pour la production de descendants. Puisqu'il faut être deux pour s'accoupler (tout comme il faut être deux pour danser le tango !), la contribution relative des deux sexes dans l'obtention d'une progéniture viable et capable de se reproduire devrait systématiquement être prise en considération. Les femelles peuvent tirer deux sortes de bénéfices de leur partenaire sexuel : des bénéfices directs (comme des spermatozoïdes fertiles, une bonne qualité de territoire, des cadeaux nuptiaux ou encore de meilleurs soins parentaux) mais aussi des bénéfices indirects (notamment de meilleurs gènes chez le mâle qui permettent une plus grande variabilité chez les jeunes, une plus grande résistance aux maladies et la production de descendants attractifs). Ainsi, la contribution des mâles peut augmenter l'aptitude phénotypique des femelle par le biais d'effets génétiques directs sur sa longévité et sa

reproduction, ou par le biais d'effets non-génétiques indirects en augmentant l'aptitude phénotypique de sa descendance (Grether 2010). Seuls seront explorés ici les bénéfices directs obtenus pendant l'accouplement par les femelles, ces bénéfices étant traditionnellement considérés comme plus importants parce que leurs effets sont immédiats et qu'ils n'impliquent pas de mécanismes qui maintiennent la variance génétique (Møller & Jennions 2001, Cameron et al. 2003). Parmi les bénéfices directs, la contribution du mâle peut se faire via sa capacité d'insémination et surtout via l'apport de cadeaux nuptiaux qui ont le potentiel de booster les performances reproductives des femelles.

2.2.2 Capacité d'insémination des mâles et évolution de la polyandrie

Le succès reproducteur des femelles phytophages dépend tout d'abord de la capacité d'insémination des mâles avec lesquels elles s'accouplent, les femelles ayant intérêt à ce que leurs partenaires disposent de suffisamment de spermatozoïdes pour féconder tous leurs œufs. Chez de nombreuses espèces d'insecte, les mâles produisent deux types de spermatozoïdes, morphologiquement et fonctionnellement très différents. Les spermatozoïdes fécondants nucléés (« eupyènes » chez les Lépidoptères) sont produits en faible quantité et servent principalement à féconder les œufs tandis qu'un second type de spermatozoïdes anucléés, non-fécondants (« apyènes » chez les Lépidoptères), est produit en quantité importante et joue entre autres, un rôle important dans la compétition spermatique (Wedell & Cook 1999). L'idée selon laquelle les mâles ne supportent aucun coût à la production de leur éjaculat est largement dépassée, les mâles de nombreuses espèces n'étant pas capables de produire une quantité illimitée de spermatozoïdes (et notamment de spermatozoïdes fécondants) au cours de leur vie (Dewsbury 1982, Janowitz & Fischer 2010, Scharf et al. 2013).

Pour éviter les accouplements stériles avec des mâles dont les stocks spermatiques sont complètement épuisés, certaines femelles multiplient le nombre de partenaires sexuels au cours de leur vie (*i.e.* espèces polyandres, Arnqvist & Nilsson 2000). C'est par exemple le cas de la mouche aux yeux pédonculés *Cyrtodiopsis dalmanni* chez laquelle les femelles s'accouplent avec plusieurs mâles afin de recevoir suffisamment de sperme pour féconder tous leurs œufs (Baker et al. 2001). Cette polyandrie est commune chez de nombreuses espèces d'insectes chez lesquels une seule copulation ne suffit généralement pas pour féconder tous les œufs d'une femelle (Arnqvist & Nilsson 2000). Ainsi, la capacité d'insémination des mâles est un premier paramètre critique du potentiel reproductif des femelles. Les femelles devraient en effet éviter de s'accoupler avec des mâles aux réserves spermatiques amoindries pour limiter la production d'œufs stériles. De plus, les femelles peuvent également augmenter leur

succès reproducteur en multipliant le nombre d'accouplements si elles reçoivent des ressources nutritives de la part des mâles, notamment sous la forme de cadeaux nuptiaux, représentant des bénéfices directs importants, augmentant leur aptitude phénotypique (Torres-Vila & Jennions 2005, Mellström & Wiklund 2009).

2.2.3 Apports nutritifs par les cadeaux nuptiaux

Chez de nombreuses espèces d'insecte, les mâles offrent des cadeaux nuptiaux aux femelles avant ou pendant l'accouplement qui constituent des bénéfices nutritifs importants pour ces dernières (Lewis et al. 2014). En effet, ces cadeaux nuptiaux renferment toute une variété de composés tels que des protéines, des lipides, des glucides, des minéraux, de l'acide urique, ou encore des métabolites de défense contre les prédateurs (Boggs 1995, Vahed 1998). Les femelles récupèrent ces composés dans les cadeaux nuptiaux et les remobilisent soit dans leur reproduction soit dans leur maintenance somatique. Ces offrandes nutritives peuvent prendre de multiples formes (Fig. 3), allant de proies capturées par le mâle (Fig. 3a) à des parties corporelles voire le corps entier du mâle (illustré par le cas spectaculaire des mantes religieuses), en passant par des substances endogènes produites par les glandes des mâles (Fig. 3b,c,d), telles que les sécrétions des glandes salivaires (Fig. 3d) ou les spermatophores produits par les glandes accessoires et transférés dans le tractus génital des femelles lors de l'accouplement (Fig. 3c) (voir Vahed 1998 pour une revue complète).

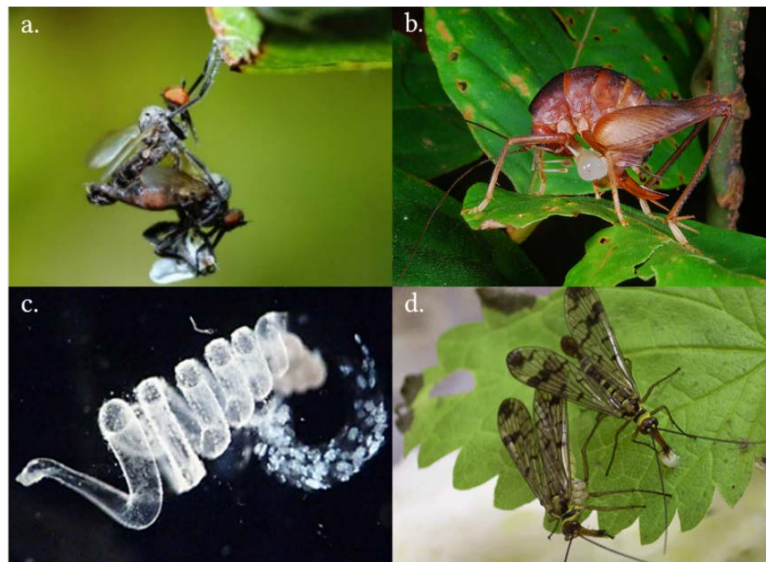


Figure 3 : Divers cadeaux nuptiaux offerts par les mâles aux femelles chez plusieurs espèces d'insectes (Photographies d'après Lewis & South 2012) : (a) une espèce de mouche (Diptera: Empididae) se nourrissant d'une proie morte offerte par son partenaire, (b) une femelle de criquet du chameau (Orthoptera: Rhaphidophoridae) consommant un spermatophylax gélatineux que le mâle a attaché à son ouverture génitale, (c) un spermatophore transféré dans le tractus génital d'une femelle de luciole (Coleoptera: Lampyridae) et (d) un mâle de mouche-scorpion (Mecoptera: Panorpididae) sécrétant une masse salivaire que la femelle consommera pendant l'accouplement.

Une classification simple de l'ensemble de ces offrandes peut être appréhendée à l'aide de deux dimensions (Lewis et al. 2014) : leur origine (endogène ou exogène) et la manière dont elles sont assimilées par les femelles (voie orale ou génitale) (Tableau 1). Les offrandes orales exogènes imposent des coûts de recherche aux mâles mais augmentent également leur aptitude phénotypique puisque (i) ces offrandes peuvent être évaluées avant l'accouplement et contribuent donc à attirer des femelles et (ii) elles permettent d'augmenter le temps de copulation et donc de transférer plus de spermatozoïdes aux femelles. Ces proies offertes procurent également des bénéfices nutritifs importants aux femelles (même si dans certains cas, il peut s'agir de leurres, Albo et al. 2011).

Tableau 1 : Classification des cadeaux nuptiaux en fonction de leur origine (endogène ou exogène) et de la voie par laquelle ils sont obtenus par les femelles (orale ou génitale).

Origine Obtention	Endogène (produits ou provenant des mâles)	Exogène (capturés ou obtenus par les mâles)
Consommés oralement par la femelle	- Parties du corps / corps entier - Hémolymphe - Sécrétions salivaires (Fig. 3d) - Spermatophylax (Fig. 3b)	- Proies capturées (Fig. 3a) ou graines collectées par le mâle
Transférés à la femelle par voie génitale	- Sécrétions des glandes accessoires ✓ Substances libres ✓ Spermatophore (Fig. 3c)	-

Les offrandes endogènes quant à elles, imposent un coût physiologique de production et dépendent donc de la condition intrinsèque du donneur (Dewsbury 1982). Certaines de ces offrandes sont consommées oralement pendant la copulation et tout comme les offrandes exogènes, elles contribuent directement à augmenter le budget nutritif des femelles. Enfin, d'autres offrandes endogènes consistent en des sécrétions produites par les glandes accessoires des mâles qui sont transférées lors de l'accouplement dans le tractus génital des femelles (Gillot 2003). Ces substances, empaquetées dans des sacs (*i.e.* les spermatophores) ou circulant librement dans le sperme ont de multiples effets sur le comportement et le potentiel reproductif des femelles (Gillot 2003). Chez la plupart des insectes phytophages et notamment chez tous les Lépidoptères, l'éjaculat du mâle est constitué des sécrétions produites par les glandes accessoires et des spermatozoïdes issus des testicules des mâles. Cet éjaculat, coûteux à produire, est transféré dans un spermatophore se formant dans la bourse copulatrice de la femelle lors de la copulation (Fig. 4).

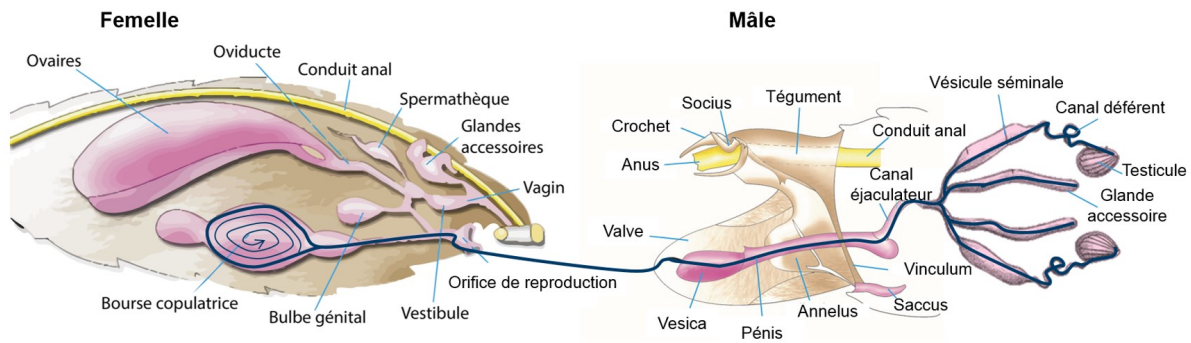


Figure 4 : Schéma représentant les appareils reproducteurs des femelles (à gauche) et des mâles (à droite) chez les Lépidoptères. Le tracé en bleu foncé représente le transfert du spermatophore (formé de substances provenant des glandes accessoires et de spermatozoïdes produits par les testicules) du mâle à la femelle lors de l'accouplement.

Les pressions sélectives responsables de l'évolution et du maintien de ces cadeaux nuptiaux ont été largement discutées au cours de ses vingt dernières années, le débat étant centré sur deux visions non mutuellement exclusives des fonctions adaptatives de ces offrandes nutritives (passées en revue par Simmons & Parker 1989, Vahed 1998, Gwynne 2008, Lewis et al. 2014). Toute la problématique revient à déterminer quels sont les bénéfices pour les mâles à transmettre ces cadeaux qui imposent un coût de production ou d'acquisition plus important qu'un simple transfert de spermatozoïdes. D'aucuns ont considéré les cadeaux nuptiaux comme une forme d'« investissement paternel », les mâles via ces donations, contribuant à augmenter l'aptitude phénotypique de leurs descendants (Simmons & Parker 1989). D'autres envisagent les cadeaux nuptiaux comme « investissement sexuel », les mâles utilisant ces cadeaux pour stimuler la femelle et prolonger l'accouplement afin de transférer plus de sperme et de limiter la compétition spermatique (Gwynne 2008, Lewis et al. 2011). Une multitude de preuves empiriques soutiennent ces deux points de vue, même si les chercheurs s'accordent à dire que les cadeaux nuptiaux ont plutôt évolué à travers leur contribution dans l'investissement sexuel (Vahed 1998, Arnqvist & Rowe 2005).

De manière générale, du point de vue de la femelle, toutes ces ressources offertes représentent des bénéfices directs importants puisque ces dernières peuvent réallouer l'énergie contenue dans ces offrandes à différentes fonctions, soit vers leur potentiel reproductif (par exemple en produisant plus d'œufs) soit vers leur maintenance somatique (par exemple en augmentant leur longévité) (South & Lewis 2011). En effet, ces sécrétions améliorent la fécondité des femelles en stimulant la maturation des ovocytes et la ponte des œufs. Plusieurs études empiriques ont suivi la destinée de substances nutritives marquées à

l'aide de composés radioactifs (acides aminés, zinc, phosphore et sodium) et ont montré que les femelles étaient capables d'incorporer les nutriments extraits du spermatophore dans la production de leurs œufs (Boggs 1990, Boggs 1997^b, Rooney & Lewis 1999, Wedell & Karlsson 2003). Une méta-analyse récente sur les effets de la taille de l'éjaculat (et donc la quantité de substances accessoires contenue dans des spermatophores ou directement dans le sperme) a souligné que pour la plupart des ordres d'insectes, le transfert d'un gros éjaculat augmente la fécondité des femelles (Fig. 5, South & Lewis 2011). En revanche, la taille de l'éjaculat ne semble pas influencer de manière significative la longévité des femelles chez les insectes (sauf chez les Coléoptères) (Fig. 5, South & Lewis 2011).

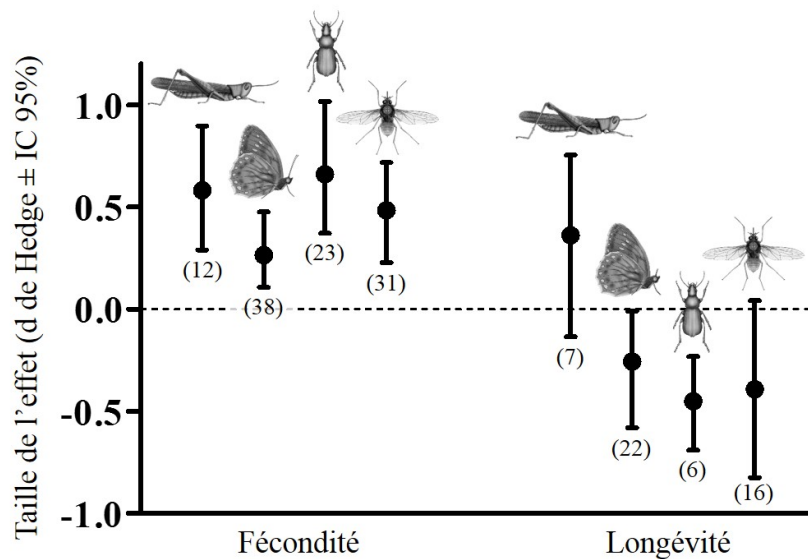


Figure 5 : Tailles de l'effet (d de Hedge $\pm$ IC à 95%) calculées à partir d'études qui ont examiné l'influence de la taille de l'éjaculat sur la fécondité (à gauche) et la longévité (à droite) des femelles au sein de 4 ordres d'insectes (respectivement les Orthoptères, les Lépidoptères, les Coléoptères et les Diptères, les effectifs sont indiqués entre parenthèses). Si un intervalle de confiance ne recoupe pas l'axe 0, cela signifie qu'il existe un effet de la taille de l'éjaculat sur le trait mesuré ($p < 0.05$). Figure créée à partir d'un tableau issu de la méta-analyse de South & Lewis en 2011, crédit image : Andrew Howells ©).

2.3 SUCCÈS REPRODUCTEUR DES MÂLES : UN INVESTISSEMENT CONDITION-DÉPENDANT

Tout comme les femelles, les mâles payent d'importants coûts à la reproduction, investissant du temps et de l'énergie dans la recherche de partenaires, dans la compétition, dans les comportements de cour et particulièrement dans la production d'éjaculats (Kotiaho & Simmons 2003, Pauku & Kotiaho 2005, Janowitz & Fischer 2010, Scharf et al. 2013). Les facteurs déterminants du succès reproducteur des mâles agissent à différents stades de la reproduction : (i) avant, avec le nombre d'opportunités de reproduction et la capacité à acquérir et à s'accoupler avec des femelles, (ii) pendant, via le don de cadeaux nuptiaux et le

transfert de spermatozoïdes et enfin, (iii) après, à travers la compétition spermatique et donc via le succès de fécondation des œufs et d'éclosion des larves. Ainsi, les mâles, qui ne disposent que d'une quantité finie d'énergie à investir dans différentes fonctions (Stearns 1992, Barnes & Partridge 2003), doivent faire face à des compromis dans l'allocation de leurs ressources, soit entre la reproduction et d'autres fonctions (telles que la survie, la longévité ou l'immunité) (Kerr et al. 2010, Simmons 2011), soit au sein même des différentes fonctions reproductives (et à différents moments de la reproduction) (Scharf et al. 2013). Par conséquent, les ressources investies dans la production d'un éjaculat pendant un épisode de reproduction ne sont plus disponibles pour d'autres fonctions et peuvent donc influencer la capacité des mâles à attirer d'autres partenaires, influençant leurs futures reproductions. Ces compromis se produisent typiquement dans des situations où la nourriture est limitée, l'investissement dans l'éjaculat (en termes de nutriments et/ou de spermatozoïdes) étant contraint en partie par la disponibilité des ressources (Simmons 2001). Par exemple, chez la sauterelle *Requena verticalis*, les mâles nourris sur une alimentation appauvrie en protéines produisent des spermatophores de tailles similaires à ceux nourris avec plus de protéines mais réduisent leur comportement d'appel (et donc leur capacité à attirer des femelles), probablement parce qu'ils disposent de moins d'énergie à allouer à leurs différentes fonctions (Simmons et al. 1992).

Les éjaculats complexes contiennent plus que simplement des spermatozoïdes (Fig. 6, composition de l'éjaculat) et toutes les substances qu'ils renferment sont susceptibles d'influencer l'aptitude phénotypique des deux sexes à travers des effets sur la physiologie de la femelle, son comportement et ses traits d'histoire de vie ainsi qu'en modifiant le résultat de la compétition entre les mâles rivaux (Wedell et al. 2002, Gillot 2003, Avila et al. 2011, Perry et al. 2013) (Fig. 6, effets « post-accouplement »). De plus, puisque les mâles payent un coût physiologique important à la production de tels éjaculats (Dewsbury 1982, Harshman & Zera 2007), de nombreux facteurs environnementaux et sociaux sont susceptibles d'influencer leur qualité à travers notamment la quantité de ressources investie dans ces offrandes nutritives (Fig. 6, effets « pré-accouplement », Boggs 2009, Perry & Rowe 2010). La qualité du spermatophore a généralement été appréhendée en mesurant sa taille ou sa masse : plus un éjaculat est gros, plus il est considéré comme riche en bénéfices pour les femelles (South & Lewis 2011). Le tableau 2 récapitule l'ensemble des facteurs influant sur la taille du spermatophore (et sur la quantité de fluides séminaux) étudiés au cours des trente dernières années. Ce tableau synthétique met en évidence d'importants déséquilibres dans le nombre d'études consacrées à chaque facteur pour chacun des différents ordres d'insectes chez lesquels ces éjaculats complexes sont produits.

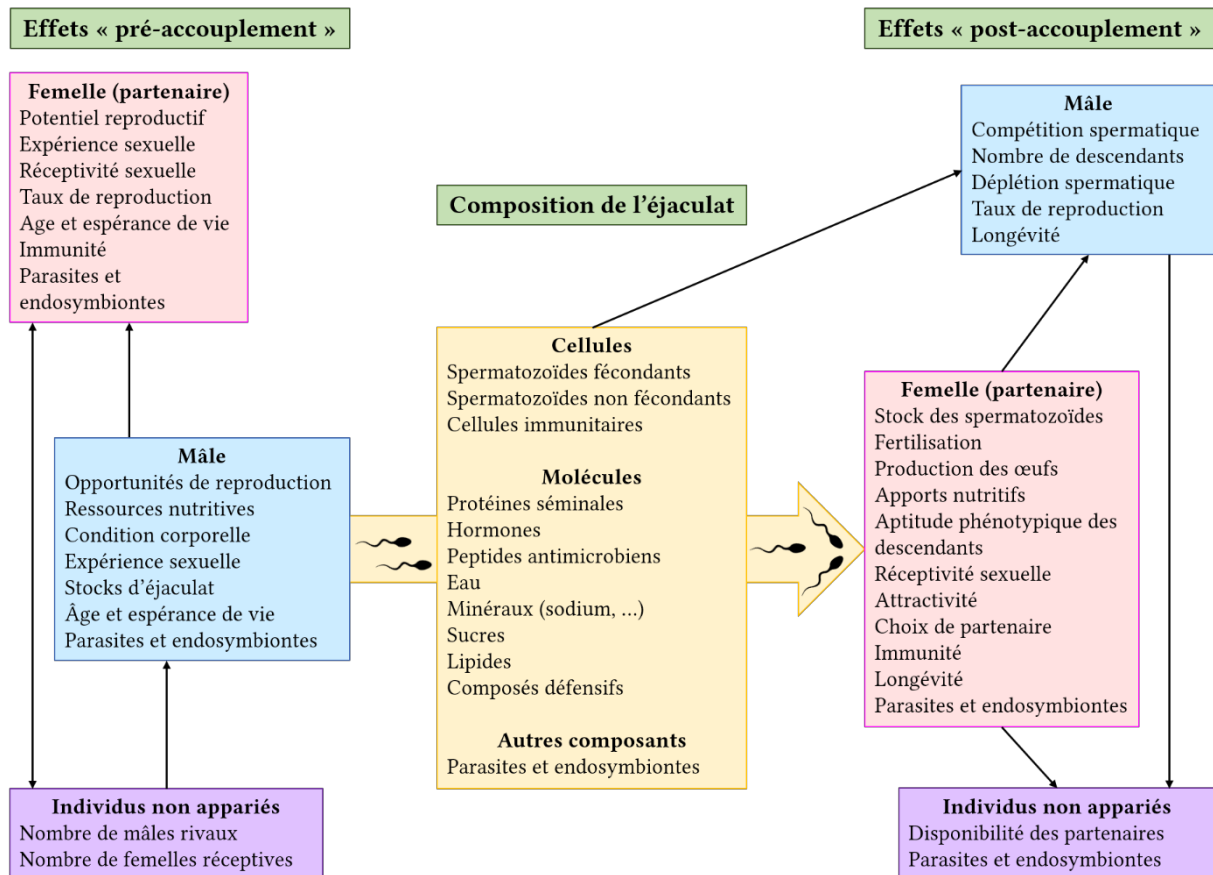


Figure 6 : Différents composants formant l'éjaculat des mâles qui sont influencés et influencent une large variété de facteurs (représentés par les encadrés bleus pour les mâles, roses pour les femelles, et violets pour les individus non-appariés dans la population). L'encadré jaune contient la liste des composants présents dans l'éjaculat des mâles et la flèche jaune représente le transfert de l'éjaculat des mâles aux femelles. Les flèches noires indiquent les relations entre les facteurs et les individus (figure traduite à partir de celle présentée dans Perry et al. 2013).

Il ressort tout d'abord de ces études que la taille de l'éjaculat est souvent positivement corrélée à la masse du mâle (Vahed & Gilbert 1996 pour une revue chez les Orthoptères), plus les mâles sont gros, plus ils disposent de réserves énergétiques à investir dans la reproduction (Boggs 1990). De plus, la quantité de sperme et de nutriments contenus dans le spermatophore augmente avec l'âge du mâle au premier accouplement (Wedell & Ritchie 2004, Lehmann et al. 2009). Les mâles transfèrent également des spermatophores dont la taille diminue avec le nombre d'accouplements successifs (Torres-Vila & Jennions 2005 pour une revue chez les Lépidoptères), les mâles investissant généralement beaucoup de ressources dans leur premier spermatophore. De plus, la compétition spermatique, évaluée à travers la présence de mâles rivaux avant et/ou pendant l'accouplement (Xu & Wang 2014) ou à travers l'évaluation du statut sexuel de la femelle (*i.e.* si elle est vierge ou si elle s'est déjà accouplée) (Larsdotter-Mellström et al. 2015), module également l'investissement dans l'éjaculat (voir Kelly & Jennions 2011 pour une revue générale). Enfin, chez les insectes, les performances sexuelles

des mâles dépendent largement de leur condition (définie d'après Rowe & Houle (1996) comme « *la quantité de ressources disponibles à allouer dans différents traits* »), qui est notamment influencée par les ressources acquises pendant leur développement juvénile (Cotton et al. 2004, Amitin & Pitnick 2007). Ainsi, les mâles qui reçoivent une nourriture de qualité pendant leur développement larvaire (souvent constituée d'une alimentation artificielle enrichie en certains nutriments) sont plus gros à l'émergence (David et al. 2000, Bonduriansky 2007, Fricke et al. 2015), disposent de plus de réserves énergétiques et, par conséquent, produisent de plus gros spermatophores (Perry & Rowe 2010, Lewis et al. 2011, Tigreros 2013). En plus de la nutrition larvaire, l'acquisition de ressources à l'état adulte peut aussi influencer la taille du spermatophore transféré par les mâles, notamment à travers le butinage de nectar chez certaines espèces de Lépidoptères (Cahenzli & Erhardt 2013).

Tableau 2 : Nombre d'études ayant examiné un ou plusieurs facteurs influençant la taille du spermatophore (ou la quantité de fluides séminaux libres) chez différents ordres d'insectes. Les études présentées proviennent de la base de données Web of Science, la recherche datant du 15/09/2015.

Facteurs mesurés	Ordre d'insecte	Nombre d'études
Masse du mâle	Lépidoptères	26
	Orthoptères	15
	Coléoptères	8
	Diptères	1
	Tous les ordres confondus	50
Expérience sexuelle du mâle	Lépidoptères	31
	Orthoptères	7
	Coléoptères	5
	Tous les ordres confondus	43
Âge au premier accouplement	Lépidoptères	17
	Coléoptères	5
	Mégaloptère	4
	Orthoptères	1
	Tous les ordres confondus	27
Compétition spermatique	Lépidoptères	8
	Orthoptères	8
	Coléoptères	3
	Diptères	1
	Tous les ordres confondus	20
Nutrition larvaire	Lépidoptères	12
	Orthoptères	2
	Coléoptères	2
	Tous les ordres confondus	16
Nutrition adulte	Lépidoptères	9
	Orthoptères	3
	Coléoptères	1
	Tous les ordres confondus	13

Pour résumer, la plupart de ces travaux s'accordent à dire que la taille du spermatophore dépend principalement de la « qualité du mâle » à travers notamment sa condition physiologique et la quantité de ressources qu'il peut allouer à la reproduction (Perry & Rowe 2010). Assez curieusement, les facteurs directement responsables du pool de ressources énergétiques dont disposent les mâles – à savoir leur nutrition larvaire et/ou adulte – sont ceux qui ont reçu le moins d'attention dans la communauté scientifique (Tableau 2, par exemple la nutrition larvaire et adulte chez les Lépidoptères ne concernent respectivement que 12 et 9% des études). Plus étonnant encore, ces études, qui concernent toutes des insectes phytophages, n'ont quasiment jamais appréhendé l'effet de la nutrition larvaire à travers différentes qualités de plantes hôtes, préférant standardiser leur protocole en utilisant des milieux artificiels enrichis en nutriments (et notamment en protéines) (voir Delisle & Bouchard 1995, Cook & Wedell 1996, Delisle & Hardy 1997 et Fox et al. 2006 pour les 4 seules exceptions). Or, chez les insectes phytophages, la qualité de la nutrition larvaire et/ou adulte repose principalement sur la « qualité » des plantes hôtes qu'ils exploitent au cours de leur vie (Awmack & Leather 2002, Boggs & Freeman 2005). Ainsi, l'influence de la qualité de la plante hôte sur le succès reproducteur des mâles phytophages (et sur leur capacité à produire des spermatophores de qualité) a été trop largement ignorée par le passé et mérite d'être remise sur le devant de la scène.

2.4 UN FACTEUR CLÉ DU SUCCÈS REPRODUCTEUR DES PHYTOPHAGES : LA PLANTE HÔTE

La qualité de la plante hôte en tant que source de nourriture est déterminante pour la survie et le développement des stades juvéniles de l'insecte et *in fine* affecte fortement la taille et les performances reproductives des adultes (Awmack & Leather 2002 pour une revue). La qualité d'une plante peut être définie par tout un ensemble d'attributs de la plante, physiques (présence de poils, rugosité des feuilles) et plus généralement chimiques (métabolites primaires et secondaires) qui affectent positivement ou négativement les performances des insectes exploitant cette plante. En général, une plante riche en nutriments permet aux larves de se développer rapidement et de stocker une large variété de nutriments jusqu'à la mue imaginale (De Bryun et al. 2002).

La vaste majorité des études qui se sont intéressées aux effets de la plante hôte sur les capacités reproductives des espèces phytophages se sont généralement concentrées uniquement sur les femelles (voir Awmack et Leather 2002 et Jervis et al. 2005 pour deux revues complètes), notamment parce qu'il a longtemps été considéré que seules les femelles payaient de larges coûts à la reproduction (Bateman 1948, Harshman & Zera 2007). À

l'émergence, les femelles disposent d'une grande quantité de ressources énergétiques à investir dans la reproduction et une relation positive est fréquemment observée entre la masse des femelles (reflétant leur condition corporelle) et leur fécondité (Honěk 1993, Calvo et Molina 2005, Rhainds 2015). De manière générale, la nutrition larvaire apparaît comme l'un des principaux facteurs limitants de la reproduction des femelles (Awmack & Leather 2002) notamment chez les espèces à reproduction sur capital (également appelés insectes proto-ovigéniques) chez lesquelles seules les larves sont capables de se nourrir (Jervis et al. 2005, Moreau & Thiéry 2013). En revanche, chez les insectes synovygéniques (qui peuvent s'alimenter à l'état adulte), la nutrition adulte est également un déterminant important du potentiel reproductif des femelles, ces dernières boostant leur fécondité à travers les acides aminés qu'elles récupèrent dans le nectar des fleurs (Jervis et al. 2005, Mevi-Schütz & Erhardt, 2005, Cahenzli & Erhardt 2012^a). Outre l'importance de la plante en termes de ressources nutritives, les stratégies de ponte des femelles dépendent aussi intimement de la qualité des plantes disponibles dans leur environnement. Le choix du site de ponte résulte généralement d'un compromis entre pondre ses œufs sur une plante qui favorise le développement de sa progéniture (« théorie de la ponte optimale », West & Cunningham 2002) ou les pondre sur une plante qui procure des bénéfices à la femelle, par exemple pour les espèces synovygéniques, en termes d'apport d'acides aminés via le nectar butiné (Friberg et al. 2015). Une méta-analyse récente offre un support clair au principe du « *mothers know best* » : les femelles pondent préférentiellement leurs œufs sur les plantes sur lesquelles leurs descendants survivent le mieux (Gripenberg et al. 2010), influençant de manière indirecte la future qualité reproductive de leur progéniture.

Si les relations intimes entre les femelles phytophages et leur plantes hôtes ont été largement étudiées, en revanche très peu de travaux ont examiné l'effet de la plante hôte sur la reproduction des mâles phytophages. Quelques études ont démontré un effet de l'alimentation adulte sur les performances reproductives des mâles, notamment chez des espèces de papillons se nourrissant de nectar (Watanabe & Hirota 1999, Lewis & Wedell 2007, Cahenzli & Erhardt 2013) ou récupérant des micronutriments spécifiques comme des acides aminés ou des sels minéraux dans des milieux humides (« *puddling behaviour* ») (Lederhouse et al. 1990, Watanabe & Kamikubo 2005, Niihara & Watanabe 2009). Par exemple, les mâles de plusieurs espèces de Papilionidae récupèrent des ions sodium dans les flaques de boue qui améliorent leurs performances sexuelles (Molleman 2010). Ces ions sont transférés dans les spermatophores produits par les mâles et boostent également le potentiel reproductif des femelles avec lesquels ces mâles s'accouplent (Smedley & Eisner 1996, Molleman et al. 2004).

L'effet de la qualité de la plante hôte en tant qu'alimentation larvaire sur la reproduction des mâles, quant à elle, n'a reçu que très peu de supports empiriques. Parmi les quelques travaux menés sur les Lépidoptères, une première étude a démontré chez la piéride de la rave (*Pieris rapae*) qu'une alimentation larvaire sur deux plantes hôtes différentes (l'alliaire officinale, *Alliaria petiolata* et la capucine, *Tropaeolum majus*) affectait la taille des spermatophores produits par les mâles mais pas le nombre de spermatozoïdes transférés pendant leur premier accouplement (Cook & Wedell 1996). Deux autres études rapportent également un effet de la qualité de la plante hôte sur les performances reproductives des mâles qui en retour affectent le potentiel reproductif des femelles chez la tordeuse à bandes obliques (*Choristoneura rosaceana*) et la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*C. fumiferana*) (Delisle & Bouchard 2005, Delisle & Hardy 1997). Par exemple, chez la tordeuse à bandes obliques, les mâles nourris pendant leur développement larvaire avec du noisetier à long bec (*Corylus cornuta*), une plante hôte de faible qualité nutritive, ont un succès reproducteur plus faible et produisent de plus petits spermatophores que les mâles nourris avec de l'érable de Pennsylvanie (*Acer pensylvanicum*), plante de meilleure qualité. En retour, les femelles s'accouplant avec les mâles nourris sur le noisetier pondent moins d'œufs et produisent moins de descendants que celles s'accouplant avec des mâles nourris sur l'érable. Puisque la nutrition larvaire influence la qualité des cadeaux nuptiaux offerts par les mâles aux femelles pendant l'accouplement, la qualité de la plante semble donc susceptible d'influencer la contribution des mâles à la production d'œufs fertiles (Boggs 1995). Cependant, les études à ce sujet restent anecdotiques (seules 4 études référencées) et cette relation entre qualité de la plante, qualité du mâle et potentiel reproductif des femelles mériterait d'être vérifiée chez d'autres espèces afin de pouvoir tirer des conclusions générales sur les relations existant entre ces trois compartiments chez les insectes phytophages.

Enfin, en plus de servir de lieu de « rendez-vous » où les partenaires sexuels se rencontrent et s'accouplent (Ward 1991), les plantes hôtes jouent également un rôle important dans la sécrétion de phéromones sexuelles favorisant la rencontre entre les deux partenaires (McNeil & Delisle 1989, Landolt & Phillips 1997, Eisner & Meinwald 2003). Ainsi l'émission de phéromones est parfois dépendante de la présence de la plante hôte. En effet, certains insectes émettent des phéromones en réponse à des indices spécifiques produits par les plantes. Par exemple, chez la noctuelle *Helicoverpa zea*, la perception de signaux chimiques volatiles émis par les soies du maïs (incluant la phytohormone éthylène) induit la production de phéromones sexuelles par les femelles (Raina et al. 1992). Certains composés de la plante (notamment des métabolites secondaires) peuvent aussi être séquestrés par les insectes

pendant leur développement larvaire et ces molécules participeront au bouquet phéromonal produit par les adultes pour attirer des partenaires sexuels (Reddy & Guerrero 2004). Les signaux chimiques représentent le mode principal de communication chez de nombreuses espèces d'insectes (Wyatt 2014). Si la plante hôte influence la production de phéromones, elle peut donc jouer un rôle important dans les patrons d'appariements entre individus sauvages, influençant les probabilités de rencontre entre partenaires sexuels *in natura*.

La plante hôte apparaît donc comme un facteur déterminant dans l'évolution de la dynamique des populations de phytophages, pouvant potentiellement influencer le succès reproducteur des femelles directement (via leur alimentation larvaire et/ou adulte) et indirectement en affectant les capacités reproductives des mâles avec lesquels ces femelles se reproduisent. Ainsi, chez les insectes phytophages, puisque la qualité des mâles et des femelles en tant que partenaires sexuels dépend directement de leur nutrition sur différentes plantes hôtes, on devrait s'attendre à voir émerger une évolution des stratégies de choix de partenaire de la part des deux sexes, en fonction du « contexte écologique ».

2.5 CHOIX DE PARTENAIRE MODULÉ PAR LE CONTEXTE ÉCOLOGIQUE

La reproduction est un processus coûteux à la fois pour les mâles et les femelles et dépend largement des ressources énergétiques dont les deux partenaires disposent à l'émergence (Boggs 1997^a). Pour les femelles, la production d'œufs est coûteuse et dépend de la quantité de lipides et de protéines investie dans les ovocytes en maturation (Mevi-Schütz & Erhardt 2003). Ainsi, en raison du fort investissement dans la production de leurs œufs (Fischer & Fiedler 2001, Mevi-Schütz & Erhardt 2003), les femelles devraient avoir développé des stratégies de choix de partenaire afin de sélectionner des mâles de « qualité », c'est-à-dire des mâles capables d'assurer la fécondation de leurs œufs et pouvant également leur apporter de nombreux bénéfices à travers des offrandes riches en nutriments (Andersson & Simmons 2006, Kokko et al. 2006). À quel point la taille de l'éjaculat influence le potentiel reproductif des femelles dépend grandement du contexte écologique de l'espèce considérée. Chez les espèces à reproduction sur capital, recevoir des substances nutritives du mâle pendant l'accouplement est particulièrement avantageux pour les femelles, ces dernières n'ayant accès à aucune ressource alimentaire une fois adultes (Boggs & Freeman 2005, Boggs 2009). En effet, puisque les femelles doivent compter uniquement sur les réserves qu'elles ont accumulées pendant leur développement larvaire, tout apport supplémentaire en nutriments via de larges éjaculats représente une ressource cruciale qu'elles pourront investir dans leur reproduction. De plus, les femelles monandres qui ne s'accouplent qu'une seule fois au cours de leur vie

devraient se montrer les plus sélectives en choisissant un mâle de la meilleure qualité possible, capable de leur fournir de larges bénéfices (Jones 2001, Velde et al. 2011). Chez les insectes phytophages, la « qualité » des mâles en tant que partenaires sexuels dépend directement de leurs performances reproductives qui, comme on l'a vu précédemment, devrait largement être contrainte par les ressources nutritives acquises pendant leur développement larvaire et/ou adulte sur différentes plantes hôtes. Ainsi, il est important d'identifier quels facteurs sont susceptibles d'affecter le succès reproducteur des mâles pour comprendre sur quels critères les femelles peuvent se baser pour sélectionner leur partenaire et ainsi disposer d'une vision plus globale de l'évolution des stratégies de choix de partenaire chez les insectes phytophages.

Par ailleurs, ce rôle conventionnel des sexes, à savoir que les femelles sont sélectives et choisissent parmi différents mâles en compétition en raison d'une contrainte physiologique (l'anisogamie) peut être réversible et concerner les mâles (voir Bonduriansky 2001 pour une revue). En effet, il a par exemple été démontré que les mâles préfèrent s'accoupler avec des femelles vierges et/ou plus fécondes (Johnson & Hubbell 1984, Schneider et al. 2011) et sont capables d'ajuster la taille de leur éjaculat en fonction de l'intensité de la compétition spermatique (voir la méta-analyse de Kelly & Jennions 2011). De plus, chez les insectes phytophages, on peut s'attendre à observer une inversion du rôle des sexes et à l'évolution d'un choix des mâles puisque la production d'éjaculats représente un coût reproductif important, notamment chez les espèces transférant des cadeaux nuptiaux endogènes (Oberhauser 1989, Scharf et al. 2013). C'est par exemple le cas de l'Ephippigère des vignes (*Ephippiger ephippiger*), espèce chez laquelle les mâles produisent un spermatophore représentant 40% du poids total de leurs corps (Gwynne & Simmons 1990). Étant donné l'imposant coût de production d'un tel spermatophore, la qualité de la nourriture ingérée par les mâles influence largement leur capacité à transférer des spermatophores et *in fine* leur degré de sélectivité envers les femelles (Ritchie et al. 1998). Ainsi, sur une alimentation de haute qualité, un rôle conventionnel des sexes est observé alors que sur une alimentation de faible qualité, les mâles deviennent le sexe qui choisit, rejetant fréquemment les femelles.

Chez les insectes phytophages, puisque chacun des deux partenaires peut varier en qualité reproductive en fonction de la qualité de la plante hôte exploitée à l'état larvaire, les deux sexes sont supposés se montrer sélectifs envers leurs partenaires (Jennions & Petrie 2000, Edward & Chapman 2011). La plante hôte apparaît donc comme une pierre angulaire des stratégies de reproduction des insectes phytophages et l'évolution de choix de partenaire devrait largement dépendre des contraintes environnementales éprouvées par les deux sexes.

3. PRINCIPAUX OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'ensemble de ce travail se situe à l'interface entre les relations plantes-insectes, la sélection sexuelle et l'évolution des stratégies de choix de partenaire. Afin d'évaluer l'importance du rôle du mâle dans les stratégies de reproduction des insectes phytophages, il convient d'utiliser un modèle biologique chez lequel les mâles, à travers leurs performances reproductives condition-dépendantes, contribuent de manière significative au potentiel reproductif des femelles. Ainsi, l'Eudémis (*Lobesia botrana*) se révèle être un candidat idéal pour répondre à ces questionnements, cette espèce étant (i) monandre, les femelles ne s'accouplant en moyenne qu'une fois au cours de leur vie, (ii) à reproduction sur capital, les adultes émergeant avec une quantité de ressources finie à investir et (iii) limitée dans son potentiel reproductif, les mâles transférant des spermatophores coûteux à produire pendant l'accouplement et les femelles étant limitées dans la production de leurs œufs. Ces avantages sont détaillés dans le Chapitre II qui contient également une large description de la biologie de ce ravageur ainsi que la méthodologie générale utilisée au fil des différentes expériences.

L'un des principaux objectifs de ma thèse est d'évaluer les facteurs responsables des variations dans le succès reproducteur des mâles qui en retour, devraient avoir d'importantes répercussions sur le potentiel reproductif des femelles (voir la Figure 7 pour une description détaillée des facteurs étudiés au cours de ma thèse).

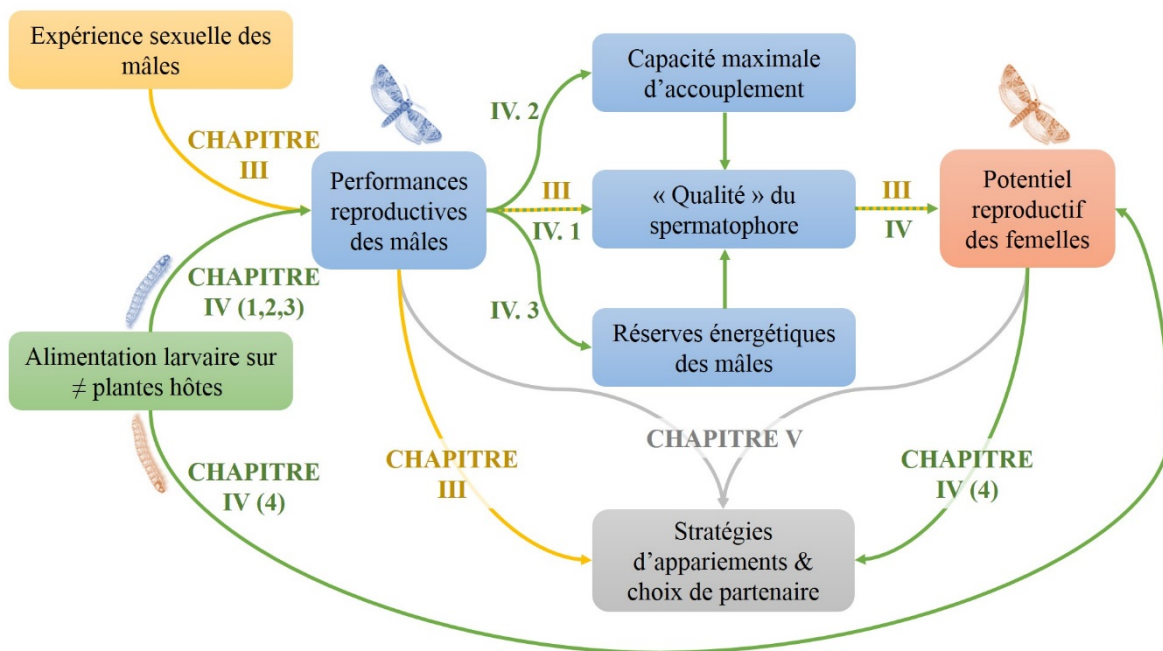


Figure 7 : Représentation schématique des différents facteurs influençant le succès reproducteur des mâles et des femelles abordés au cours de cette thèse et chapitres associés (les flèches en jaune concernent le chapitre III, celles en verte le chapitre IV et celle en grise le chapitre V).

Dans un premier temps, le rôle de la « qualité » du mâle sur les comportements précopulatoires et sur le potentiel reproductif des femelles a été examiné sur des individus d'élevage nourris avec du milieu semi-artificiel (Chapitre III). La qualité du mâle a été appréhendée à travers la taille du spermatophore qu'il transfère aux femelles pendant l'accouplement, cette taille dépendant fortement de l'expérience sexuelle du mâle (*i.e.* s'il est vierge ou s'il s'est déjà accouplé). Ainsi, le potentiel reproductif des femelles accouplées avec des mâles vierges ou non-vierges a été mesuré ainsi que leur motivation à se réaccoupler. Enfin, l'existence ou non d'un choix de partenaire de la part des femelles en fonction du statut sexuel de leur partenaire (vierge ou non-vierge) a été exploré (Chapitre III et Manuscrit 1).

La seconde étape de cette thèse a été d'évaluer à quel point l'alimentation larvaire sur différents cépages de vigne pouvait moduler la qualité des spermatophores produits par les mâles, et en retour influencer le potentiel reproductif des femelles (Chapitre IV). Pour cela trois expériences ont été menées sur des individus provenant de populations naturelles. Dans un premier temps, les performances reproductives des mâles pendant leur premier accouplement ont été évaluées en fonction du cépage sur lequel ils avaient effectué leur développement larvaire (Chapitre IV.1 et Manuscrit 2). Une seconde étude a consisté à examiner les capacités d'accouplement des mâles en fonction de leur cépage d'origine en proposant, chaque jour, une nouvelle femelle au même mâle jusqu'à sa mort. Cette expérience a permis d'évaluer combien de fois le mâle était capable de s'accoupler au cours de sa vie, quel était son investissement (en termes de spermatophore et de spermatozoïdes) au cours des accouplements successifs et quelles conséquences cela pouvait entraîner sur la fécondité et la fertilité des femelles (Chapitre IV.2 et Manuscrit 3). Enfin, dans la troisième étude, nous avons quantifié l'effet du cépage de vigne sur les réserves énergétiques des mâles adultes (concentrations en protéines, lipides et glycogène) et sur différents traits morphologiques (condition corporelle) et reproductifs (taille du spermatophore et quantité de protéines) pouvant influencer le potentiel reproductif des femelles chez cette espèce (Chapitre IV.3 et Manuscrit 4). Pour terminer, en raison du fort investissement du mâle dans la production de spermatophores, nous avons essayé de mettre en évidence dans une courte étude complémentaire, l'existence d'un choix de partenaire de la part de mâles provenant du laboratoire en fonction du cépage d'origine de leur partenaire sexuelle, facteur susceptible de moduler leur potentiel reproductif (Fig. 7 ; Chapitre IV.4).

Le Chapitre IV ayant mis en évidence des variations dans les performances reproductives des mâles en fonction de leur cépage d'origine, et sachant par ailleurs que le

cépage de vigne influence également le potentiel reproductif des femelles (Moreau et al. 2006^{a,b,c}, Chapitre IV.4), une dernière étude a été menée en populations naturelles afin d'examiner les patrons d'appariements entre partenaires provenant de différents cépages. Ainsi, puisque le cépage module grandement la qualité reproductive des deux sexes, on peut s'attendre à observer des stratégies d'appariement variables entre partenaires en fonction de leur cépage d'origine. De plus, si un choix de partenaire cépage-dépendant existe chez cette espèce, on pourrait voir émerger des barrières pré et post-zygotiques entre individus provenant de différents cépages, pouvant conduire à la formation de races d'hôtes chez cette espèce. Nous avons donc examiné l'existence de telles barrières (notamment des barrières prézygotiques) à l'origine d'un possible isolement reproductif en sympatrie, entre mâles et femelles ayant effectué leur développement sur différents cépages de vigne (Chapitre V, Manuscrit 5). De plus, nous avons également examiné ces patrons d'appariements en allopatrie, entre individus provenant de différents sites géographiques séparés de quelques centaines de kilomètres et ayant tous effectué leur développement larvaire sur le même cépage, ces croisements servant de contrôle à une plus large échelle géographique (Chapitre V, Manuscrit 5).

Cette étude s'achèvera sur une discussion générale regroupant les principaux résultats obtenus sur l'importance du rôle du mâle – via sa nutrition larvaire sur différents cépages – sur le potentiel reproductif des femelles et sur l'évolution de stratégies de choix de partenaire chez cette espèce phytophage. L'apport de ces résultats sera discuté en regard des implications possibles dans les programmes de lutte contre ce ravageur des cultures.

CHAPITRE II

MATÉRIEL & MÉTHODES GÉNÉRALES

1. MODÈLES BIOLOGIQUES

1.1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES

1.1.1 La vigne (*Vitis vinifera*)

L'histoire de la vigne et du vin remonte au Néolithique, la première domestication de la vigne serait apparue il y a 7000 ans avant J.-C. dans l'aire transcaucasienne (McGovern 2003), s'étendant ensuite progressivement du sud-est asiatique vers l'ouest du bassin méditerranéen. Elle est aujourd'hui présente sur plus de 8 millions d'hectares à travers le monde, la France occupant la 2^{ème} position mondiale derrière l'Espagne avec environ 755 000 ha de vigne en production en 2013 (d'après FranceAgriMer). La longue histoire de la viti-viniculture a conduit à la production d'une grande diversité de cépages issus de croisements naturels ou de sélections à partir du genre *Vitis vinifera* (Vitales: Vitaceae). En France, les vignobles occupent 1,7% du territoire cultivé (Loubère 2014) (Fig. 8), certaines régions regroupant des cépages typiques, parfois apparentés, comme par exemple les « noirs » en Bourgogne, comprenant notamment le Pinot Noir et le Chardonnay (Bowers et al. 1999).



Figure 8 : Carte répertoriant les 16 différents vignobles français (modifié d'après www.vin-vigne.com).

Les propriétés des cépages comptent parmi les premiers facteurs influant sur la typicité des vins, régaland les papilles des œnophiles mais profitant aussi à de nombreuses autres espèces... Comme toutes les grandes cultures, la vigne est la cible privilégiée de nombreux pathogènes qui sont responsables de dégâts considérables conduisant parfois à l'arrachage de parcelles entières. Parmi les plus fréquents, on peut citer des champignons tels que l'Oïdium (*Uncinula neactor*), le Mildiou (*Plasmopora viticola*) et les pourritures grises (*Botrytis cinerea*) ou noires (*Aspergillus niger*) (Thiéry 2008). De nombreuses espèces d'insectes causent également d'importants dommages, soit directement – en se nourrissant des baies de raisin détruisant ainsi les grappes, *i.e.* les ravageurs phytophages, soit indirectement – par exemple en contaminant la vigne avec un phytoplasme, comme la cicadelle (*Scaphoideus titanus*), vecteur du phytoplasme de la flavescence dorée de la vigne (*Candidatus Phytoplasma sp.*). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée en particulier à l'une des principales espèces de ravageurs phytophages de la vigne : l'Eudémis, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae).

1.1.2 L'Eudémis (*Lobesia botrana*)

L'Eudémis (*L. botrana*) a été décrite pour la première fois en 1775 par deux entomologistes autrichiens, Johann Denis et Ignaz Schiffermüller. Les premiers ravages qu'elle a occasionnés dans les vignobles français n'ont été signalés qu'à la fin du XIX^{ème} siècle (Balachowsky & Mesnil 1935). Alors qu'elle était présente de manière anecdotique sur les treilles de raisin, des dégâts apparaissent en pleine vigne à partir de 1890 dans les Alpes-Maritimes. Elle s'est rapidement propagée dans tout le vignoble français en une trentaine d'années. Cette rapide colonisation est certainement liée à l'augmentation de la vitesse de croissance et du rendement des vignes européennes replantées suite à la crise phylloxérique ainsi qu'à l'augmentation des surfaces viticoles (Thiéry 2005). Cette espèce est encore en pleine expansion géographique puisqu'elle a récemment colonisé les vignobles américains, apparaissant en 2008 au Chili et en 2009 en Californie (Gilligan et al. 2011) (Fig. 9).

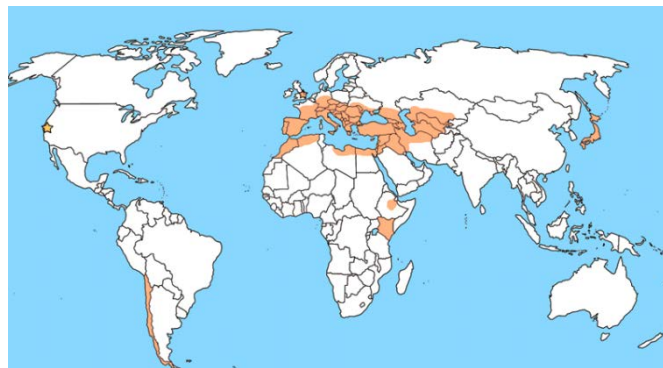


Figure 9 : Distribution à l'échelle mondiale des populations de *L. botrana* avec une apparition récente en 2009 en Californie (étoile), image tirée du « Practical Winery & Vineyard » (Varela et al. 2010).

L'Eudémis fait partie de la famille des Tordeuses, qui ont la particularité d'enrouler et de tordre les feuilles (ici de vigne) et qui regroupe également des espèces frugivores comme la Cochylis de la vigne (*Eupoecilia ambiguella*), la carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) ou la Tordeuse orientale du pécher (*Grapholita molesta*). Les chenilles peuvent causer des destructions importantes des baies à tous leurs stades de développement, altérant la qualité du vin (Fig. 10a). Les morsures des chenilles favorisent également le développement de champignons pathogènes (Fig. 10b) comme la pourriture grise (*B. cinerea*) ou noire (*A. niger*).

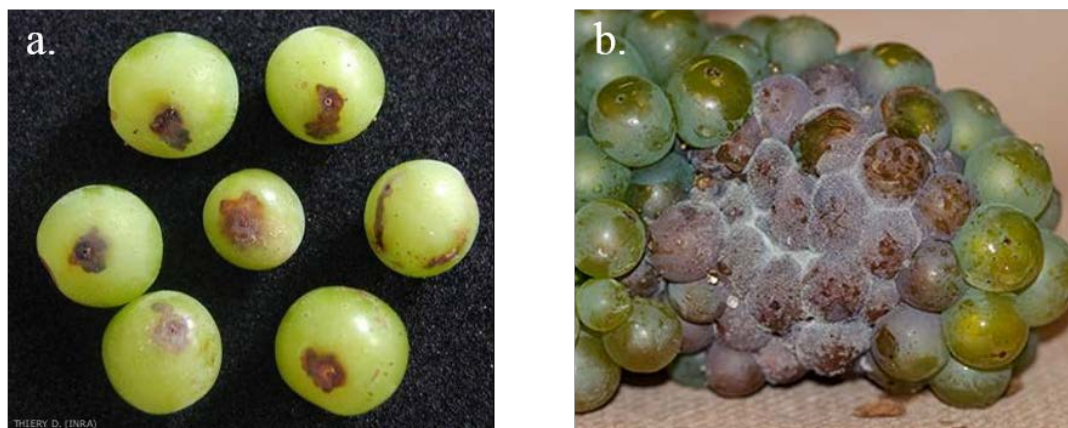


Figure 10 : Photographies de (a) perforations des baies avant véraison par des chenilles *L. botrana* et (b) dégâts caractéristiques de la pourriture grise *Botrytis cinerea* sur une grappe.

D'un point de vue morphologique, cette espèce est un microlépidoptère nocturne (6 à 8 mm de long avec une envergure de 18 à 20 mm), les adultes présentant des ailes de couleurs ternes repliées en toit et des antennes filiformes (Fig. 11c). Les chenilles, de couleurs variant entre le jaune verdâtre et le brun clair (Fig. 11a), effectuent 5 stades larvaires en général sur la même grappe (Torres-Vila et al 1997^b) puis se transforment en chrysalides dans les grappes, sur les feuilles ou sous les écorces. La masse des chrysalides est parfaitement corrélée à celle des adultes, les femelles étant généralement plus grosses que les mâles (Fig. 11b).



Figure 11 : Photographies des différents stades de développement chez Eudémis : a) chenille au 5^{ème} stade larvaire, b) chrysalides d'une femelle en haut à gauche et d'un mâle en bas à droite et c) femelle adulte.

Cette espèce est plurivoltine (effectuant entre 2 et 4 générations par an) et affectionne les vignobles plutôt chauds et secs, expliquant sa prédominance dans le bassin méditerranéen. La première génération d'œufs est généralement pondue en mai, les chenilles se développant sur des boutons en floraison (stades 15-25, Eichhorn & Lorenz 1977) et tissant « un nid » appelé glomérule entre les boutons floraux agglomérés (Fig. 12). Les larves de la seconde génération émergent début juillet et se nourrissent de baies de taille « petit pois » (stades 27-33). Enfin, la troisième génération se développe entre mi-août et mi-septembre sur des baies de raisin mûres (stades 35-38) (Fig. 12). Cette espèce n'est cependant pas exclusivement inféodée à la vigne, les populations naturelles sont en effet polyphages et se nourrissent sur plus d'une trentaine de plantes hôtes alternatives appartenant à diverses familles (Thiéry 2008). Cependant, la vigne représente l'hôte le plus disponible tant dans l'espace que dans le temps, sa longue période de floraison-fructification permettant à *Eudémis* de réaliser son cycle biologique dans sa totalité (Galet 1982).

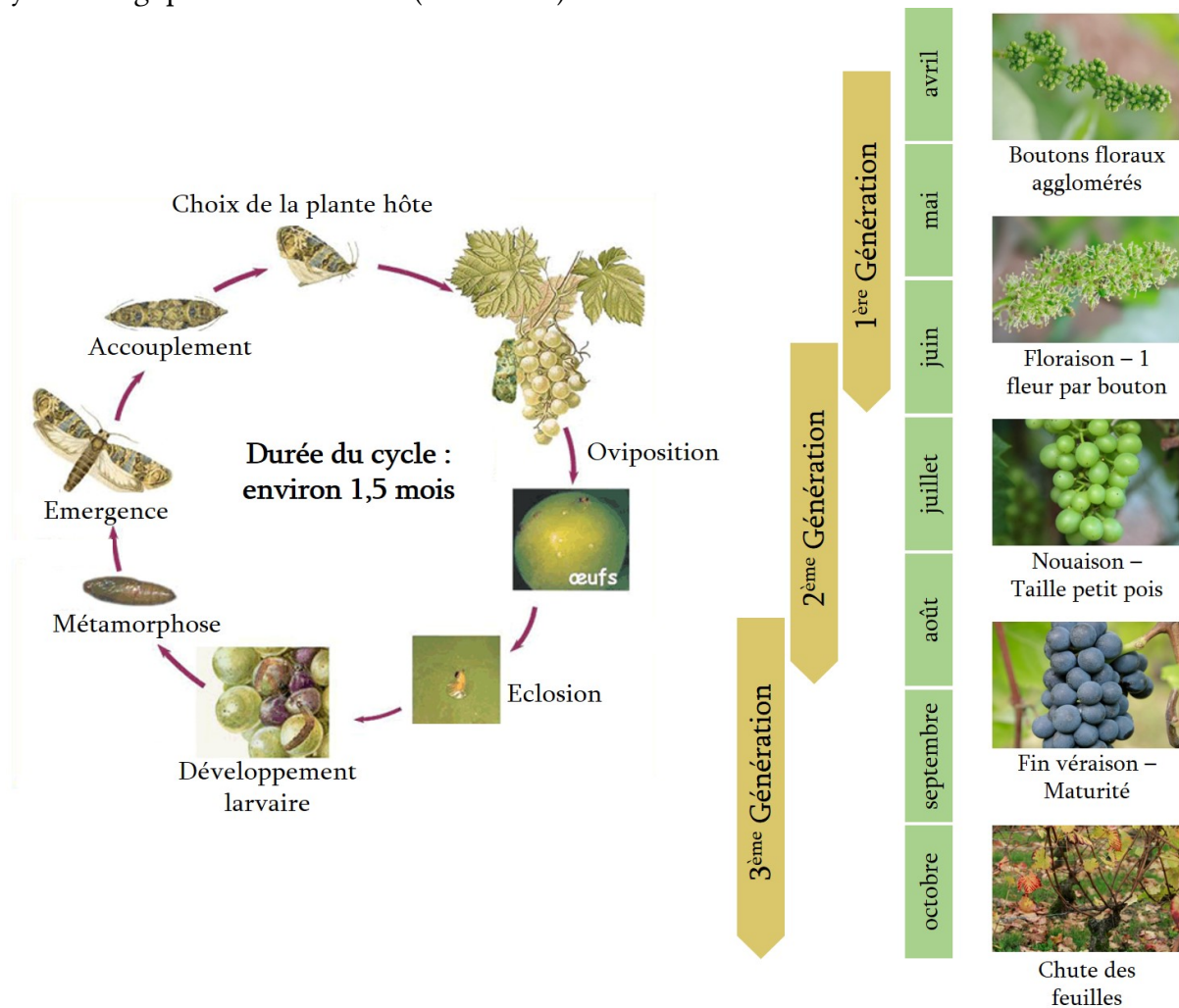


Figure 12 : Cycle annuel de l'*Eudémis*, *L. botrana* avec trois générations s'étalant d'avril à octobre sur différents stades phénologiques de la vigne (modifié d'après Thiéry, 2008, photographies issues du site www.vins-bourgogne.fr).

1.2 MODES DE REPRODUCTION CHEZ EUDÉMIS

L'Eudémis est une espèce à reproduction sur capital (dite également proto-ovigénique), signifiant que la maintenance somatique et la reproduction des adultes dépendent exclusivement des réserves énergétiques accumulées pendant leur développement larvaire, ces derniers ne s'alimentant pas durant leur courte vie (< 1 semaine *in natura*) (Thiéry 2008). Les adultes émergent ainsi avec une quantité finie de ressources à allouer à différents traits (survie, reproduction...), qui dépend directement de leur alimentation pendant les stades juvéniles (Thiéry & Moreau 2005, Moreau et al. 2006^c, Moreau et al. 2007).

Pour chacune des générations au cours d'une année, les premiers mâles émergent avant les premières femelles, cette protandrie étant en général de 2 à 3 jours (Thiéry et al. 2014). La protandrie est commune chez de nombreuses espèces d'insectes et présente au moins deux avantages : les mâles émergeant plus tôt que les femelles peuvent maximiser le nombre d'opportunités reproductives au cours de leur vie (Morbey & Ydenberg 2001). De plus, ils sont prêts à s'accoupler quand les premières femelles émergent, les mâles étant sexuellement matures environ 12 heures après l'émergence (observations personnelles). Ils peuvent ensuite s'accoupler une fois par jour, jusqu'à leur mort, le record en laboratoire étant de 15 accouplements pour un mâle (Torres-Vila et al. 1999). Les femelles sont aussi capables de s'accoupler plusieurs fois durant leur vie, néanmoins cette espèce est classiquement considérée comme monandre, la plupart des femelles ($\sim 70\%$) n'ayant qu'un seul accouplement durant toute leur vie. Une proportion, certes faible, de femelles ($< 30\%$) aura tout de même accès à plusieurs (généralement 2) épisodes de reproduction durant sa vie adulte. Cette polyandrie facultative a une base génétique avec un niveau d'héritabilité de l'ordre de $h^2 = 0,40 \pm 0,12$ (Torres-Vila et al. 2002^a). Par ailleurs, plusieurs facteurs physiologiques sont aussi responsables du réaccouplement de certaines femelles (Torres-Vila et al. 1997^a, Torres-Vila et al. 2004). Tout d'abord, des études réalisées au laboratoire démontrent que le niveau de polyandrie des femelles dépend de l'expérience sexuelle de leur partenaire (*i.e.* si le mâle s'est déjà accouplé ou non), les femelles étant moins motivées à se réaccoupler si leur premier partenaire est vierge comparé à un mâle non-vierge (Torres-Vila et al. 1997^a). De plus, une supplémentation en eau des femelles se traduit par une augmentation du nombre de réaccouplements (Torres-Vila et al. 1997^a). Enfin, la nutrition larvaire influence le taux de réaccouplement des femelles issues de populations sauvages, les femelles s'alimentant à l'état larvaire sur des baies de raisin mûres présentant un plus haut niveau de polyandrie que celles se nourrissant d'inflorescences (femelles de 3^{ème} vs de 1^{ère} génération, Torres-Vila et al. 2004).

Au crépuscule, les femelles se posent à l'apex d'un pied de vigne et émettent un bouquet phéromonal spécifique (produisant $\sim 0,3$ ng/h de phéromones, Anfora et al. 2005) destiné à attirer les mâles sur de très longues distances. Ces phéromones ont été décrites au début des années 1970 par deux équipes qui ont mis en évidence l'existence de 15 chaînes hydrocarbonées associées à des groupements alcools et acétates dans les glandes abdominales des femelles chez cette espèce (Roelofs et al. 1973 ; Buser et al 1974). La molécule principale (E,Z)-7,9-dodécadienyl acétate (E7,Z9-12:Ac) présente à 99%, joue un rôle primordial dans l'attractivité des mâles et est associée à deux composants minoritaires, le (E,Z)-7,9-dodécadien-1-ol (E7,Z9-12:OH) et le (Z)-9-dodécényl acétate (Z9-12:Ac) (El-Sayed et al. 1999, Witzgall et al. 2005). Lorsque le signal phéromonal est perçu par les récepteurs sensoriels du mâle, localisés au niveau des sensilles recouvrant ses segments antennaires, ce dernier engage un vol anémotactique positif, se basant sur la direction du vent transportant ces molécules pour se rapprocher de la source recherchée. Une fois la femelle localisée, les mâles adoptent une série de comportements reflétant leur motivation à s'accoupler et pouvant aboutir à la copulation (Fig. 13). Parmi ces comportements, les mâles vont notamment multiplier les tentatives d'accouplement en courbant leur abdomen en direction de l'ouverture génitale des femelles, ces dernières pouvant accepter la copulation ou la refuser, généralement en s'éloignant du mâle, en marchant ou en s'envolant.



Figure 13 : Accouplement entre une femelle (au-dessus) et un mâle (en dessous) chez *Eudémis*.

La durée de la copulation est variable selon le statut sexuel du mâle (*i.e.* un mâle vierge s'accouplera moins longtemps qu'un mâle qui s'est déjà accouplé) et dure environ 40 minutes pour un premier accouplement. Ce temps correspond à la durée nécessaire au transfert du spermatophore du mâle (contenant les spermatozoïdes et les substances produites par les glandes accessoires) qui se forme dans la bourse copulatrice de la femelle (Fig. 14). Chez *Eudémis*, comme chez tous les Lépidoptères, les mâles produisent deux types distincts de spermatozoïdes au sein des mêmes testicules. Ce phénomène appelé « *spermatogénèse dichotomique* » (Friedländer et al. 2005) aboutit à la production de spermatozoïdes nucléés

fécondants contenant de l'ADN (spermatozoïdes eupyrènes) et de spermatozoïdes anucléés non-fécondants, dépourvus d'ADN (spermatozoïdes apyrènes). Si le rôle indéniable des spermatozoïdes eupyrènes dans la fécondation et la formation des zygotes est bien établi, en revanche de nombreuses hypothèses fonctionnelles et évolutives ont été proposées pour expliquer la présence des spermatozoïdes apyrènes non-fécondants (Silberglied et al. 1984). Ainsi, les spermatozoïdes apyrènes joueraient certainement un rôle important dans la compétition spermatique (Cook & Wedell 1999) et pourraient faciliter le transport des spermatozoïdes eupyrènes (Sahara & Takemura 2003). Dans les premiers stades de la spermatogénèse, des différences caractéristiques dans les voies de développement conduisent à la formation des deux types distincts de spermatozoïdes (Friedländer et al. 2005). Les spermatozoïdes apyrènes sont produits en grande quantité et sont transférés sous forme individuelle lors de l'accouplement tandis que les spermatozoïdes eupyrènes sont produits et transférés sous forme de paquets, chaque paquet contenant 256 spermatozoïdes (Virkki 1969, Cook & Gage 1995) (Fig. 14). Dans les heures qui suivent l'accouplement, les deux types de spermatozoïdes contenus dans le sac spermatique du spermatophore (Fig. 14) migrent vers la spermathèque de la femelle où ils sont stockés avant de féconder les ovocytes. Les spermatozoïdes apyrènes, déjà pré-dissociés sont capables de quitter le spermatophore plus rapidement que les spermatozoïdes eupyrènes pour rejoindre la spermathèque de la femelle (Marcotte et al. 2003, Watanabe et Hachisuka 2005, Watanabe & Sasaki 2010).

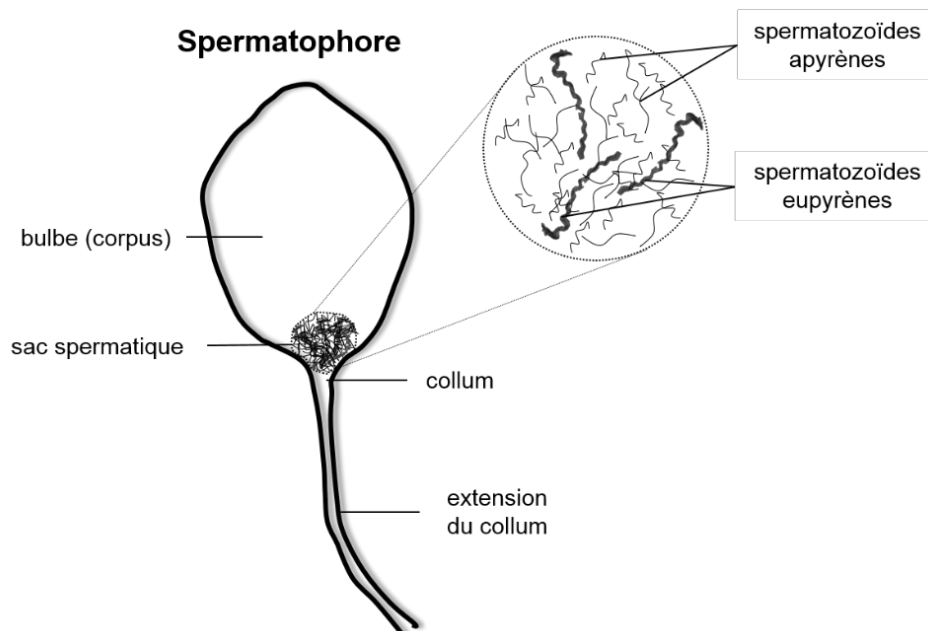


Figure 14 : Schéma représentant un spermatophore tel que transféré dans la bourse copulatrice de la femelle lors de l'accouplement. Le bulbe renferme les sécrétions des glandes accessoires produites par le mâle. Les deux types de spermatozoïdes (apyrènes et eupyrènes) sont contenus dans un sac spermatique proche du collum par lequel ces derniers sortiraient pour rejoindre la spermathèque de la femelle.

Les premiers œufs, de forme lenticulaire, sont généralement pondus la nuit, environ 50% d'entre eux étant pondus dans les 48 heures suivant l'accouplement (Moreau et al. 2015). Les femelles sélectionnent des sites de ponte propices au développement de leur descendance : boutons floraux ou baies. Les femelles préfèrent en général pondre sur des zones abritées, à l'intérieur des grappes ou sur des grappes couvertes par des feuilles. Le choix du site de ponte est guidé par différentes informations olfactives, visuelles, gustatives, mécaniques et thermiques (Maher & Thiéry 2004^{a,b}, Maher et al. 2006, Calas et al. 2006). Les œufs sont pondus chaque jour un par un pendant toute la durée de vie de la femelle grâce à un ovipositeur riche en récepteurs sensoriels, qui leur permettent d'évaluer la texture de surface de la plante. La durée d'incubation des œufs est négativement corrélée à la température, les œufs en première génération mettant plus de temps à éclore (~10-12 jours) que ceux pondus en 3^{ème} génération (~5-7 jours) (Thiéry 2005).

1.3 EUDÉMIS : UN MODÈLE IDÉAL POUR ÉTUDIER LES RELATIONS PLANTES-INSECTES

Les études portant sur les effets de la plante hôte (et notamment du cépage de vigne) sur les performances des chenilles et des adultes chez cette espèce se multiplient depuis une vingtaine d'années (Tableaux 3 et 4). En effet, le cépage de vigne et plus généralement, les plantes hôtes exploitées par Eudémis, affectent très fortement la capacité de survie des chenilles, leur masse, leur taille, leur temps de développement ainsi que leurs paramètres immunitaires les rendant plus ou moins vulnérables face aux ennemis naturels (prédateurs, parasites et parasitoïdes) (Tableau 3). De plus, les femelles adultes qui se sont développées à l'état larvaire sur différentes variétés de vigne ont un succès reproducteur très variable, ces dernières pondant plus ou moins d'œufs et vivant plus ou moins longtemps selon leur cépage d'origine ou celui de leur partenaire sexuel (Tableau 4).

Le stade phénologique de la vigne a également un effet important sur les performances des chenilles et des adultes, les baies de raisin se gorgeant en sucres et en éléments minéraux au cours de la maturation. Ainsi, les larves issues de la 3^{ème} génération et s'alimentant sur des baies mûres accumulent plus de réserves énergétiques et sont plus grosses que les larves issues de la 1^{ère} génération s'alimentant sur des inflorescences (Tableau 3). Le stade phénologique de la vigne a également un effet sur les performances des adultes et notamment sur la qualité des mâles via le volume du spermatophore qu'ils transfèrent aux femelles durant l'accouplement, les mâles de 3^{ème} génération produisant de plus gros spermatophores que ceux de 1^{ère} génération (Tableau 4).

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des études portant sur l'effet de la plante hôte (différents cépages ou différentes plantes hôtes alternatives) ou du stade phénologique de la vigne sur plusieurs traits d'histoire de vie des larves chez *Eudémis*.

≠ plantes hôtes ≠ phénologies	Traits mesurés sur les larves	Études
Milieus artificiels à base de ≠ cépages	Survie larvaire Temps de développement	<i>Moreau et al. 2006^b</i> <i>Moreau et al. 2006^c</i>
Milieus artificiels à base de ≠ plantes (vigne vs hôtes alternatifs)	Survie larvaire Masse mâle et femelle Temps de développement Paramètres immunitaires	<i>Thiéry & Moreau 2005</i> <i>Muller et al. 2015a</i>
Milieus artificiels à base de ≠ parties des baies	Survie larvaire Temps de développement	<i>Moreau et al. 2006^a</i>
≠ cépages de vigne (insectes sauvages)	Survie larvaire Masse ♂ et Paramètres immunitaires	<i>Moreau et al. 2007</i> <i>Vogelweith et al. 2013</i>
≠ stades phénologiques de la vigne	Survie larvaire Masse femelle Temps de développement	<i>Savopoulou-Soultani et al. 1999</i>

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études portant sur l'effet de la plante hôte (différents cépages ou différentes plantes hôtes alternatives) ou du stade phénologique de la vigne sur plusieurs traits d'histoire de vie des adultes, mâles et femelles, chez *Eudémis*. Les traits surlignés en gras concernent les mâles.

≠ plantes hôtes ≠ phénologies	Traits mesurés sur les adultes	Études
Milieus artificiels à base de ≠ cépages	Nombre d'œufs pondus Taille des œufs	<i>Moreau et al. 2006^b</i> <i>Moreau et al. 2006^c</i>
Milieus artificiels à base de ≠ plantes (vigne vs hôtes alternatifs)	Succès reproducteur ♀ Fécondité des ♀ Longévité des ♀	<i>Thiéry & Moreau 2005</i>
Milieus artificiels à base de ≠ parties des baies	Succès reproducteur ♀ Nombre d'œufs pondus et éclos Dynamique de ponte ♀ Longévité ♀	<i>Moreau et al. 2006^a</i> <i>Moreau et al. 2015</i>
≠ cépages de vigne (insectes sauvages)	Succès reproducteur ♂ et ♀ Nombre d'œufs pondus et éclos Taille des œufs Choix du site de ponte	<i>Moreau et al. 2007</i> <i>Moreau et al. 2008</i>
≠ stades phénologiques de la vigne	Masse ♂ et ♀ Volume du spermatophore Taille des œufs	<i>Torres-Vila et al. 1999</i> <i>Torres-Vila et Rodriguez- Molina 2002</i>

Toutes ces études fournissent des preuves indiscutables du rôle prépondérant joué par l'alimentation larvaire sur les performances des larves et des adultes. La plante hôte sur laquelle les chenilles se développent représente un facteur primordial influençant le succès reproducteur des adultes et *in fine* la taille de population chez cette espèce.

L'Eudémis apparaît donc comme un modèle biologique idéal pour étudier comment la plante hôte influence les performances reproductives des mâles et comment ces performances se répercutent sur le potentiel reproductif des femelles phytophages pour plusieurs raisons : i) c'est une espèce à reproduction sur capital, la nutrition larvaire est donc susceptible de jouer un rôle majeur sur les performances des adultes, ii) le cépage de vigne est déjà connu pour largement influencer le potentiel reproductif des femelles, et iii) les mâles de cette espèce transfèrent un cadeau nuptial lors de l'accouplement, les femelles pouvant en tirer de nombreux bénéfices directs (en termes de fécondité ou de longévité). De plus, une première étude a montré que des femelles accouplées avec des mâles de différents cépages présentaient des variations dans leur fécondité et leur fertilité (Moreau et al. 2007), suggérant un rôle potentiel du cépage de vigne sur les performances des mâles.

2. PROCÉDURE GÉNÉRALE

2.1 CONDITIONS D'ÉLEVAGE EN LABORATOIRE

Pour les expériences réalisées en laboratoire sur des populations d'élevage, les insectes utilisés proviennent d'une souche maintenue à raison d'une dizaine de générations par an à l'INRA de Bordeaux (UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble). À l'origine de l'élevage, 3500 chenilles sauvages ont été récoltées en 1998 dans un vignoble Sauternais (Château Lafaurie-Peyraguey) sur du Sémillon (Aquitaine France). Les adultes sont placés en grande densité dans des cages d'accouplement afin de favoriser la panmixie et sont maintenus dans des conditions standard d'élevage (22 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ d'humidité, photo-période : 16 heures de jour et 8 heures de nuit) (Fig. 15).



Figure 15 : Photographie de deux cages d'accouplement d'Eudémis dans une salle d'élevage.

Après s'être accouplées, les femelles pondent leur œufs sur des supports inertes en papier lisse ciré (15 × 2 cm) préalablement déposés dans les cages. Les papiers de ponte sont ensuite déplacés dans des bacs en polyéthylène (18 × 11,5 × 7 cm) contenant un milieu nutritif semi-artificiel. Après l'éclosion des œufs, les chenilles sont nourries *ad libitum* sur ce milieu nutritif pendant tout leur développement larvaire. Ce milieu semi-artificiel est composé pour 1 L de : 1000 mL d'eau, 84,63 g de farine de maïs, 45,48 g de levure, 41,25 g de germe de blé, 15 g d'Agar, 6,03 g d'acide ascorbique, 0,32 g de Scala®, 3,35 g de sels de Wesson, 2,76 g de Nipagine®, 2,65 g d'acide benzoïque et de 5 mL d'éthanol à 95%.

À la fin de leur développement, des cartons ondulés sont placés dans les boîtes contenant le milieu nutritif pour que les chenilles tissent un « nid » dans les alvéoles du carton ondulé avant de se transformer en chrysalides. Les chrysalides sont alors pesées à l'aide d'une microbalance analytique Precisa 262 SMA-FR (précision 0,1 mm). Elles sont ensuite individualisées dans des tubes en verre fermés par un bouchon en coton (70 × 9 mm) et observées chaque jour jusqu'à l'émergence de l'adulte. Chaque adulte est sexé, la différenciation se faisant en examinant la partie postérieure de l'abdomen. L'extrémité ventrale de la femelle forme une gouttière chitinisée de laquelle sort son ovipositeur (Fig. 16). L'extrémité abdominale des mâles, quant à elle, est plus fine et forme deux lèvres jointes garnies d'une pilosité importante (Fig. 16).

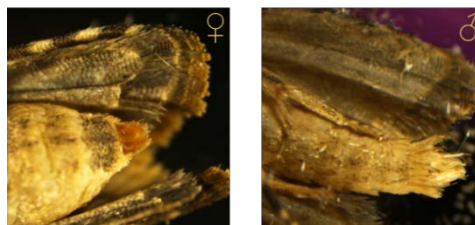


Figure 16 : Photographies des extrémités abdominales d'une femelle présentant son ovipositeur (à gauche) et d'un mâle (à droite) chez *Eudémis* (© K. Muller).

2.2 COLLECTE EN POPULATIONS NATURELLES

Au cours des deux campagnes de terrain effectuées en mai/juin 2013 et 2014 (correspondant à la 1^{ère} génération d'*Eudémis*), des chenilles ont été collectées dans deux régions viticoles du Sud de la France : Languedoc Roussillon et Provence-Alpes-Côte d'Azur (Fig. 17). Ces deux régions ont été sélectionnées car elles présentent au moins deux avantages dans notre étude : (i) les vignobles de ces régions sont généralement multi-cépages, nous permettant de comparer les performances des mâles sur plusieurs cépages à une fine échelle géographique (au sein d'un même vignoble) et (ii) les niveaux de population de *L. botrana* y sont élevés (Thiéry 2008), nous permettant de réaliser des expériences avec de larges effectifs.

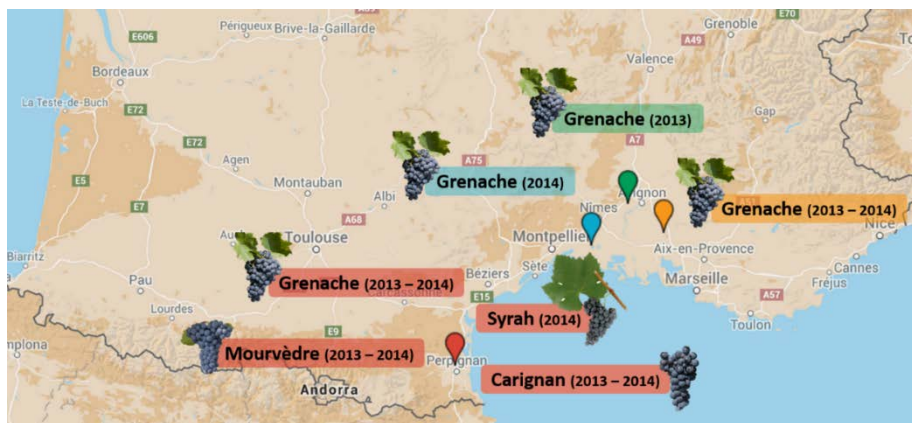


Figure 17 : Points d'échantillonnage des chenilles *L. botrana* sur différents cépages (Carignan, Grenache Mourvèdre et Syrah) et dans différents sites géographiques en France (d'ouest en est, parcelle Polygone à Perpignan [rouge], parcelle à Gallician [bleu], parcelle à Estézargues [vert] et plateau de Roquemartine à Sénas [jaune]) lors des deux années de collecte (en mai/juin 2013 et 2014).

Pour chaque campagne de terrain, un suivi en collaboration avec les chambres d'agriculture est effectué à partir du premier vol des adultes (de début avril à mi-mai), et les niveaux d'infestation sont estimés à partir du 3^{ème} stade larvaire, lorsque les chenilles tissent un glomérule visible à l'œil nu. L'estimation a été réalisée en prospectant le long d'une rangée de vigne et en comptant le nombre de glomérules pour 100 grappes de ceps tirés aléatoirement. Les chenilles ayant atteint le 5^{ème} et dernier stade larvaire sont échantillonnées dans des vignobles biologiques non traités par des pesticides. Elles sont ensuite ramenées dans leurs glomérules au laboratoire dans de larges bacs. La dispersion des individus étant très faible durant les différents stades larvaires, chaque chenille est supposée avoir effectué tout son développement dans la grappe dans laquelle elle est prélevée (Torres-Vila 1997^a).

2.3 SUIVI DES ACCOUPLEMENTS ET MESURES DU POTENTIEL REPRODUCTIF

Pour toutes les expériences menées au cours de ma thèse, le protocole de mise en couple des individus s'est toujours déroulé de la même manière et va être présenté succinctement ici (pour plus de détails, se référer aux matériel et méthodes des manuscrits). Des mâles âgés de 2 à 3 jours sont mis en présence de femelles âgées de 1 à 2 jours dans des tubes d'accouplement (100 × 15 mm) fermés par un bouchon en coton et sont placés à l'obscurité partielle afin de mimer le crépuscule (Fig. 18).



Figure 18 : Photographie d'un tube d'accouplement fermée par un bouchon en coton et contenant une femelle en position d'appel (à gauche) et un mâle (à droite) avant l'accouplement.

Les couples sont ensuite observés pendant 4 heures, cette période correspondant à la durée de la fenêtre d'accouplement (établie à partir d'observations préliminaires). En effet, les femelles cessent d'émettre des phéromones après avoir passé 4 heures à l'obscurité. Une partie des couples est filmée avant l'accouplement afin de caractériser les comportements précopulatoires des mâles et des femelles et de quantifier leur motivation à s'accoupler (voir paragraphe ci-dessous). Pour toutes les expériences, la latence avant l'accouplement (correspondant au temps écoulé entre la mise en place des individus et l'occurrence de l'accouplement) et la durée de l'accouplement (correspondant à la durée pendant laquelle la paire reste accouplée) sont systématiquement prises en compte. À l'issue de l'accouplement, les femelles sont réparties en deux lots : le premier permettant d'estimer l'investissement du mâle via la qualité du spermatophore qu'il a transféré pendant la copulation (voir partie 2.3.2), le second permettant d'évaluer les conséquences du transfert de ce spermatophore sur le potentiel reproductif des femelles (voir partie 2.3.3).

2.3.1 Analyse des comportements précopulatoires

Au cours de certaines expériences, toute la séquence depuis la mise en couple des deux individus jusqu'à l'occurrence de l'accouplement est filmée à l'aide d'une caméra SONY HDR CX220E afin de relever les différents comportements précopulatoires caractéristiques des mâles et des femelles chez *L. botrana*. Un accouplement est considéré comme réussi si la formation de la paire accouplée se maintient plus d'une minute, correspondant au temps nécessaire à l'intromission de l'édéage (organe reproducteur du mâle) dans le tractus génital de la femelle. L'analyse des vidéos permet ensuite de relever les comportements précopulatoires qui reflètent la motivation des deux partenaires à s'accoupler (Tableau 5). Pour cela, j'ai défini un paramètre de « motivation de la femelle » qui reflète, comme son nom l'indique, la motivation de la femelle à s'accoupler. Chez cette espèce, quand une femelle est prête à s'accoupler, elle le signale en relâchant des phéromones sexuelles dans une posture caractéristique (Fig. 19 et Tableau 5).



Figure 19 : Photographie d'une femelle d'Eudémis en position d'appel avec les ailes relevées et la glande à phéromone exposée (© S. Rauscher).

Ce comportement d'appel est coûteux à produire (Harari et al. 2011), il est néanmoins toujours exprimé avant l'accouplement d'une femelle. La motivation de la femelle peut donc être appréhendée en mesurant le temps passé par la femelle dans cette position d'appel depuis la mise en place des deux partenaires jusqu'à l'accouplement (Tableau 5). La latence avant le premier appel (*i.e.* le temps mis par la femelle pour adopter la position caractéristique d'appel en présence du mâle) renseigne également sur la motivation de la femelle : plus une femelle adopte rapidement cette posture, plus elle est motivée à s'accoupler.

Le tableau ci-dessous regroupe les principaux comportements relevés sur les vidéos, reflétant la motivation sexuelle des femelles, à travers l'expression de comportements d'appel et de refus de copulation ainsi que la motivation sexuelle des mâles, à travers des mesures reflétant principalement leur activité. Une fois à proximité de la femelle, le mâle réalise des approches vers celle-ci, en battant des ailes ou en la poursuivant en vol (Tableau 5). Le mâle essaye ensuite de s'accoupler en courbant son abdomen et en réalisant des « tentatives de copulation » pouvant aboutir ou non à un accouplement (Tableau 5).

Tableau 5 : Répertoire et description des comportements précopulatoires reflétant la motivation des femelles et des mâles à s'accoupler chez *Eudémis*.

SEXE CONCERNÉ	Nom du comportement et sa description
MOTIVATION SEXUELLE DES FEMELLES	« Comportement d'appel » : La femelle écarte légèrement les ailes, presse l'extrémité de son abdomen contre la paroi du tube et libère des phéromones
	« Refus de copulation » : Lors d'une tentative de copulation du mâle, la femelle s'éloigne du mâle en marchant ou volant le long du tube
	« Approches du mâle » : Approches vers la femelle soit par l'avant ou l'arrière en marchant, battant des ailes ou volant
MOTIVATION SEXUELLE DES MALES	« Battements d'ailes » : Le mâle se pose à côté de la femelle et fait quelques battements d'ailes suivi d'une rotation du corps
	« Poursuite en vol » : Vol rapide et agité, durant lequel le mâle poursuit la femelle à courte distance
	« Courbure de l'abdomen » : Le mâle courbe son abdomen à côté de la femelle, cherchant son tractus génital
	« Tentative de copulation » : Tentative d'intromission de l'édéage du mâle dans le tractus génital de la femelle qui aboutit à un succès ou un échec

2.3.2 Investissement du mâle – Quantité et qualité du spermatophore

a. Mesure du volume du spermatophore

Immédiatement après l'accouplement, les femelles sont congelées à -25°C pendant 10 minutes puis disséquées sur une lame en verre. La bourse copulatrice contenant le spermatophore est délicatement extraite de l'abdomen de la femelle (Fig. 20a) et la taille du spermatophore transféré est appréhendée en mesurant son volume. En effet, chez *L. botrana*, la masse du spermatophore est inférieure à 1 mg et elle est donc difficile à mesurer précisément. L'estimation de la taille du spermatophore par son volume est une méthode classique utilisée chez de nombreuses espèces de papillons de nuit (Royer & McNeil 1993, Foster & Ayers 1996, Milonas et al. 2011) et déjà employée avec succès chez *L. botrana* (Torres-Vila et al. 1999). Les dimensions du spermatophore (L : Longueur, l = largeur, e = épaisseur) sont mesurées à l'aide d'un stéréo-microscope (NIKON SMZ1500) à un grossissement $\times 20$ (Fig. 20b). Le volume du spermatophore est estimé par la formule : $V = \pi/6 (L \times l \times e)$. Des mesures préliminaires réalisées au début de ma thèse sur 47 spermatophores ont permis de confirmer que cette estimation était répétable (coefficient de répétabilité = 0,863 ; Lessells & Boag 1987).

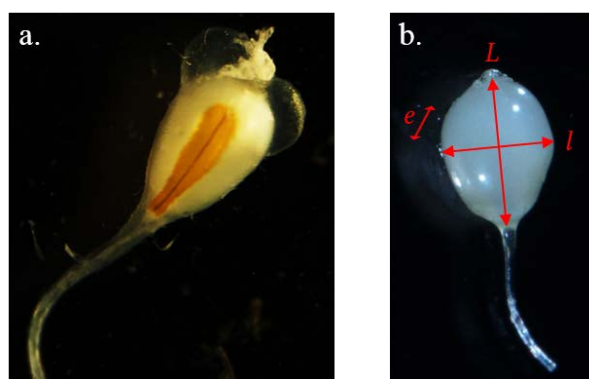


Figure 20 : Photographies (a) d'un spermatophore contenu dans la bourse copulatrice d'une femelle après un accouplement avec un mâle vierge et (b) d'un spermatophore seul extrait de la bourse copulatrice avec les dimensions mesurées (L : longueur, l : largeur, e : épaisseur).

b. Comptage des spermatozoïdes

Au cours de certaines expériences, le nombre de spermatozoïdes féconds (eupyrènes) et non féconds (apyrènes) ont été comptés en disséquant le spermatophore après en avoir mesuré son volume. Pour cela, le sac membraneux contenant le sperme à l'intérieur du spermatophore est rompu dans une goutte d'eau distillée et le sperme est délicatement dilacéré pour assurer la dispersion des spermatozoïdes. À ce stade, les spermatozoïdes eupyrènes sont encystés dans des paquets (Fig. 20a), chaque paquet contenant

256 spermatozoïdes, comme chez tous les Lépidoptères (Virkki 1969, Cook & Gage 1995). Le nombre de paquets de spermatozoïdes eupyrènes (Fig. 21a) est compté sous un microscope Nikon Eclipse E600 à un grossissement $\times 40$ et ce nombre est multiplié par 256 pour obtenir le nombre total de spermatozoïdes eupyrènes. Le sperme contenant les spermatozoïdes non féconds à très forte concentration (Fig. 21b) est ensuite rincé de la lame dans un tube Eppendorf® de 1,5 mL et dilué avec de l'eau distillée. Quatre sous-échantillons de 10 μ L sont ensuite récupérés de chaque solution spermatique diluée et les spermatozoïdes apyrènes sont comptés en parcourant chaque goutte séchée sous un microscope Nikon Eclipse E600 à un grossissement $\times 100$. Le nombre total de spermatozoïdes apyrènes est estimé en multipliant la moyenne des 4 comptages par son facteur de dilution.

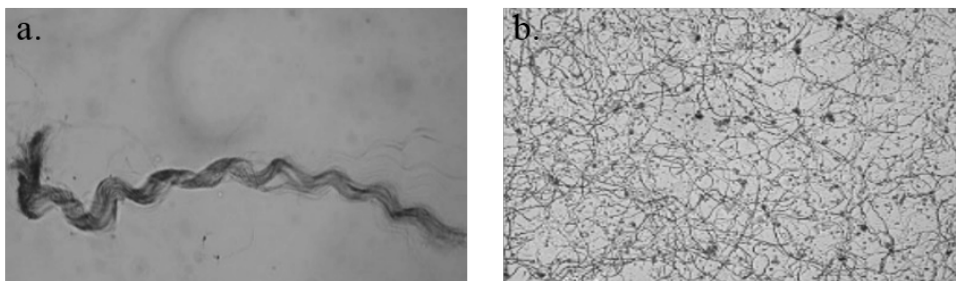


Figure 21 : Photographies (a) d'un paquet contenant 256 spermatozoïdes eupyrènes (grossissement $\times 40$) et (b) d'une goutte de sperme non diluée contenant des milliers de spermatozoïdes apyrènes (grossissement $\times 100$) observés après dissection d'un spermatophore sous microscope optique.

c. Mesure du contenu en protéines du spermatophore

Une autre expérience a permis de déterminer la concentration en protéines des spermatophores transférés lors du premier accouplement. Pour cela, les spermatophores intacts sont mesurés puis placés dans un microtube et stockés à -80°C pour les dosages de protéines. Le jour de l'analyse, les spermatophores sont broyés dans 100 μ L de tampon de lyse [0,1 M de tampon Tris-HCl à un pH de 8,5, 0,15% de polyvinylpyrrolidone, 153 μ M de sulfate de magnésium (Mg-SO_4), 0,2% de Triton X-100] en utilisant 3 billes en acier chromé agitées pendant 5 minutes à 25 Hz dans un vibro-broyeur Retsch MM 400. Ensuite, chaque homogénat est centrifugé à 14000 tr/min pendant 3 minutes à 4°C et la concentration en protéines est estimée en utilisant la méthode de Bradford. Le dosage des protéines dans chaque échantillon est ainsi réalisé à partir d'une gamme étalon établies avec 62,5, 125, 250, 500, 1000 et 2000 μ g d'immunoglobuline G bovine (IgG) dissoute dans le même tampon que les échantillons. La concentration en protéines est déterminée à l'aide de deux répliquats pour chaque échantillon et la quantité totale de protéines présente par spermatophore est estimée.

2.3.3 Conséquences sur le potentiel reproductif des femelles

Afin d'évaluer l'impact de la qualité du mâle sur le potentiel reproductif des femelles, une partie des femelles accouplées sont laissées seules dans leurs tubes respectifs (100 × 15 mm) une fois l'accouplement terminé. Les femelles peuvent ainsi pondre librement leurs œufs sur la surface du tube jusqu'à leur mort et sont abreuvées quotidiennement en humidifiant le bouchon en coton qui sert à fermer le tube. Chaque jour, les tubes sont examinés afin de déterminer la date d'apparition des premiers œufs, permettant d'estimer la latence avant la 1^{ère} ponte ainsi que la date de mort de la femelle, permettant de calculer sa longévité adulte. Les œufs sont ensuite incubés pendant 7 jours après la mort de la femelle et le nombre d'œufs total (fécondité) ainsi que le nombre d'œufs éclos (fertilité) sont comptabilisés (Fig. 22).

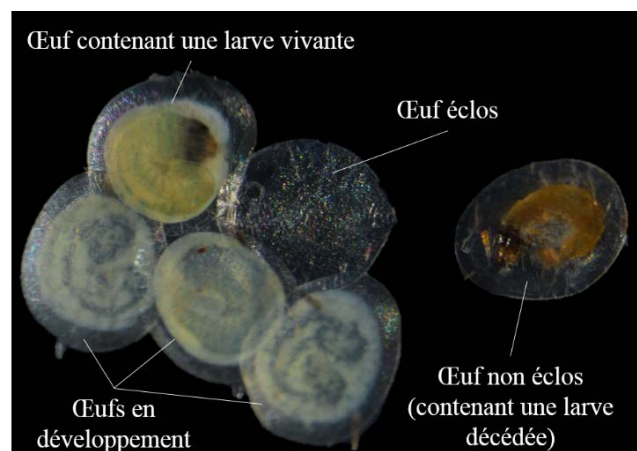


Figure 22 : Photographie d'œufs chez *L. botrana* à différents stades : en développement, au stade dit « tête noire » 1 ou 2 jours avant l'éclosion, éclos et non-éclos (contenant une larve décédée).

2.4 MESURES ÉNERGÉTIQUES DES MÂLES

2.4.1 Préparation des échantillons

Une expérience réalisée en 2014 en populations naturelles a consisté à mesurer les réserves énergétiques de mâles nouvellement émergés issus de différents cépages. Chaque papillon adulte est tout d'abord pesé à l'aide d'une microbalance Precisa 262 SMA-FR (précision 0,1 mg) puis congelé à -80°C dans un tube Eppendorf®. Les mesures énergétiques (protéines, lipides et glycogène) sont réalisées sur le corps entier des mâles, en suivant en partie la méthode utilisée par Foray et al. (2012). Tous les individus sont broyés dans 180 μL de tampon de lyse [100 mM de phosphate de monopotassium (KH_2PO_4), 1 mM de dithiothréitol (DTT) et 1 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA)] à l'aide de billes en acier chromé de 3 mm placées dans le tube Eppendorf® et agitées pendant 30 secondes à 25 Hz dans un vibro-broyeur Retsch MM 400.

Pour la première étape, chaque homogénat est centrifugé à 1200 tr/min pendant 5 minutes et $2 \times 2,5 \mu\text{L}$ de cet homogénat sont utilisés pour évaluer la concentration en protéines à l'aide de la méthode de Bradford (Fig. 23). Après le dosage des protéines, les échantillons sont placés à température ambiante pendant un jour après avoir ajouté $20 \mu\text{L}$ d'une solution de sulfate de sodium (NaSO_4) et $1500 \mu\text{L}$ d'une solution de chloroforme:méthanol (1:2). Le jour suivant, les échantillons sont centrifugés à 6000 tr/min pendant 6 minutes et le surnageant est divisé en 2 parts égales : une pour la quantification des lipides et l'autre pour l'analyse du glycogène.

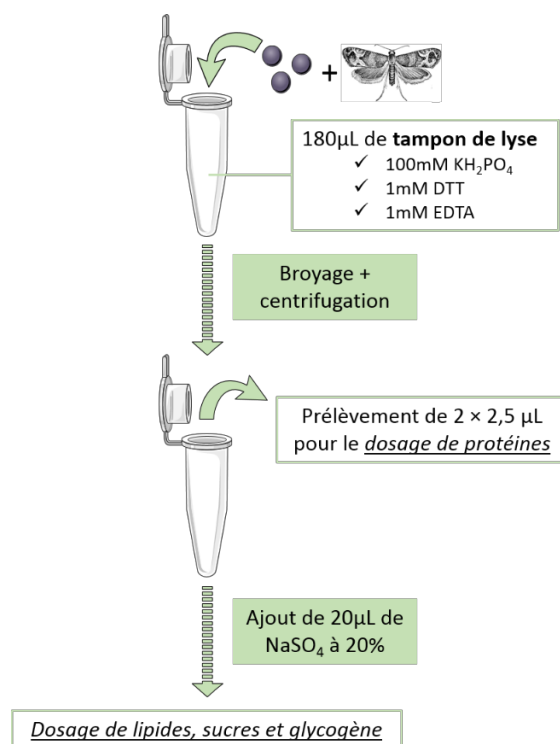


Figure 23 : Schéma récapitulatif de la technique consistant à mesurer les réserves énergétiques (protéines, lipides, sucres et glycogène) des mâles adultes en fonction du cépage sur lequel ils ont effectué l'intégralité de leur développement larvaire.

2.4.2 Quantification des protéines

Après le broyage des individus, les échantillons sont placés à 4°C pendant 30 minutes pour laisser le temps aux protéines de se solubiliser. La concentration en protéines dans chaque échantillon est déterminée à partir d'une gamme étalon construite en utilisant 125, 250, 500, 1000 et 2000 μg d'immunoglobuline G bovine (IgG) dissoute dans le même tampon que les échantillons. Avant la lecture, les plaques sont délicatement remuées pendant 5 secondes pour séparer les agrégats de protéines. La concentration en protéines est déterminée par spectrophotométrie à 750 nm en utilisant un lecteur de microplaque VersamaxTM et le logiciel Softmax Pro v5.2.

2.4.3 Quantification des lipides

L'analyse des lipides est déterminée en suivant le procédé de dosage à partir de vanilline utilisé par Van Handel (1985^a). Le surnageant de chaque tube est transféré dans un tube propre (16 × 100 mm) et les tubes sont ensuite placés sous sorbonne dans un bain sec chauffant à 95 °C permettant au solvant restant de s'évaporer. Deux-cent microlitres d'acide sulfurique concentré à 95% sont ajoutés à chaque tube et laissés 10 minutes à 90 °C. Les tubes sont ensuite retirés du bain chauffant et après quelques minutes de refroidissement, 4,5 mL d'une solution d'acide vanilline-phosphorique sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont ensuite vortexés et laissés 5 minutes à l'air libre pour permettre à la coloration de se développer. Ensuite, 100 µL de chaque échantillon sont déposés dans des puits sur une microplaque. La densité optique dans chaque puits est lue directement à 525 nm en utilisant un lecteur de microplaque VersamaxTM couplé au logiciel Softmax Pro v5.2. La concentration en lipides dans chaque échantillon est déterminée à partir d'une gamme étalon construite en utilisant 16,5, 32, 63, 125, 250 et 500 µg d'huile végétale commerciale.

2.4.4 Quantification du glycogène

L'analyse du glycogène a été déterminée selon la procédure utilisée par Van Handel (1985^b). Le surnageant de chaque tube est décanté dans un tube à essai (16 × 100 mm) pour analyser la quantité de sucres circulants (qui ne sera pas présentée dans cette thèse, le dosage réalisé n'ayant pas été assez précis pour mettre en évidence la présence de sucres circulants dans le corps des mâles adultes). Les tissus restants et le glycogène adsorbé sur du phosphate de sodium sont lavés dans des tubes à essai propres en utilisant 1 mL de réactif d'anthrone puis en rajoutant 3,5 mL de ce réactif dans chaque tube. Les tubes sont placés dans un bain sec chauffant à 95 °C pendant 17 minutes. Les tubes sont retirés du bain chauffant, vortexés pendant 20 secondes et refroidis à l'air libre. Ensuite, 100 µL d'échantillon dans chaque tube sont déposés dans un puits sur une microplaque. La densité optique dans chaque puits est lue à 625 nm en utilisant un lecteur de microplaque VersamaxTM couplé au logiciel Softmax Pro v5.2. La concentration en glycogène de chaque échantillon est déterminée à partir d'une gamme étalon établie avec 25, 50, 100, 150, 200 et 400 µg de glucose.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE L'EXPÉRIENCE SEXUELLE DU MÂLE SUR LE POTENTIEL REPRODUCTIF DES FEMELLES

OBJECTIFS DU CHAPITRE

Chez la plupart des espèces d'insecte, les femelles cherchent à maximiser leur succès reproducteur en sélectionnant des partenaires capables de leur procurer des bénéfices directs (*i.e.* des mâles capables d'inséminer leurs œufs, de leur donner accès à un territoire ou de leur offrir des ressources nutritives...) et indirects (à travers les traits génétiques des mâles choisis). L'un des principaux bénéfices directs qui oriente les préférences des femelles est l'accès à des ressources nutritives et notamment à des cadeaux nuptiaux offerts par le mâle avant ou pendant l'accouplement (Vahed 1998). De manière générale, la taille du cadeau nuptial est souvent considérée comme un indice de sa qualité (South & Lewis 2011). Chez les Lépidoptères, un des facteurs critiques affectant la taille du spermatophore transféré concerne l'expérience sexuelle du mâle (Royer & McNeil 1993, Bissondath & Wiklund 1996). En effet, les mâles non-vierges disposant de peu de ressources, produisent de très petits spermatophores comparés aux mâles vierges. Cette déplétion au cours d'accouplements successifs peut avoir de nombreuses conséquences négatives sur le potentiel reproductif des femelles, les femelles s'accouplant avec des mâles non-vierges souffrant notamment d'une réduction de leur fécondité (Torres-Vila & Jennions 2005 pour une méta-analyse sur 25 espèces de Lépidoptères). Puisque les femelles subissent un fort coût reproductif à s'accoupler avec des mâles non-vierges, ces dernières devraient donc être capables de discriminer la qualité des mâles en se basant sur des critères reflétant leur expérience sexuelle afin de sélectionner préférentiellement les mâles vierges leur procurant de larges bénéfices directs.

Les deux principaux objectifs de ce chapitre étaient donc d'évaluer chez *Eudémis* (i) l'importance de la qualité du spermatophore dans le potentiel reproductif des femelles et dans leur motivation à se réaccoupler et (ii) d'explorer l'existence d'un choix de partenaire exprimé par les femelles sur la base de l'expérience sexuelle des mâles (mâles vierges *vs* non-vierges).

Dans un premier temps, dans des tests de non-choix, des femelles vierges ont été accouplées avec des mâles vierges ou non-vierges et nous avons suivi la dynamique de ponte de ces femelles ainsi que leur motivation à se réaccoupler tout au long de leur vie. Nos résultats démontrent clairement que les mâles vierges, à travers le transfert d'un spermatophore cinq fois plus gros que celui produit par les mâles non-vierges, procurent d'importants bénéfices directs aux femelles. En effet, les femelles accouplées avec des mâles vierges pondent 25% d'œufs en plus que les femelles accouplées avec des mâles non-vierges, suggérant une capacité des femelles à remobiliser les nutriments présents dans les larges

spermatophores pour produire plus d'œufs, notamment en fin de vie. En outre, les femelles s'accouplant avec des mâles non-vierges et recevant donc de petits spermatophores sont plus motivées à se réaccoupler que celles s'accouplant avec des mâles vierges. Les femelles accouplées avec des mâles non-vierges sont (i) plus nombreuses à réappeler, (ii) réappellent plus vite et (iii) plus intensément que celles accouplées avec des mâles vierges. Dans un contexte de compétition spermatique, le transfert de gros spermatophores bénéficie donc également aux mâles vierges, qui en inhibant le réaccouplement des femelles, disposent d'une certitude de paternité élevée (Wedell et al. 2006, Simmons & Parker 1989, Vahed 2007).

En raison des avantages marqués à s'accoupler avec un mâle vierge, les femelles devraient privilégier les accouplements avec ces mâles pour recevoir plus de nutriments. Par ailleurs, les femelles devraient également éviter les mâles non-vierges afin de minimiser les coûts associés au fait de se réaccoupler. Parmi ces coûts, le temps et l'énergie investis dans le rappel de mâles (le comportement d'appel étant physiologiquement coûteux chez cette espèce, Harari et al. 2011) ne sont plus disponibles pour assurer d'autres fonctions, comme par exemple la ponte de leurs œufs (les femelles ayant besoin de plusieurs jours pour pondre tous leurs œufs, Moreau et al. 2015).

Afin de tester l'existence d'un choix de partenaire femelle en fonction de l'expérience sexuelle des mâles, nous avons dans un second temps, présenté simultanément à une femelle vierge, un mâle vierge et un mâle non-vierge. Tous les comportements précopulatoires reflétant la motivation sexuelle des trois potentiels partenaires ont été relevés jusqu'à ce que la femelle s'accouple avec l'un des deux mâles. Cette expérience révèle une préférence marquée des femelles pour les mâles vierges (choisis dans plus de 70% des tests). Les mâles ont la même motivation sexuelle à s'accoupler (passant 50% de leur temps en activité) mais les femelles ont exprimé plus de comportements de rejets envers les mâles non-vierges, suggérant une réticence marquée à s'accoupler avec ces mâles. De plus, dans les 30% des cas où l'accouplement concerne des mâles non-vierges, la latence avant de s'accoupler est plus élevée (2 fois plus longue) que pour les accouplements avec des mâles vierges.

Cette étude démontre donc que la qualité reproductive des mâles dépend largement de leur expérience sexuelle, qui en retour impacte fortement le potentiel reproductif des femelles. De plus, les femelles chez *Eudémis* sont capables de discriminer parmi les mâles en se basant sur ce critère (vierge vs non-vierge) et nous avons démontré une préférence des femelles pour les mâles vierges. Les femelle en s'accouplant avec ces mâles, reçoivent de larges spermatophores et maximisent ainsi l'obtention de bénéfices directs.

MANUSCRIT 1

DIRECT BENEFITS FROM CHOOSING A VIRGIN MALE IN THE EUROPEAN GRAPEVINE MOTH (*LOBESIA BOTRANA*)

DIRECT BENEFITS FROM CHOOSING A VIRGIN MALE IN THE EUROPEAN GRAPEVINE MOTH (*LOBESIA BOTRANA*)

Karen MULLER^a, Laura ARENAS^a, Denis THIERY^{b, c} and Jérôme MOREAU^a

^a Université Bourgogne Franche-Comté, Equipe Ecologie Evolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France.

^b INRA UMR 1065 Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France.

^c Université de bordeaux, INRA UMR 1065, Save, Bordeaux Sciences Agro, Villenave d'Ornon Cedex

ABSTRACT

In Lepidoptera, male investment in the ejaculate usually declines over consecutive matings, a depletion that could have profound consequences for female reproductive output. Since successive matings can affect the ability of males to provide phenotypic benefits, strong selection for females to discriminate among males based on the male mating experience may exist. The aim of our study was to determine if monandrous females of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*) are able to discriminate among males of different qualities based on their mating experience in order to maximize direct benefits (by receiving large spermatophores from virgin males) and minimize mating costs (by avoiding low-quality non-virgin males). Non-virgin males produced spermatophores five times smaller than those of virgin males; consequently, mating with non-virgin males significantly reduced female fecundity (by ~25%) and increased their motivation to remate. In a mate-preference experiment, we found that females were more likely to mate with virgin males and more frequently rejected non-virgin mates. Moreover, non-virgin males required more time to achieve mating than virgin males. Our results suggest that females are able to discriminate among males based on male mating experience, and demonstrate female preference for virgin males, thereby maximizing direct benefits associated with receiving large spermatophores.

KEY WORDS: direct benefits, female mate choice, *Lobesia botrana*, male mating experience, monandry, spermatophore.

INTRODUCTION

Classical sexual selection theory predicts that males should maximize their reproductive success by mating with several females, whereas females boost their fitness by being selective and choosing the highest quality mate (Andersson and Simmons 2006; Kokko et al. 2006). Females may benefit from being choosy through direct material benefits obtained in the present generation or from indirect, genetic benefits for their offspring in the subsequent generation. Direct fitness benefits have traditionally been assumed to be of overriding importance because their effects are immediate and do not require mechanisms that maintain genetic variance (Møller and Jennions 2001; Cameron et al. 2003).

In most insect species, one of the direct benefits that might drive female preference is access to nutritive resources, such as nuptial gifts offered by males before or during mating (Vahed 1998; Lewis and South 2012). These nuptial gifts include food items or male accessory gland secretions, and generally have a direct positive effect on female fitness through beneficial effects on a variety of fitness-related traits, including fecundity, fertility, and longevity (South and Lewis 2011). In Lepidoptera, nuptial gifts consist of a spermatophore containing sperm and accessory gland products rich in nutrients such as proteins (Marshall 1982). Several studies using radiolabeled substances (e.g., amino acids, zinc, phosphorus, sodium) support the prediction that females are selected to allocate male-derived nutrients from spermatophores to egg production (Boggs and Gilbert 1979; Rooney and Lewis 1999), and further indicate that large spermatophores generally enhance female fecundity (South and Lewis 2011). Consequently, mated females that receive small spermatophores containing fewer resources have a reduced fitness compared with females that receive larger spermatophores (reviewed by South and Lewis 2011).

Spermatophore quality depends on various factors, such as male mass, age at first mating (Oberhauser 1989; Tigreros 2013), male larval and adult nutrition (Delisle and Bouchard 1995; Cahenzli and Erhardt 2013; Muller et al. 2015), and male mating experience (Torres-Vila and Jennions 2005). In many species, spermatophores become smaller with repeated mating and their nutritional and spermiatic qualities classically decrease with the number of matings. Indeed, some studies have shown that lepidopteran females that copulate with a recently mated male receive a smaller spermatophore with fewer resources compared to those mating with a virgin male (Torres-Vila and Jennions 2005; Lauwers and Van Dyck 2006).

How male spermatophore size affects female reproductive output greatly depends on the ecological context of the considered species, including feeding habits, timing of reproduction,

and mating system. On the one hand, the receipt of spermatophore-derived nutrients at mating is particularly important for females, which do not have access to resources as adults. Indeed, for capital breeding species in which resources necessary for somatic maintenance and gametic investment are limited because they are accumulated only during larval development, females need to receive larger ejaculates containing a considerable amount of nutrients to maximize their fecundity (Boggs and Freeman 2005). Since females must rely on reserves stored as larvae to support their reproductive efforts, any additional input from large spermatophores might represent an important resource that could be used for reproduction. On the other hand, the effect of male-derived nutrients on female fitness depends on the species mating system. In monandrous species, in which females restrict themselves to a single opportunity to mate over their lifespan, females would be predicted to preferentially mate with males that produce larger spermatophores in order to acquire sufficient sperm and nutritional resources to fertilize all their eggs, as shown in butterflies (Jones 2001; Velde et al. 2011). Moreover, monandrous females receiving a small spermatophore from their first mating tend to subsequently remate (Foster and Ayers 1996; McNamara et al. 2009; Elzinga et al. 2011). Thus, monandrous females should select large spermatophores, not only to receive more nutrients, but also to reduce time and survival costs associated with remating, which decreases the time available to females for egg-laying. Several studies have also reported that each reproductive event is associated with increased predation risk and increased exposure to parasites (Arnqvist and Nilsson 2000; Harshman and Zera 2007). Since male mating experience can affect the ability of males to provide phenotypic benefits, there may be strong selection for females to discriminate among males based on mating experience and to preferentially mate with males that give large spermatophores (i.e., virgin males) in order to boost their reproductive potential.

However, evidence for patterns of female mating preferences for males with different mating experiences in insects is equivocal. Whereas some work has shown that females mate preferentially with virgin males in some species, including *Drosophila melanogaster* (Markow et al. 1978), *Heliothis virescens* (Klepetka and Gould 1996), *Cnephasia jactatana* (Jimenez-Perez and Wang 2004) and *Schultesia nitor* (Monceau and van Baaren 2012), other studies have shown that females mate preferentially with experienced males, for example in *Euschistus conspersus* (Krupke et al. 2008), *Utetheisa ornatrix* (Iyengar 2009), *Cadra cautella* (McNamara et al. 2009) and *Ostrinia nubilalis* (Milonas et al. 2011). This lack of overall consensus could reflect the fact that mating patterns greatly depend on the species under consideration (with

or without nuptial gifts), feeding habits (capital vs. income breeders) mating system (monandrous vs. polyandrous females), and the effect of male mating experience on female reproductive output. To our knowledge, there has never been a conclusive study that explicitly tested predictions about female preferences driven by potential direct benefits in a capital breeding monandrous species in which nuptial gifts represent a crucial advantage for female reproductive output.

The European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) (Denis and Schiffermüller), a very important pest of grapes worldwide, is an ideal candidate for assessing female preferences based on male mating experience. This moth is a capital breeder that acquires most of the resources necessary for its adult life during larval stages in grapes. Adult females can also obtain resources during the adult stage, not by feeding but by receiving spermatophore-derived nutrients from males during mating (Torres-Vila et al. 1997; Muller et al. 2015). This species is considered monandrous, with about 70% of wild females mating only once during their lifespan (Torres-Vila et al. 1997). The remnant polyandry level has an underlying genetic component (Torres-Vila et al. 2002) and is strongly associated with physiological factors, such as larval food nutrition (Torres-Vila et al. 2004) and the size of the spermatophore received by females (Torres-Vila et al. 1997).

Here, we experimentally evaluated the influence of male mating experience on male spermatophore size, female reproductive output, and motivation to remate in *L. botrana*. We first investigated the existence of direct benefits to females from mating with virgin males in terms of fecundity, fertility, and longevity. Secondly, we quantified the motivation to remate in females mated with virgin or non-virgin males. Finally, we assessed if whether *L. botrana* females preferred to mate with virgin males rather than with recently mated males, with the assumption that female should optimize mate choice to obtain male-derived nutrients. We also monitored the premating behavior of virgin and non-virgin males to characterize behavioral differences of virgin and non-virgin males that might explain female mating preference. We predicted that female would be able to discriminate between a non-virgin and a virgin male and, given the choice, would preferentially mate with the virgin.

MATERIALS & METHODS

Moth rearing and general procedures

All adults used were obtained from an inbred strain of *L. botrana* (INRA Bordeaux). The stock colony was maintained without diapause on a semi-artificial diet (1L water, 15 g agar, 84.63

g maize flour, 41.25 g wheat germ, 45.48 g yeast, 6.03 g ascorbic acid, 3.35 g Wesson salts, 0.32 mL Scala, 5 mL ethanol [95%], 2.65 g benzoic acid, 2.76 g Nipagin), as described previously (Thiéry and Moreau, 2005), and maintained at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity, under a 16:8 hour light:dark photoperiod. Males and females were placed in a large cage and bands of waxed paper (15×2 cm) were hung for oviposition support. Once the paper had received a sufficient number of eggs, it was placed in a plastic box containing the semi-artificial larval diet. The larvae were maintained at a density of 100 individuals per 300 ml of diet. Larvae were checked daily until pupation, and then were weighed to the nearest 0.01 mg on a Precisa 262 SMA-FR microbalance and placed individually in glass tubes (70×9 mm diameter) stoppered with cotton plugs. Pupae were checked every morning, and newly emerging virgin adults were used for subsequent experiments under the same conditions as rearing.

Effects of male mating experience on male and female fitness

No-choice mating trials: general procedure

At dusk, a randomly selected 2-day-old virgin female was mated with either a virgin or a non-virgin 3-day-old male in a glass mating tube (100×15 mm diameter) and observed until the end of copulation. The onset time (time elapsed from the start of the session until genital coupling) and the duration of mating (time during which the pair was observed) were noted. Couples were observed for 4 hours, corresponding to the period during which females called males by releasing their pheromone (Muller, personal observations), and couples that failed to mate within this period were excluded from the experiment.

Non-virgin males were obtained by first pairing 2-day-old virgin males with 2-day-old virgin females in a mating tube one day before the experiment and then returning them to their glass tube after observing copulation. Females were dissected immediately after mating to check for spermatophore transfer. When copulation occurred but no spermatophore was found in the female's genital duct, the male was excluded from the experiment. Virgin males were kept in their glass tubes with no mating opportunity until they were used in the experiment.

Using this procedure, we performed two distinct experiments under the same conditions as moth maintenance (see above). The first experiment was conducted to assess mating success and the volume of the spermatophore transferred to the female during mating for virgin and non-virgin males. The second experiment was conducted to investigate the effect of the male

mating experience on the oviposition dynamics of females and their refractory period and motivation to remate.

Experiment 1: Effect of mating experience on spermatophore volume

Immediately after the end of mating with a virgin ($n = 76$) or a non-virgin ($n = 118$) male, females were frozen at -25°C for ten minutes and then dissected on a glass slide. The bursa copulatrix containing the male spermatophore was removed in order to estimate its size. Estimating spermatophore size by extrapolating its volume is the method classically used in moths, including *L. botrana* (Torres-Vila et al. 1999; Milonas et al. 2011; Muller et al. 2015). To assess spermatophore size, we measured its dimensions (length [l], width [w], and thickness [t]) under a stereomicroscope (NIKON SMZ1500) with a magnification of 20X. The volume of the spermatophore was estimated as an ellipsoid balloon [$V = \pi/6 (l \times w \times t)$], as described previously (Torres Vila et al. 1999).

Experiment 2: Effect of mating experience on both female oviposition and recalling dynamics and on female reproductive output

After the end of copulation with virgin ($n = 34$) or non-virgin ($n = 36$) males, males were removed and females were maintained in their mating tube until death to assess reproductive output and motivation to remate. These females were allowed to oviposit freely on the inside surface of the glass tub until their death. Every day, newly laid eggs were counted daily through the tube. Female survival was also checked daily; after death, the eggs were incubated for 7 days under the same conditions as used for moth maintenance. With this procedure, we recorded (i) time spent ovipositing, (ii) daily fecundity (number of eggs laid per day), (iii) achieved fecundity (total number of eggs laid during a female's lifespan), (iv) female fertility (proportion of hatched eggs), and (v) longevity.

To assess motivation to remate, each day until their death we simultaneously monitored the behavior of females that had previously copulated with either a virgin or non-virgin male. In this species, a female that is ready to remate signals her readiness by releasing sex pheromone at dusk, an action that represents a fitness cost to her (Harari et al. 2011). The female does this by assuming a calling position with wings raised and pheromone gland exposed. To obtain an index of female motivation, we recorded the occurrence of this calling behavior every 3 minutes during a 1-hour period at dusk (each day, females that did not recall at all were excluded from the analysis) – the longer the recalling period, the higher the motivation to mate (Torres-Vila et al. 2002). With this procedure, we also obtained (i) the refractory

period of females, corresponding to the number of days elapsed between the mating and the first day we observed the recalling behavior; (ii) the percentage of females that were motivated to remate during their remaining lifespan, (iii) the female motivation to remate, expressed as the proportion of time a female was observed in calling position during 1 hour; and (iv) the number of days a female exhibited the recalling behavior.

Female choice trials and precopulatory mating behaviors of virgin and non-virgin males

To explore whether females preferred to mate with virgin males over recently mated males, we performed a choice triad test in which two males (one 3-day-old-virgin and one 3-day-old-non-virgin) were simultaneously presented to one virgin female in a mating tube, as described above ($n = 44$ triad mating trials). Each triad was observed until copulation started. To control for the effect of male mass, males with equal pupal masses were selected and were marked similarly by removing the scales on one of their wings. Marking did not influence female choice ($\chi^2_1 = 0.41$, $p = 0.522$). Precopulatory behaviors of the three individuals were videotaped (SONY HDR CX220E) until mating occurred. We recorded three behaviors reflecting female and male sexual motivations (Muller et al. 2015). To evaluate the female motivation to mate, we assessed the percentage of time in calling position, expressed as the time spent calling divided by the onset time of mating $\times 100$. To evaluate the male motivation to mate, we recorded two different proxies: (i) the latency to the first male mating attempt, corresponding to curving their abdomen and touching the female abdomen without successful copulation, and (ii) the percentage of male activity, expressed by the time spent in movement by the male divided by the onset time of mating $\times 100$. The number of mating attempts by each male can be viewed as an indicator of rejection by the female. In general, females have the opportunity to reject males after an intromission attempt by kicking them or walking away (Jones 2001; Jones and Elgar 2004). Preliminary tests suggested that *L. botrana* females rejected their mate several times before copulation (Muller, unpublished results); thus, we scored these female rejection behaviors against virgin and non-virgin males.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using R Software version 3.2.0 (R Core Team, 2015). For each analysis, we reported the full model, deleting insignificant interactions, following Forstmeier and Schielzeth (2011). To assess the mating success of males (percentage of successful mating) according to male mating experience (virgin vs. non-virgin) in no-choice mating trials, we used Pearson's χ^2 tests. The effects of mating experience on spermatophore

volume and mating duration were analyzed with ANCOVAs, with the pupal mass of males and females as covariates.

We used generalized linear modeling to estimate the sources of variation in fecundity. Because lifetime fecundity was best approximated by an over-dispersed Poisson distribution, we fitted the model with a negative binomial error structure (Bolker et al. 2009). We also improved the model by specifying that the data were zero inflated. This analysis was performed using the glmmADMB library (Skaug et al. 2013), including time, male mating experience and their interactions as fixed effects, male and female mass as covariates, and female identity as a random factor. A generalized linear model (GLM) using a quasi-binomial error structure and a logit link function was used to analyze the proportion of eggs hatched by females mated with virgin and non-virgin males. Finally, a Cox regression analysis was applied to assess the influence of male mating experience, female pupal mass, and fecundity on female longevity.

Because percent calling could not be normalized, a nonparametric factorial repeated measures analysis of longitudinal data was performed using the package nparLD in R (Noguchi et al. 2012) to determine how time, male mating experience, and their interaction affected the intensity of female motivation to remate. Repeated measures were analyzed using the F1-LD-F1 model of the nparLD function to calculate an ANOVA-type statistic.

Due to heteroscedasticity, female motivation to remate (percent of time spent in recalling position) and male activity (percent of time spent in movement) were arcsin square root-transformed prior to analysis. The effect of male mating experience on male and female precopulatory behaviors were analyzed with ANCOVAs, with the pupal mass of males and females as covariates, respectively. Because data on male mating attempts were counted and were over-dispersed, a GLM with a negative binomial distribution (NBGLM) was used to assess the effect of male mating experience on mating attempts.

RESULTS

No choice trials – Experiment 1: Effect of mating experience on spermatophore volume

In no-choice mating trials, no effect of male mating experience (virgin vs. non-virgin) was detected on mating success, with approximately 85% of males successfully copulating ($\chi^2 = 0.001$, $p = 0.973$; Table 1). The onset time of mating did not vary with male mating experience ($W = 0.3$, $p = 0.586$; Table 1) or male mass ($W = 1.4$, $p = 0.237$). Mating duration was affected by male mating experience; copulation with a non-virgin male lasted 33% longer than that with a virgin male ($F_{1,192} = 128.1$, $p < 0.0001$, corrected for male mass; Table 1).

Table 1. Summary results from no-choice trials showing mating success, onset time, duration of mating and spermatophore volume (Experiment 1), and reproductive traits and longevity of *L. botrana* females (Experiment 2) according to the mating experience of males (virgin vs. non-virgin). Values are expressed as a percentage (mating success) or as means $\pm$ SEM (all other parameters). Values in each column denoted by different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$).

No-choice trials Male mating experience	Experiment 1				Experiment 2			
	Mating success ¹ (%)	Onset time of mating ² (min)	Duration of mating ³ (min)	Spermatophore volume ³ ($\times 10^{-6}$ mm ³)	Fecundity ⁴ (eggs/female)	Time spent ovipositing ³ (days)	Fertility ⁵ (% of eggs hatched)	Longevity ² (days)
Virgin	84.89	4.6 $\pm$ 0.3	62.8 $\pm$ 1.3 (a)	133.3 $\pm$ 2.8 (a)	103.2 $\pm$ 7.9 (a)	7.1 $\pm$ 0.4 (a)	85.8 $\pm$ 2.6	11.5 $\pm$ 0.4
Non-virgin	87.36	5.0 $\pm$ 0.6	83.7 $\pm$ 1.2 (b)	26.7 $\pm$ 1.1 (b)	77.9 $\pm$ 7.7 (b)	5.3 $\pm$ 0.3 (b)	87.9 $\pm$ 2.9	11.7 $\pm$ 0.5

¹Pearson χ^2 ; ²Cox regression ; ³ANCOVA ; ⁴GLMMADMB ; ⁵GLM with quasi-binomial error

Table 2. Summary results from choice trials ($n = 44$) of *L. botrana* females successfully mated with virgin ($n = 30$) or non-virgin ($n=14$) males showing mating parameters and precopulatory behaviors. Values are expressed as a ratio (successful matings) or as means $\pm$ SEM (all other parameters). Values in each column denoted by different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$).

Choice trials Male mating experience	Mating parameters			Precopulatory behaviors of males and females			
	Number of successful matings ¹	Onset time of mating ² (s)	Duration of mating ³ (min)	% of time spent in calling position ³	Latency to the first mating attempt ² (s)	Percentage of male activity ³	Number of female rejections ⁴
Virgin	30/44 (a)	182.6 $\pm$ 22.6 (a)	60.9 $\pm$ 2.1 (a)	27.2 $\pm$ 3.6	72.4 $\pm$ 17.1	52.0 $\pm$ 4.2	4.4 $\pm$ 0.5 (a)
Non-virgin	14/44 (b)	309.0 $\pm$ 57.1 (b)	91.9 $\pm$ 9.7 (b)	32.9 $\pm$ 5.3	90.6 $\pm$ 17.1	47.5 $\pm$ 3.6	7.5 $\pm$ 0.9 (b)

¹Pearson χ^2 ; ²Cox regression ; ³ANCOVA ; ⁴NBGLM

Spermatophores transferred by virgin males were on average more than five times larger than those transferred by non-virgin males (Table 1). In addition, heavier males produced larger spermatophores when they were virgin, but male mass did not affect spermatophore volume of non-virgin males (main model: $F_{3,190} = 338.4$, $p < 0.0001$; interaction male mating experience $\times$ male mass: $p = 0.010$).

No choice trials – Experiment 2: Effect of mating experience on female oviposition dynamics and on female reproductive output

Females that mated with virgin males had higher achieved fecundity than those mated with males that had previously mated ($F_{1,67} = 10.03$, $p = 0.002$, corrected for male and female mass; Table 1). As shown in Figure 1, daily fecundity, corresponding to the number of eggs laid by females per day, greatly depended on time elapsed since mating ($F = 191.56$, $df = 14$, $p < 0.0001$), male mating experience ($F = 8.78$, $df = 1$, $p = 0.003$) and their interaction ($F = 49.94$, $df = 14$, $p < 0.0001$), and was positively correlated with female mass ($F = 11.52$, $df = 1$, $p = 0.0007$). The number of eggs laid was the highest 2 days after mating and decreased daily until the death of the female, regardless of the experience of males (Fig. 1).

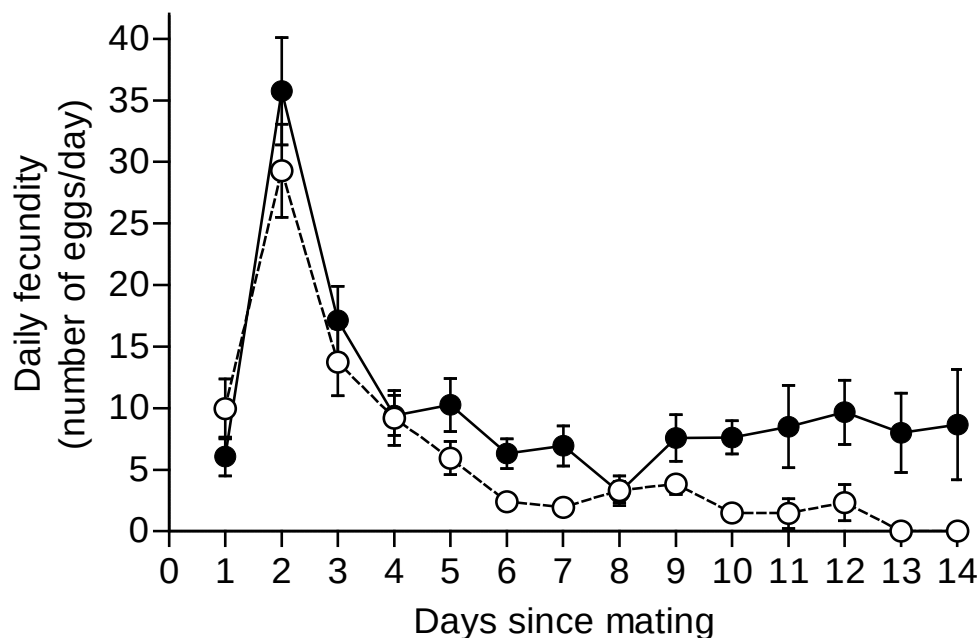


Figure 1. Number of eggs laid daily by females mated with virgin males (black circles and line) or non-virgin males (white circles and dashed line). Results are presented as means $\pm$ SEM. Day 0 corresponds to the day of copulation.

However, females mated with virgin males laid more eggs at the end of their life than females mated with non-virgin males (Figs 1 and 2). This increase in eggs laid by females mated with virgin males at the end of their life was confirmed by dividing oviposition period into two sequences: eggs laid in the first half of the oviposition period versus eggs laid in the second half of the oviposition period for a given female (Fig. 2). Females mated with virgin males laid more eggs than females mated with non-virgin males in the second half of the oviposition sequence, whereas there was no difference during the first half of the oviposition sequence (first sequence: $F_{1,67} = 2.0$, $p = 0.163$; second sequence: $F_{1,67} = 23.7$, $p < 0.0001$; corrected for male and female mass, Fig. 2). In addition, females mated with virgin males spent more time ovipositing ($F_{1,67} = 14.41$, $p = 0.0003$, corrected for male and female mass; Table 1). Male mating experience affected neither female fertility ($F_{1,67} = 9.67$, $p = 0.447$, corrected for male and female mass) nor female longevity (Cox regression, $W = 2.46$, $p = 0.29$, Table 2). However, we found a trade-off between fecundity and longevity: females with higher fecundity had diminished longevity regardless of the experience of their mate (Cox regression: $W = 8.91$, $p = 0.012$).

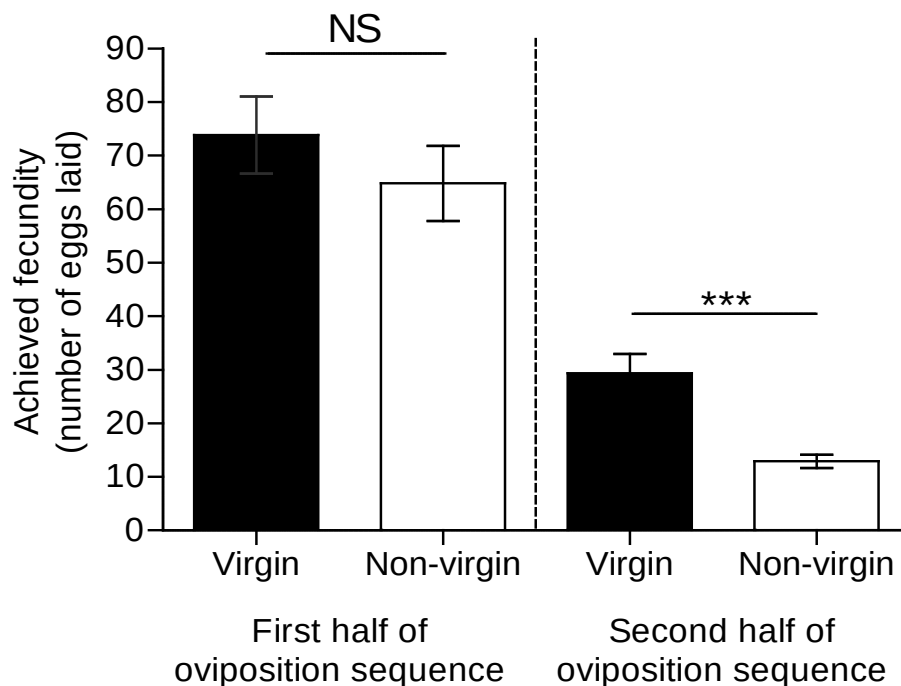


Figure 2. Number of eggs laid by females mated with virgin (black bars) or non-virgin (white bars) males in the first and the second half of their oviposition period (oviposition period was separated in two sequences by the median for a given female). Results are presented as means $\pm$ SEM (***) $P < 0.0001$; NS, non-significant difference [$P > 0.05$]).

No choice trials – Effect of mating experience on female recalling dynamics

A higher proportion of females were motivated to remate during their lifetime after mating with a non-virgin male ($n = 32/36$, 88.9%) compared to females mated with a virgin male ($n = 22/34$, 64.7%) ($\chi^2_1 = 4.51$, $p = 0.034$). The mean length of the refractory period was longer in females mated with virgin males (4.0 ± 0.3 days) than for those mated with non-virgin males (2.0 ± 0.3 days) (Cox regression: $W = 12.42$, $p = 0.0004$). Females mated with non-virgin males resumed calling longer (5.7 ± 0.6 days) than females mated with virgin males (3.5 ± 0.4 days) ($F_{1,52} = 7.54$, $p = 0.008$, corrected for female mass). In addition, females mated with non-virgin males were more motivated to remate than females mated with virgin males and their motivation increased over time (time effect: $F = 3.29$, $df = 4.92$, $p = 0.006$; male mating experience effect: $F = 48.4$, $df = 1$, $p < 0.0001$; Fig. 3).

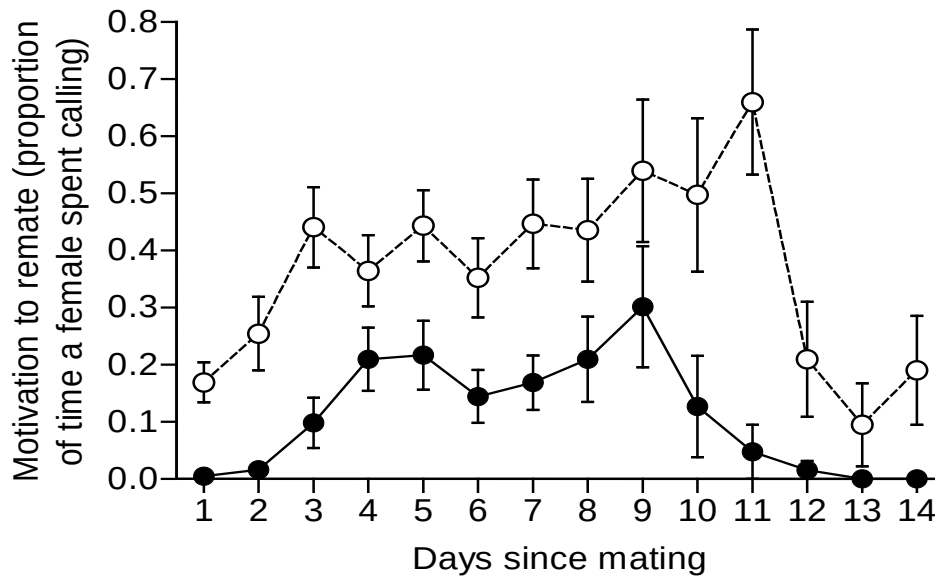


Figure 3. Daily motivation to remate in females mated with virgin males (black circles and line) or non-virgin males (white circles and dashed line), expressed as the proportion of time observed in calling position during 1 hour. Results are presented as means $\pm$ SEM, excluding females that did not call at all.

Female choice trials – Mating success and precopulatory mating behaviors of virgin and non-virgin males

When females could choose between two males, they were more likely to mate with a virgin than a non-virgin male ($\chi^2_1 = 10.23$, $p = 0.001$; Table 2 & Fig. 4). Non-virgin males required more time to successfully mate than virgin males (Cox regression, $W = 5.31$, $p = 0.021$; Table 2). As in no-choice tests, mating duration was affected by male mating experience and was

50% longer for non-virgin than for virgin males ($F_{1,42} = 14.43$, $p = 0.0004$, corrected for male mass; Table 2). Female motivation to mate was comparable among all females regardless of the mating status of the male with which they mated ($F_{1,42} = 0.75$, $p = 0.392$; Table 2). In addition, male mating experience did not affect the latency to the first mating attempt ($W = 1.86$, $p = 0.394$, corrected for male mass) or the percentage of time spent in activity ($F_{1,86} = 0.98$, $p = 0.326$, corrected for male mass; Table 2). Females did not mate preferentially with a more active male, whether virgin ($\chi^2_1 = 0.83$, $p = 0.361$) or non-virgin ($\chi^2_1 = 0.07$, $p = 0.789$). Non-virgin males attempted copulation significantly more frequently than virgin males, suggesting that females were more likely to reject a non-virgin male (number of female rejections, $F_{1,86} = 8.45$, $p = 0.003$, corrected for male mass; Table 2).

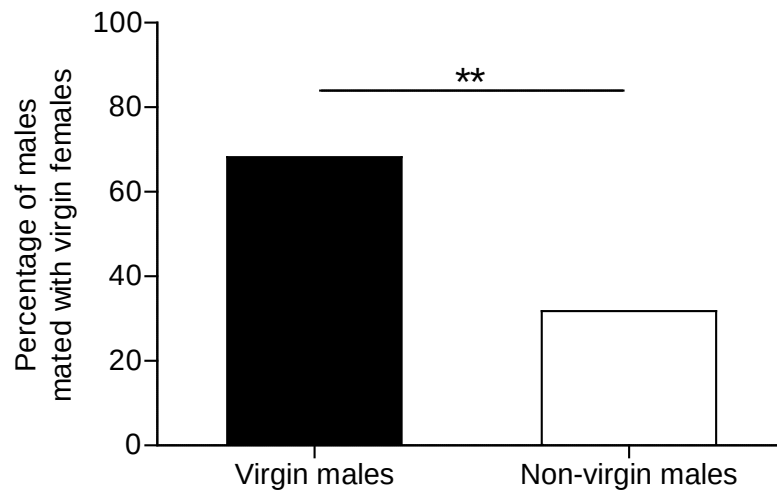


Figure 4. Percentage of virgin (black bar) and non-virgin (white bar) males mated with *L. botrana* females. (** $P < 0.001$).

DISCUSSION

A major outstanding question in the evolution of female mate choice is why females should discriminate among males and on what basis they evaluate their mate quality in order to maximize benefits and minimize mating costs? Female mate choice could be explained by two possible scenarios (Kokko et al. 2003). First, theoretical and empirical models of the evolution of mate preferences have found evidence for both direct and indirect benefits of female mate choice (Iwasa and Pomiankowski 1999; Kokko et al. 2003). Other studies have suggested that sexual conflict over mating may result in the evolution of mate choice. In this scenario, females choose mates not in order to receive benefits but to minimize mating costs imposed by males (Hosken and Snook 2005).

The aim of our study was to determine if monandrous females of *L. botrana* species are able to discriminate among males of different qualities based on their mating experience so as to maximize direct benefits (by receiving large spermatophores from virgin males) and minimize mating costs (by avoiding low-quality non-virgin males). Our data revealed that, in a no-choice test, females mated equally with a virgin or a non-virgin male, despite a fitness cost in terms of reduced fecundity to mate with a non-virgin male. However, when virgin and non-virgin males were presented simultaneously, the virgin male was accepted twice as often by the female. This difference in mating success has apparently arisen as a result of female preference for virgin males, as there were no observable behavioral differences between virgin and non-virgin males in their motivation to mate (latency to first mating attempt and general activity levels). Moreover, females more frequently rejected non-virgin over virgin males, strengthening the existence of female preference for virgin males. Females mated with virgin males were poorly motivated to remate, suggesting that only one mating with a virgin male is sufficient to boost their reproductive output. These results suggest that females derive immediate fitness benefits through increased fecundity from their choice.

As in several other studies, we found that spermatophore size decreased and copulation duration increased if the male had recently mated before (Torres-Vila and Jennions 2005; Konopka and McNeil 2015). Mating with a non-virgin male increased mating costs by increasing the time in copula (33% longer with non-virgin males). This prolonged copulation could be a non-virgin male strategy to reduce sperm competition with future ejaculates if the male itself acts as a mating plug that prevents the female from remating before oviposition (“in copula” guarding hypothesis, reviewed by Alcock 1994). Indeed, this post-copulatory strategy could be particularly effective because in *L. botrana* species, the mating period occurs each day at dusk during a few hours and we observed that females receiving small spermatophores tended to recall sooner after mating, sometimes only 1 hour after copulation (Muller, personal observations). Remaining in copula for more than 1 hour may be sufficient to prevent female remating on the same day, ensuring sperm transfer from the non-virgin male. Indeed, in several butterfly and moth species, sperm generally reaches the spermatheca between 2 and 5 hours after mating (Seth et al. 2002; Marcotte et al. 2003). Spermatophore size was positively correlated with pupal mass for virgin males, but not for non-virgin males, as observed in several other lepidopteran species (Watanabe et al. 1998; Wedell and Cook 1999). In our study, spermatophores delivered by non-virgin males were about five times smaller than those transferred by virgin males, and probably contained low amounts of accessory gland secretions, as observed in a wide range of species (Wedell and Cook 1999;

Marcotte et al. 2005; Blanco et al. 2009). In capital breeders, the production of spermatophores is limited by reserves stored as larvae. Therefore, the first mating of a capital breeder male is certainly the most quantitatively important because a large proportion of his stored reserves is directly used in the production of its first spermatophores. Further work is needed to determine how larval nutrition affects energy reserves of adult males and how these stored reserves are reallocated into reproductive traits of males (reproductive capacity, spermatophore quality).

Females mated to non-virgin males suffered a 25% reduction in lifetime fecundity, a finding in agreement with reports on the majority of Lepidoptera species (reviewed by Torres-Vila and Jennions 2005). The large differences between spermatophores of virgin and non-virgin males suggest that the effects on female lifetime fecundity are directly mediated by differences in quantities of nutrients for egg production. Moreover, male mating experience influences female oviposition dynamics. The number of eggs laid per day showed a stronger decline in females mated to non-virgin males compared to those mated with virgin males. At the beginning of the oviposition period, females mated with non-virgin males laid as many eggs as females mated with virgin males. These eggs probably correspond to the initial egg load of the female (i.e., the number of mature eggs a female has available to lay at emergence). However, in the second half of the oviposition period, females that had mated with non-virgin males almost stopped laying compared with females that had received a large spermatophore from virgin males. Thus, females mated with virgin males produced more eggs at the end of their oviposition period, corresponding to the time the female needs to incorporate male-derived nutrients into their eggs; these laid eggs probably correspond to the male contribution. Several studies have demonstrated that the time required to incorporate spermatophore-derived nutrients into maturing oocytes is highly variable and depends on the species and its reproductive effort throughout life, for example, occurring within 2 days after mating for a lampyrid species (*Photinus ignitus*, Rooney and Lewis 1999) and not before 15–20 days for a lepidopteran species (*Heliconius charitonius*, Boggs 1990). Despite these benefits in fecundity, females mated with non-virgin males that had received a small spermatophore did not exhibit reduced fertility (85.8% of hatched eggs vs. 87.9% for females mated with virgin males), suggesting that a large spermatophore is not a condition for functional sperm transfer. This absence of effect on female fertility is certainly attributable to the fact that the male usually transfers considerably more sperm than is necessary to fertilize all female eggs, even if it has recently mated (Curril and LaMunyon 2006; Bezzerides et al. 2008). A further experiment should be performed to evaluate the number of fertilizing eupyrene sperm

contained in spermatophores transferred by virgin and non-virgin males. Female longevity in our experiment was not influenced by male mating experience. This result, which is consistent with other studies that found no relationship between ejaculate size and female longevity (Delisle and Bouchard 1995; Jiao et al. 2006; Marcotte et al. 2007; South and Lewis 2011), confirms that spermatophore-derived nutrients are only used for female reproduction in this species.

Females that mate with previously mated males may not receive enough male-derived nutrients to boost their reproductive potential and should compensate by being more likely to remate or by remating sooner than females mated to virgin males (Foster and Ayers 1996; Marcotte et al. 2007). We found that, after mating with a non-virgin male, 88.9% of females recalled at dusk and were motivated to remate, whereas only 64.7% of those mated with virgin males did. Moreover, females mated with non-virgin males recalled males sooner (2 days) than females mated with virgin males (4 days), a finding consistent with the literature on Lepidoptera species (Torres-Vila et al. 1997; Wedell and Cook 1999; Marcotte et al. 2005). Moreover, the length of the refractory period in moths can be affected by several factors, including spermatophore size (McNamara et al. 2009) and the quality and quantity of viable sperm and secretions of the male accessory gland transferred to the female during mating (Simmons 2001; Wedell 2005). In our experiment, it is possible that larger spermatophores produced by virgin males activate stretch receptors in the female reproductive tract (Sugarawa 1979), inducing a long refractory period. In addition to this proximate mechanism for post-mating non-receptivity, the presence of sperm in the spermatheca may be required to elicit pheromonostasis in *L. botrana*, similar to other Lepidoptera species in which females only become unreceptive if their spermatheca is full of sperm (Giebultowicz et al. 1991; Karube and Kobayashi 1999). However, female receptivity in butterflies is not only affected by the presence of sperm; some males transfer anti-aphrodisiacs at mating that temporarily reduce female attractiveness (Andersson et al. 2003). Further investigations on the composition of the male spermatophore (sperm and anti-aphrodisiac substances) in *L. botrana* are needed to better understand the effect of male mating experience on female motivation to remate.

To summarize our results in no-choice trials, non-virgin males may be lower-value mates than virgin males because, even though male mating experience did not influence their mating success, non-virgin males inseminate smaller spermatophores with less nutritive components, which has a profound effect on female fecundity, especially in the second half

of the oviposition period. Because of this beneficial effect of mating with a virgin male, one might expect that virgin females would avoid mating with non-virgin males and would prefer virgin males so as to acquire more direct benefits (Wedell et al. 2002). Consistent with these predictions, our study revealed that virgin males were twice as likely to mate with females compared to non-virgin males in choice trials. Some studies have shown that the level of activity of males may play a role in their probability of mating (Kotiaho 2002; Scharf et al. 2013), and non-virgin males could be physically unable to produce the same level of courtship as sexually vigorous virgin males (Janowitz and Fischer 2010). However, in our study, both virgin and non-virgin males were equally active during courtship, and virgin males did not attempt to copulate earlier with females than non-virgin males, suggesting that virgin males have the same motivation to mate as non-virgin males. Thus, we did not find that males changed their mating behavior as they gained experience, unlike others have reported (Kaitala and Wiklund 1994). These behavioral observations allow us to rule out the possibility that virgin males are superior competitors because female preference for virgin males are not likely driven by differences in male courtship. However, we observed female behavior consistent with discrimination against non-virgin males. The greater reproductive success of virgin males certainly reflects an active female preference for these males, because females more frequently actively rejected non-virgin males (7.5 times) than virgin males (4.4 times) before accepting mating, and non-virgin males required more than twice as much time to successfully mate with females than virgin males. These results strongly suggest that *L. botrana* females can evaluate male mating experience using different visual and/or olfactory cues (Harris and Moore 2005; Costanzo and Monteiro 2007), but our study could not identify these cues. A similar mate-selection dynamic in which the corresponding cue is relatively clear is the case of the sagebrush cricket, *Cyphoderris strepitans* (Orthoptera: Haglidae). In this species, the female feeds on the male's wings during mating and females prefer males whose wings have not been consumed, as would be true of virgin males (Sakaluk et al. 2004). Although our study was not designed to establish the proximal causes of female discrimination, our results allow us to formulate some hypotheses. For example, since *L. botrana* females seem to reject male mating attempts, it would be interesting to explore whether the structure of male genitalia (such as claspers or spines) change with mating experience in *L. botrana* males and if it can serve as a cue for female mate choice. Moreover, chemical cues are important in mate selection in many kinds of organisms (Wyatt 2003) and may be used by one or both sexes to derive complex information about potential mates. Pheromone or cuticular hydrocarbon substances produced by females and acquired by males

during copulation may advertise their previous mating experience (Scott et al. 1988; Harris and Moore 2005). In several moth species, females are capable of identifying the pheromone scent produced by males and should be able to assess their quality since pheromone production alters with age and probably with mating history (Lassance and Löfstedt 2009). In *L. botrana*, the sex pheromone of females has been investigated for several decades (Roelofs et al. 1973), but there is no evidence for male sex pheromone production in this species. Another possibility is that non-virgin males are imbued with female substances from their first mating. Females may use chemical cues left behind during previous male-female interactions to gain information about the mating experiences of males. Such “perfumed” non-virgin males could be recognized and avoided by virgin females in order to minimize the mating costs associated with sperm-depleted males.

In conclusion, the European grapevine moth provides evidence that, in a monandrous capital breeder species, male mating experience greatly influences female fitness, and that female mate choice may evolve to maximize benefits by preferentially mating with virgin males. These results were expected since all the required conditions for the evolution of these female preferences for virgin males have been fulfilled in this capital breeding monandrous species. In such a system, males should also discriminate between females of different qualities, such as body mass or mating experience (Bonduriansky 2001; Friberg 2006), because nutritious ejaculates are costly to produce and should be invested prudently. In studies that did not confirm these findings or even demonstrated the reverse (Krupke et al. 2008; Iyengar 2009; McNamara et al. 2009; Milonas et al. 2011), it is likely that the effect of male mating experience on female reproductive output on the considered species may not be as high as that for *L. botrana* species. For example, despite an apparent reduction in male gametic investment, there is no reproductive cost to the female almond moth *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) that mates with non-virgin males (Milonas et al. 2011). Thus, some caution should be exercised in exploring the reproductive strategies of a species, because its mating patterns greatly depend on the combined effects of its mating system, its feeding habits, and the importance of male-donated nuptial gifts.

REFERENCES

- Alcock J.** 1994. Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Ann Rev Entomol.* 39:1-21.
- Andersson J, Borg-Karlson AK, Wiklund C.** 2003. Antiaphrodisiacs in pierid butterflies: a theme with variation! *J Chem Ecol.* 29:1489-1499.
- Andersson M, Simmons LW.** 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends Ecol Evol.* 21:296-302.
- Arnqvist G, Nilsson T.** 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim Behav.* 60:145-164.
- Bezzerides AL, Iyengar VK, Eisner T.** 2008. Female promiscuity does not lead to increased fertility or fecundity in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *J Insect Behav.* 21:213-221.
- Blanco CA, Rojas MG, Groot AT, Morales-Ramos J, Abel CA.** 2009. Size and chemical composition of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) spermatophores. *Ann Entomol Soc Am.* 102:629-637.
- Bonduriansky R.** 2001. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biol Rev.* 76:305-339.
- Boggs CL, Gilbert LE.** 1979. Male contribution to egg production in butterflies: evidence for transfer of nutrients at mating. *Science.* 206:83-84.
- Boggs CL.** 1990. A general model of the role of male-donated nutrients in female insects' reproduction. *Am Nat.* 136:598-617.
- Boggs CL, Freeman KD.** 2005. Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia.* 144:353-361.
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White JSS.** 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol.* 24:127-135.
- Cahenzli F, Erhardt A.** 2013. Nectar amino acids enhance reproduction in male butterflies. *Oecologia.* 171:197-205.
- Cameron E, Day T, Rowe L.** 2003. Sexual conflict and indirect benefits. *J Evol Biol.* 16:1055-1060.
- Costanzo K, Monteiro A.** 2007. The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *P Roy Soc Lond B Bio.* 274: 845-851.
- Curril IM, LaMunyon CW.** 2006. Sperm storage and arrangement within females of the arctiid moth *Utetheisa ornatrix*. *J Insect Physiol.* 52:1182-1188.
- Delisle J, Bouchard A.** 1995. Male larval nutrition in *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae): an important factor in reproductive success. *Oecologia.* 104:508-517.

- Elzinga JA, Chevasco V, Grapputo A, Mappes J.** 2011. Influence of male mating history on female reproductive success among monandrous Naryciinae (Lepidoptera: Psychidae). *Ecol Entomol.* 36:170-180.
- Friberg U.** 2006. Male perception of female mating status: its effect on copulation duration, sperm defence and female fitness. *Anim Behav.* 72:1259-1268.
- Forstmeier W, Schielzeth H.** 2011. Cryptic multiple hypotheses testing in linear models: overestimated effect sizes and the winner's curse. *Behav Ecol Sociobiol.* 65:47-55.
- Foster SP, Ayers RH.** 1996. Multiple mating and its effects in the lightbrown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker). *J Insect Physiol.* 42:657-667.
- Giebultowicz JM, Raina AK, Uebel EC, Ridgway RL.** 1991. Two-step regulation of sex-pheromone decline in mated gypsy moth females. *Arch Insect Biochem.* 16:95-105.
- Harari AR, Zahavi T, Thiéry D.** 2011. Fitness cost of pheromone production in signaling female moths. *Evol.* 65:1572-1582.
- Harris WE, Moore PJ.** 2005. Female mate preference and sexual conflict: females prefer males that have had fewer consorts. *Am Nat.* 165:S64-S71.
- Harshman LG, Zera AJ.** 2007. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol Evol.* 22:80-86.
- Hosken D, Snook R.** 2005. How important is sexual conflict? *Am Nat.* 165:S1-S4.
- Iwasa Y, Pomiankowski A.** 1999. Good parent and good genes models of handicap evolution. *J Theor Biol.* 200:97-109.
- Iyengar VK.** 2009. Experience counts: females favor multiply mated males over chemically endowed virgins in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Behav Ecol Sociobiol.* 63:847-855.
- Janowitz SA, Fischer K.** 2010. Costing reproduction: effects of mating opportunity on mating success in male *Bicyclus anynana* butterflies. *Behav Ecol Sociobiol.* 64:1999-2006.
- Jiao X, Xuan W, Sheng C.** 2006. Effects of delayed mating and male mating history on longevity and reproductive performance of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *J Appl Entomol.* 130:108-112.
- Jiménez-Pérez A, Wang Q.** 2004. Male remating behavior and its effect on female reproductive fitness in *Cnephasia jactatana* Walker (Lepidoptera: Tortricidae). *J Insect Behav.* 17:685-694.
- Jones TM.** 2001. A potential cost of monandry in the lekking sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *J Insect Behav.* 14:385-399.
- Jones TM, Elgar MA.** 2004. The role of male age, sperm age and mating history on fecundity and fertilization success in the hide beetle. *P Roy Soc Lond B Bio.* 271:1311-1318.
- Kaitala A, Wiklund C.** 1994. Female mate choice and mating costs in the polyandrous butterfly *Pieris napi* (Lepidoptera: Pieridae). *J Insect Behav.* 8:355-363.

- Karube F, Kobayashi M.** 1999. Presence of eupyrene spermatozoa in vestibulum accelerates oviposition in the silkworm moth, *Bombyx mori*. J Insect Physiol. 45:947-957.
- Klepetka B, Gould F.** 1996. Effects of age and size on mating in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for resistance management. Environ Entomol. 25:993-1001.
- Kokko H, Brooks R, Jennions MD, Morley J.** 2003. The evolution of mate choice and mating biases. P Roy Soc Lond B Bio. 270:653-664.
- Kokko H, Jennions MD, Brooks R.** 2006. Unifying and testing models of sexual selection. Annu Rev Ecol Syst. 37:43-66.
- Konopka JK, McNeil JN.** 2015. Mating status regulates post-mating refractory period in *Striacosta albicosta* females. Entomol Exp Appl. 155:80-85.
- Kotiaho JS.** 2002. Sexual selection and condition dependence of courtship display in three species of horned dung beetles. Behav Ecol. 13:791-799.
- Krupke CH, Brunner JF, Jones VP.** 2008. Factors influencing mate choice in *Euschistus conspersus* Uhler (Heteroptera: Pentatomidae). Environ Entomol. 37:192-197.
- Lassance JM, Löfstedt C.** 2009. Concerted evolution of male and female display traits in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. BMC Biol. 7:10.
- Lauwers K, Van Dyck H.** 2006. The cost of mating with a non-virgin male in a monandrous butterfly: experimental evidence from the speckled wood, *Pararge aegeria*. Behav Ecol Sociobiol. 60:69-76.
- Lewis SM, South A.** 2012. The evolution of animal nuptial gifts. Adv Study Behav. 44:53-97.
- Marcotte M, Delisle J, McNeil JN.** 2003. Pheromonostasis is not directly associated with post-mating sperm dynamics in *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana* females. J Insect Physiol. 49:81-90.
- Marcotte M, Delisle J, McNeil JN.** 2005. Impact of male mating history on the temporal sperm dynamics of *Choristoneura rosaceana* and *C. fumiferana* females. J Insect Physiol. 51:537-544.
- Marcotte M, Delisle J, McNeil JN.** 2007. Effects of different male remating intervals on the reproductive success of *Choristoneura rosaceana* males and females. J Insect Physiol. 53:139-145.
- Markow TA, Quaid M, Kerr S.** 1978. Male mating experience and competitive courtship success in *Drosophila melanogaster*. Nature. 276:821-822.
- Marshall LD.** 1982. Male nutrient investment in the Lepidoptera: what nutrients should males invest? Am Nat. 120:273-279.
- McNamara KB, Elgar MA, Jones TM.** 2009. Large spermatophores reduce female receptivity and increase male paternity success in the almond moth, *Cadra cautella*. Anim Behav. 77:931-936.

- Milonas PG, Farrell SL, Andow DA.** 2011 Experienced males have higher mating success than virgin males despite fitness costs to females. *Behav Ecol Sociobiol.* 65:1249-1256.
- Møller A, Jennions M.** 2001. How important are direct fitness benefits of sexual selection? *Naturwissenschaften.* 88:401-415.
- Monceau K, Baaren JV.** 2012. Female teneral mating in a monandrous species. *Ecol Evol.* 2:1426-1436.
- Muller K, Thiéry D, Moret Y, Moreau J.** 2015. Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Behav Ecol Sociobiol.* 69:39-47.
- Noguchi K, Latif M, Thangavelu K, Konietzschke F, Gel YR, Brunner E.** 2012. Package nparLD: Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments, 2012. R package version 2.0. <http://CRAN.R-project.org/package=nparLD>.
- Oberhauser KS.** 1989. Effects of spermatophores on male and female monarch butterfly reproductive success. *Behav Ecol Sociobiol.* 25:237-246.
- R Development Core Team.** 2015. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. (<http://www.R-project.org/>).
- Roelofs W, Kochansky J, Cardé R, Arn H, Rauscher S.** 1973. Sex attractant of the grape vine moth, *Lobesia botrana*. *Mitt Schweiz Entomol Ges.* 46:71-73.
- Rooney J, Lewis SM.** 1999. Differential allocation of male-derived nutrients in two lampyrid beetles with contrasting life-history characteristics. *Behav Ecol.* 10:97-104.
- Sakaluk SK, Campbell MT, Clark AP, Johnson JC, Keorpes PA.** 2004. Hemolymph loss during nuptial feeding constrains male mating success in sagebrush crickets. *Behav Ecol.* 15:845-849.
- Scharf I, Peter F, Martin, OY.** 2013. Reproductive trade-offs and direct costs for males in arthropods. *Evol Biol.* 40:169-184.
- Scott D, Richmond RC, Carlson DA.** 1988. Pheromones exchanged during mating: a mechanism for mate assessment in *Drosophila*. *Anim Behav.* 36:1164-1173.
- Seth RK, Kaur JJ, Rao DK, Reynolds SE.** 2002. Sperm transfer during mating, movement of sperm in the female reproductive tract, and sperm precedence in the common cutworm *Spodoptera litura*. *Physiol Entomol.* 27:1-14.
- Simmons LW.** 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton: Princeton University Press.
- Skaug HFD, Nielsen A, Magnusson A, Bolker B.** 2013. GlmmADMB package (0.6. 7.1 edn). (<http://glmmadmb.r-forge.r-project.org/>)
- South A, Lewis SM.** 2011. The influence of male ejaculate quantity on female fitness: a meta-analysis. *Biol Rev.* 86:299-309.

- Sugawara T.** 1979. Stretch reception in the bursa copulatrix of the butterfly, *Pieris rapae crucivora*, and its role in behaviour. *J Comp Physiol.* 130:191-199.
- Thiery D, Moreau J.** 2005. Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia.* 143:548-557.
- Tigreros N.** 2013. Linking nutrition and sexual selection across life stages in a model butterfly system. *Funct Ecol.* 27:145-154.
- Torres-Vila LM, Stockel J, Rodríguez-Molina MC.** 1997. Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Physiol Entomol.* 22:387-393.
- Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC, Roehrich R, Stockel J.** 1999. Vine phenological stage during larval feeding affects male and female reproductive output of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bull Entomol Res.* 89:549-556.
- Torres-Vila LM., Gragera J, Rodríguez-Molina MC, Stockel J.** 2002. Heritable variation for female remating in *Lobesia botrana*, a usually monandrous moth. *Anim Behav.* 64:899-907.
- Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC, Jennions MD.** 2004. Polyandry and fecundity in the Lepidoptera: can methodological and conceptual approaches bias outcomes? *Behav Ecol Sociobiol.* 55:315-324.
- Torres-Vila LM, Jennions MD.** 2005. Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners? *Behav Ecol Sociobiol.* 57:318-326.
- Vahed K.** 1998. The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. *Biol Rev.* 73:43-78.
- Velde LV, Damiens D, Van Dyck H.** 2011. Spermatophore and sperm allocation in males of the monandrous butterfly *Pararge aegeria*: the female's perspective. *Ethology.* 117:645-654.
- Watanabe M, Wiklund C, Bon'no M.** 1998. The effect of repeated matings on sperm numbers in successive ejaculates of the cabbage white butterfly *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *J Insect Behav.* 11:559-570.
- Wedell N, Cook PA.** 1999. Butterflies tailor their ejaculate in response to sperm competition risk and intensity. *P Roy Soc Lond B Bio.* 266:1033-1039.
- Wedell N, Gage MJ, Parker GA.** 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends Ecol Evol.* 17:313-320.
- Wedell N.** 2005. Female receptivity in butterflies and moths. *J Exp Biol.* 208:3433-3440.
- Wyatt TD.** 2003. Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste. Cambridge: Cambridge University Press.

CHAPITRE IV

EFFET DU CÉPAGE DE VIGNE SUR LA QUALITÉ DES MÂLES ET CONSÉQUENCES SUR LE POTENTIEL REPRODUCTIF DES FEMELLES

OBJECTIFS PRINCIPAUX DU CHAPITRE

Nous avons précédemment démontré que le transfert de larges spermatophores par les mâles vierges apportait d'importants bénéfices directs aux femelles, en augmentant notamment leur fécondité (Chapitre III). Ces spermatophores, riches en nutriments imposent un coût physiologique important pour les mâles et leur production est donc largement limitée (Dewsbury 1982, Janowitz & Fischer 2010, Scharf et al. 2013). De plus, à l'émergence, les mâles ne disposent que d'une quantité finie de ressources à investir (cette espèce étant à reproduction sur capital) dans la reproduction et dans leurs autres fonctions (comme la survie ou l'immunité). Ainsi, l'investissement du mâle dans la production de spermatophores devrait largement être contraint par sa condition, au sens de Hill (2011), c'est-à-dire par « *sa capacité relative à maintenir une fonctionnalité optimale de son système vital* », qui dépend donc de son état somatique, de son environnement, de son génotype et des interactions entre ces différentes composantes.

Chez les insectes holométaboles, les performances sexuelles condition-dépendantes sont grandement modulées par les ressources acquises pendant le développement juvénile (Cotton et al. 2004, Amitin & Pitnick 2007). Or, Eudémis est une espèce à reproduction sur capital. En effet, ce ravageur ne se nourrit pas à l'état adulte et les mâles et femelles émergeant des chrysalides disposent donc uniquement des ressources accumulées pendant leur développement larvaire pour survivre et se reproduire. La capacité des mâles à investir dans la reproduction est donc directement liée à la quantité de ressources énergétiques acquises à travers leur nutrition larvaire. Comme les plantes sont de qualités nutritives variables, la qualité reproductive des mâles dépend directement de la qualité du cépage de vigne sur lequel ils effectuent leur développement. Dans un tel contexte, on peut s'attendre à ce que le cépage de vigne, déjà identifié comme responsable d'une large part de la variabilité du succès reproducteur des femelles (Moreau et al. 2006^{a,b,c}) joue également un rôle primordial dans l'investissement reproductif des mâles chez cette espèce.

Les objectifs de ce chapitre sont donc : (i) de mettre en évidence l'impact de la nutrition larvaire sur différents cépages de vigne sur la « qualité » des mâles à travers la mesure de leurs réserves énergétiques et de leurs performances reproductives, (ii) d'évaluer comment la

« qualité » du mâle (notamment à travers la qualité du spermatophore qu'il transfère lors de l'accouplement) influence à son tour le potentiel reproductif des femelles (notamment leur fécondité et leur fertilité) et (iii) d'évaluer l'existence de stratégies de choix de partenaire modulés par le cépage de vigne chez cette espèce monandre à reproduction sur capital.

Dans ce Chapitre, nous allons étudier comment le cépage de vigne module la « qualité » de mâles prélevés en populations naturelles en s'intéressant tout d'abord à l'effet du cépage de vigne sur les performances des mâles lors du premier accouplement (quantité de spermatophore et de spermatozoïdes transférés) (partie IV.1). Puis, nous évaluerons l'effet du cépage de vigne sur les ressources énergétiques des mâles et sur cette fois-ci la qualité du spermatophore produit (taille et contenu en protéines) (partie IV.2). Ensuite, nous examinerons l'effet combiné du cépage de vigne et de l'expérience sexuelle du mâle (rang d'accouplement) sur leurs performances (partie IV.3). Ces trois expériences combinées nous permettront de déterminer d'une manière globale ce que représente un mâle de « bonne qualité » en tant que partenaire sexuel (i.e. un mâle capable de procurer de larges bénéfices directs aux femelles). Pour chacune de ces trois expériences, nous évaluerons également les conséquences pour les femelles à recevoir des spermatophores de qualité variable en fonction de la « qualité » des mâles les procurant (i.e. leur nutrition larvaire sur différents cépages et leur expérience sexuelle). Enfin, dans un quatrième sous-chapitre, l'existence d'un choix de partenaire de la part des mâles (qui ne disposent que d'un seul spermatophore riche à investir) en fonction du cépage d'origine des femelles sera exploré, ce facteur influant largement sur le potentiel reproductif de ces dernières (partie IV.4).

1. EFFET DU CÉPAGE DE VIGNE SUR LE PREMIER ACCOUPLEMENT DU MALE

Dans cette première étude, nous avons examiné comment la nutrition larvaire sur différents cépages pouvait moduler la qualité du spermatophore transféré aux femelles lors du premier accouplement des mâles (évaluée à travers la mesure de son volume et de son contenu en spermatozoïdes). Nous avons également évalué quelles étaient les répercussions du transfert d'un spermatophore de qualité variable sur le potentiel reproductif des femelles et si les deux partenaires exprimaient la même motivation à s'accoupler en fonction du cépage d'origine du mâle.

Des chenilles ont ainsi été récoltées sur le terrain à la fin de leur développement larvaire sur 3 différents cépages de vigne (Carignan, Grenache et Mourvèdre) au sein d'un même vignoble (Perpignan) et dans 3 différents sites géographiques (Nîmes, Sènas et Perpignan) sur le même cépage (Grenache) et ramenées au laboratoire pour réaliser les expériences. Une fois adultes, les mâles issus de différentes origines (cépages ou sites géographiques) ont été accouplés avec des femelles provenant d'une souche de laboratoire élevée à l'INRA de Bordeaux (maintenue dans des conditions standard de laboratoire sur du milieu semi-artificiel et supposée génétiquement homogène). Deux lots ont été constitués (suivant la procédure présentée dans le **MATÉRIEL & MÉTHODES, PARTIE 2.3**) afin de mesurer plusieurs traits comportementaux et reproductifs sur les deux partenaires. Un premier lot a servi à l'identification des comportements précopulatoires des mâles et des femelles reflétant leur motivation sexuelle (notamment à travers le comportement d'appel des femelles et le nombre de tentatives de copulations du mâle). À la fin de l'accouplement, les femelles de ce premier lot ont rapidement été disséquées afin d'extraire le spermatophore fraîchement transféré par le mâle et d'en mesurer le volume ainsi que le contenu en spermatozoïdes féconds (eupyrènes) et non-féconds (apyrènes). Un second lot a permis d'évaluer les conséquences sur le potentiel reproductif des femelles accouplées avec des mâles de différentes origines. Dans ce lot, une fois la copulation terminée et les mâles retirés, les femelles ont été maintenues dans le tube d'accouplement dans lequel elles ont pu pondre librement jusqu'à leur mort, permettant ainsi d'estimer leur fécondité (nombre d'œufs pondus), leur fertilité (pourcentage d'œufs éclos) et leur longévité adulte.

Nos résultats fournissent une preuve expérimentale de l'influence de la nutrition larvaire sur différents cépages sur les performances reproductives des mâles lors du premier accouplement. Ainsi, la masse des mâles, le volume du spermatophore et le nombre de spermatozoïdes féconds (eupyrènes) sont affectés par le cépage d'origine des mâles. Par exemple, les mâles issus du Grenache sont les plus gros et produisent les plus gros spermatophores. Cet effet du cépage est relativement important puisque les mâles provenant du même cépage (Grenache) mais de différentes origines géographiques (Perpignan, Nîmes et Sènas) ne présentent aucune différence dans leurs performances sexuelles.

La qualité reproductive du mâle (estimée à partir de la taille du spermatophore et du nombre de spermatozoïdes transférés) directement liée à leur nutrition larvaire, a d'importantes répercussions sur le potentiel reproductif des femelles. En effet, les femelles s'accouplant avec les mâles produisant les plus gros spermatophores et transférant le plus de spermatozoïdes féconds (en l'occurrence les mâles provenant du Grenache) ont une fécondité et une fertilité plus importante que celles s'accouplant avec des mâles de faible qualité spermatique (les mâles provenant du Mourvèdre). Cette relation positive entre taille du spermatophore et fécondité n'est cependant pas toujours vérifiée. Les femelles s'accouplant avec les mâles provenant du Carignan qui transfèrent de petits spermatophores ont une fécondité aussi élevée que celle s'accouplant avec les mâles du Grenache qui produisent de gros spermatophores. Ces résultats suggèrent que la taille seule du spermatophore n'est pas un indice fiable reflétant sa qualité chez Eudémis, une absence de relation également démontrée pour d'autres espèces de Lépidoptères (Marshall & McNeil 1989, Bissondath & Wiklund 1996). Il est donc nécessaire de tenir compte de la quantité de nutriments présents dans les spermatophores, comme par exemple les protéines qui sont essentielles à la reproduction des deux sexes (Mevi-Schütz & Erhardt 2003, Wedell et al. 2004). Ces mesures feront l'objet du sous-chapitre suivant (IV.2).

Enfin, cette expérience révèle également que les femelles sont plus motivées à s'accoupler avec les mâles qui leurs apportent le plus de bénéfices directs, leur motivation se traduisant par l'expression d'un plus long et plus intense comportement d'appel envers les mâles avec lesquels elles obtiennent le plus de descendants (les mâles du Grenache ou du Carignan) comparé aux mâles de faible qualité spermatique provenant du Mourvèdre. Ces résultats suggèrent qu'*in natura* les femelles devraient avoir développé une capacité de discrimination des mâles en fonction de leur « qualité » en tant que partenaire sexuel, en se basant sur des critères reflétant leur bonne condition en lien avec leur nutrition larvaire sur différents cépages de vigne. Le sous-chapitre suivant (IV.2) se proposera d'explorer un peu plus finement les relations liant la qualité reproductive des mâles, leur condition corporelle et la quantité de ressources énergétiques qu'ils accumulent pendant leur développement larvaire sur différents cépages de vigne.

MANUSCRIT 2

MALE LARVAL NUTRITION AFFECTS ADULT REPRODUCTIVE SUCCESS IN WILD EUROPEAN GRAPEVINE MOTH (*LOBESIA BOTRANA*)

Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth (*Lobesia botrana*)

Karen Muller · Denis Thiéry · Yannick Moret · Jérôme Moreau

Received: 6 May 2014 / Revised: 12 September 2014 / Accepted: 18 September 2014 / Published online: 2 October 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract In Lepidoptera, males transfer a spermatophore to females containing sperm and accessory gland secretions that are reinvested into female reproduction, providing a fitness gain to females. One of the key factors shaping male spermatophore size is certainly the resources that males have acquired as larvae. In this study, we investigate how male larval food contributes to shaping the spermatophore quantity and quality and how it affects female reproduction in the European grapevine moth (*Lobesia botrana*). Specifically, we examined the effect of male origin (cultivar or geographical site) on their mating success by scoring individual motivation to mate, male spermatophore size and amount of sperm, and finally female fecundity and fertility. A strong effect of larval cultivar was found on spermatophore size and amount of fertilizing sperm produced by males. These male characteristics had important repercussions on female reproductive output. Females mating with males producing the biggest spermatophore and more fertilizing sperm were the most fecund and fertile. Finally, females were able to recognize males of different quality during the precopulatory phase and changed their mating behavior accordingly. The present

results suggest that male nutritional quality could have an important implication for population dynamics.

Keywords Male and female reproductive output · Host plant · *Lobesia botrana* · Larval nutrition · Precopulatory behaviors · Spermatophore

Introduction

In phytophagous insects, the variance in female reproductive output is often attributed in large part to the host plant on which these females have completed their larval development (for a review, see Awmack and Leather 2002). Typically, within one species, females that grow as larvae on “high-quality” plants (i.e., containing high levels of nutriment such as protein, carbohydrates, or lipids) are heavier and have a higher fecundity and longevity than females from “poor-quality” plants (Carrière 1992; Mevi-Schütz and Erhardt 2005; Moreau et al. 2006a). However, their reproductive output does depend on nutrients acquired not only from juvenile feeding but also from nuptial gifts provided by males during mating (Boggs 1990; Vahed 1998) which represent a significant male investment in the female and/or in her offspring (reviewed by Boggs 1995; Gwynne 2008). In Lepidoptera, males classically transfer a spermatophore to the female (Mann 1984) containing sperm and accessory gland secretions that could be reinvested into female reproduction. Indeed, in several butterflies, spermatophore-derived radiolabeled substances (such as amino acids, zinc, phosphorus, and sodium) were recovered into the female somatic tissue and eggs (reviewed by Vahed 1998). Moreover, it has been shown in several species that males transmit chemicals such as pyrrolizidine alkaloids or cyanogenic glycosides to the female with the spermatophore that help protect the female, her eggs, or both against predation (Eisner and Meinwald 1995; González et al. 1999; Cardoso

Communicated by N. Wedell

K. Muller (✉) · Y. Moret · J. Moreau
Equipe Ecologie Evolutive, UMR CNRS 6282 Biogéosciences,
Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France
e-mail: karen.muller@u-bourgogne.fr

D. Thiéry
Institut des Science de la Vigne et du Vin, INRA UMR 1065 Santé et
Agroécologie du Vignoble, Ave E. Bourleaux, 33883 Villenave
d’Ormon Cedex, France

D. Thiéry
Université de Bordeaux, INRA UMR 1065, Save, Bordeaux
Sciences Agro, Ave E. Bourleaux, 33883 Villenave d’Ormon Cedex,
France

and Gilbert 2007). The spermatophore also contains fertile eupyrene sperm and non-fertile apyrene sperm. The eupyrene sperm comprises a nuclear material and serves to fertilize eggs, while the function of anucleate apyrene sperm remains unclear; also hypotheses suggest a role in sperm transport, nutrient donation, or sperm competition (Silberglied et al. 1984). There was no empirical evidence for the first two hypotheses in contrast to the latter which has been supported in *Pieris napi* (Pieridae) (Cook and Wedell 1999).

A recent meta-analysis showed that larger spermatophores enhance female fecundity but not their longevity in different insect orders, the Coleoptera, Lepidoptera, and Orthoptera (South and Lewis 2011). This analysis strongly suggests that spermatophore size is a key determinant of female reproductive output. It has long been recognized that the spermatophore is a costly physiological product (Oberhauser 1988; Cahenzli and Erhardt 2012). Thus, the size of the spermatophore depends on various factors: mating history of males (Bissoondath and Wiklund 1996; Torres-Vila and Jennions 2005), time elapsed since the last copulation (Lamunyon and Eisner 1994), male mass, age at the first mating (Oberhauser 1989; Tigreros 2013), and male larval or adult nutrition (Lederhouse et al. 1990; Delisle and Bouchard 1995). Indeed, nutrients acquired during both larval and adult stages can pass directly into the spermatophore, affecting its mass, size, and content as shown in *Papilio glaucus* (Lepidoptera: Papilionidae) in which a supplementation of adult diet with electrolytes and amino acids enhances male reproductive success (Lederhouse et al. 1990). The effect of adult nutrition on male spermatophores is now well documented (Lewis and Wedell 2007; Cahenzli and Erhardt 2012), but very few studies have examined the effect of larval nutrition on male spermatophore size (see Delisle and Bouchard 1995; Delisle and Hardy 1997 for two exceptions).

In most phytophagous Lepidoptera, males are pure capital breeders, i.e., their reproductive potential is limited by the nutrition ingested during their larval development. Larval nutrition is thus a critical factor explaining male adult reproductive success. For instance, a reduction in larval food quantity results in reduced adult body size with negative effects on male spermatophore size (Carroll 1994; Delisle and Hardy 1997). Moreover, in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae), males suffer resource restrictions as larvae reduce apyrene and eupyrene sperm numbers (Gage and Cook 1994), showing that the number of sperm could also be affected by male nutrition. Surprisingly, very little attention has been paid to the impact of variation in host plant quality on the mating success of males and on the consequences on female reproductive output. A fair hypothesis is that male reproductive performances (spermatophore size and sperm number) depend on the host plant on which they fed on as larvae because different host plants may have very different nutritional values. Assuming

that spermatophore size and sperm number are strongly linked with the reproductive output of females, then fecundity and fertility of females should also vary across host plants on which their male partner grew. In that context, it is important to assess how (i) larval nutrition can affect male reproductive performances (spermatophore size and sperm number) and (ii) how the resulting performances of these males impact female reproductive output (fecundity, fertility, and longevity).

Assuming that males have different reproductive performances related to their larval nutrition on host plants and that female reproduction is modulated by male reproductive efficiency, we predict that mate choice based on phenotypic traits of male quality should have evolved in females. Male quality can be evaluated by female through his courtship display before mating. Hence, better males with bigger spermatophores can be expected to exhibit a stronger courtship display (like activity, latency to the first contact, Phelan and Baker 1990; Whittier et al. 1994) and thus would be accepted sooner by females. A way to measure female choice regarding male origin is to evaluate their mating motivation. In some species of moths and butterflies, females assume a typical calling position during which they emit pheromones. This calling performance could be used to quantify the motivation of females to copulate since the production of sex pheromone is costly (Harari et al. 2011). Therefore, we asked how precopulatory behaviors (reflecting male and female motivation to mate) could be adjusted according to partner quality mediated by host plant.

To summarize, our study aim was to assess in one natural population of moth the influence of larval diet on male reproductive performances and its consequences on female reproductive output. Moreover, male and female precopulatory behaviors were taken into account. The European grapevine moth (*Lobesia botrana*) (Lepidoptera: Tortricidae, Denis and Schiffermüller), a very important pest of grapes worldwide, is an ideal model to test this since this insect is a capital breeder and several studies have shown strong effects on female fitness in both lab strains (Savopoulou-Soultani et al. 1999; Thiéry and Moreau 2005; Moreau et al. 2006b, c) and in wild insects (Moreau et al. 2007). In addition, previous studies have evidenced that a variation in the phenology of one grape variety can affect male spermatophore volume, which may then impact female fecundity (Torres-Vila et al. 1999). However, no study to date has shown a cultivar effect on wild male *L. botrana*, which is the purpose of our study.

Materials and methods

Field sampling

Larvae of *L. botrana* were collected on June 2013 (corresponding to the first larvae generation of the year) in the field.

To test for a cultivar effect within a given population, larvae were sampled from three grape varieties (*Vitis vinifera* cv “Carignan,” “Mourvèdre,” and “Grenache”) in the same vineyard (“Polygone” plot, Perpignan, France) to avoid potential bias due to an environmental variation between vineyards (temperature, light exposure, humidity, parasitism rate). To test for a geographical effect, larvae were sampled from three geographically different vineyards and thus populations growing on the same cultivar. To achieve this, larvae were, in addition, collected on the same cultivar Grenache from Estézargues (at 230 km east from Perpignan, France) and Sénas (at 290 km east from Perpignan and 60 km southeast from Estézargues, France). We sampled larvae of *L. botrana* at the end of their larval cycle (fifth instar) when building a glomerulae made of silk and flower buds (phenology 17–25, Eichhorn and Lorenz 1977). Classically in this pest species, most larvae accomplish their whole development in a single bunch. Larvae completed their life cycle in the laboratory in small polyethylene boxes (60×40 cm, height 21 cm) and fed ad libitum on bunches of the same cultivar sampled in the same place, at 22 ± 1 °C, 60 ± 10 % RH at a natural photoperiod. Larvae were checked daily until pupation, upon which pupae were gently extracted from glomerulae. Pupae were weighed to the nearest 0.01 mg on a Precisa 262 SMA-FR microbalance and placed individually in glass tubes (70×9-mm diameter) stoppered with cotton plugs, and then stored at 22 °C under a natural photoperiod. Pupae were checked every morning, and newly emerged adults sexed. Males were used for the following experiments and were randomly divided into two subsamples. The first subsample was used to measure male reproductive performances and the different adult pre-copulatory behaviors, and the second one was used to evaluate the consequences of male origin (cultivar and site) on the reproductive output of females. To only assess the effect of males on the reproductive performances of both sexes, the wild males were exposed to standardized females (see below) which were considered equivalent and thus randomly assigned to males.

Origin of laboratory female

In order to obtain standardized females, all females used in this study came from an inbred strain of *L. botrana* (INRA Bordeaux). The use of an inbred strain helps to minimize genetic variation between females and allows us to detect the male effect. The stock colony was maintained without diapause on a semi-artificial diet [1000 mL water, 15 g agar, 84.63 g maize flour, 41.25 g wheat germ, 45.48 g yeast, 6.03 g ascorbic acid, 3.35 g Wesson salts, 0.32 mL Scala, 5 mL ethanol (95 %), 2.65 g benzoic acid, 2.76 g Nipagin, as described by Thiéry and Moreau 2005], and maintained at 22 ± 1 °C, 60 ± 10 % relative humidity, and under a 16L:8D photoperiod. Males and females were placed in a large cage,

and bands of waxed paper (15×2 cm) were hung for oviposition support. Once the paper received sufficient number of eggs, it was placed in a plastic box containing the larval semi-artificial diet. Larvae were checked daily until pupation and then were weighed to the nearest 0.01 mg on a Precisa 262 SMA-FR microbalance and placed individually in glass tubes (70×9-mm diameter) stoppered with cotton plugs. Larvae were checked every morning and newly emerged females were used for the experiment.

Precopulatory behaviors and reproductive performances of field collected males from different origins

At dusk, one 2-day-old virgin male from each origin (cultivar or site) was placed into a mating tube (100×15-mm diameter) with one 1–2-day-old virgin standardized female originating from the stock population. Male and female sexual activities were videotaped until mating (SONY HDR CX220E). Mating was considered as successful if the pair formation lasted more than 1 minute, which is the threshold over which genital coupling is completed. The onset time (time elapsed from the session’s start until genital coupling) and the duration (time during which we observed a pair formation) of each mating were noted, and four behaviors that reflect female and male sexual motivations were recorded. We defined a parameter called “female motivation” that reflects the penchant of a female to mate. In this species, when a female is ready to mate (i.e., motivated to mate), she signals her readiness by releasing her sex pheromone. To do this, the female assumes a calling position with wings raised and pheromonal gland exposed. A female not intending to mate does not exhibit this typical calling behavior. So, (i) the onset time of calling (time elapsed from the session’s start until females initiate calling) and (ii) the percentage of calling by females corresponding of the percentage of time in calling position (expressed by the time spent calling divided by the onset time of mating × 100) were noted. To evaluate mating ability and sexual vigor in courtship of males, we recorded (iii) the percentage of male activity (expressed by the time spent in movement by the male divided by the onset time of mating × 100) and (iv) the number of male mating attempts (corresponding to curved their abdomen and touched female abdomen without successful copulation).

Immediately after the end of mating, females were frozen at -25 °C for 10 min and then were dissected on a glass slide. The bursa copulatrix containing the male spermatophore was removed in order to estimate his size. The spermatophore produced by male *L. botrana* is very small (less than 1 mg) and consequently difficult to accurately weigh. Estimating spermatophore size by extrapolating its volume is a classical method used in moths (Royer and McNeil 1993; Foster and Ayers 1996; Milonas et al. 2011) and in previous works on *L. botrana* (Torres-Vila et al. 1999) and we used it. To assess this size, dimensions (length l , width w , and thickness t) were

measured under a stereomicroscope (NIKON SMZ1500) with a magnification of $\times 20$. The volume of the spermatophore was estimated as an ellipsoid balloon as in Torres-Vila et al. (1999) ($V = \pi/6 (l \times w \times t)$) after preliminary measures to check that this process is repeatable ($n=47$; repeatability coefficient=0.863, Lessells and Boag 1987). Then, the sperm-containing ampulla was ruptured in a drop of distilled water, and the sperm mass was gently stirred to ensure dispersion. At this stage, eupyrene sperms were encysted in bundles and each bundle contains 256 eupyrene sperms in Lepidoptera (Virkki 1969; Phillips 1970; Cook and Gage 1995). Intact bundles were counted under a Nikon Eclipse E600 microscope at $\times 40/0.65$ magnification, and the number of bundles was multiplied by 256 to give the total number of eupyrene sperms. The solution was then washed from the slide into a 1.5-mL centrifuge tube and diluted with distilled water. Four 10- μ L subsamples were retrieved from each dilute sperm solution, and apyrene sperms were counted by scanning each dried drop under a Nikon Eclipse E600 microscope at $\times 100$ magnification. The total number of apyrene sperm was estimated by multiplying the average sperm count (per four subsamples, coefficient of variation=14 %) by its dilution factor.

Male origin repercussions on reproductive output of standardized females

One 2-day-old virgin male originating from each cultivar and site was placed into a mating tube (100 $\times$ 15-mm diameter) with one 1–2-day-old virgin standardized female originating from the stock population at dusk. After one successful mating (separation of the pair), males were removed and females were held in the mating tube with water ad libitum. These females were allowed to oviposit freely on the inside surface of the glass tube until their death. Female survival was checked daily, and after the female's death, the eggs were incubated under the same conditions as moth maintenance during 7 days. We recorded (i) achieved fecundity (mean number of eggs laid per female), (ii) female fertility (proportion of hatched eggs), and (iii) longevity.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using R software version 3.0.0 (R Core Team 2013). For each analysis, we report the full model deleting insignificant interactions, following Forstmeier and Schielzeth (2011). To assess the mating success of males (percentage of successful mating) according to their larval origin (cultivar and site), we used Pearson's χ^2 test. The effect of male origin (cultivar and site) on male pupal mass was tested with one-way ANOVA followed by Tukey's test. The effect of male origin (cultivar and site) on precopulatory behaviors of males (percentage of activity) and females (onset time of calling and percentage of calling), on the onset

time of mating and the time spent mating, on the spermatophore volume transferred by males, and on the female fecundity was analyzed with ANCOVAs (respectively, with the pupal mass of males and females as covariates). Because data on sperm and male mating attempts were counted and were over-dispersed, a generalized linear model with a negative binomial distribution (NBGLM) was used to assess the effect of male origin on sperm and mating attempts. A GLM using a quasi-binomial error structure and a logit link function was used to analyze the proportion of hatched eggs by females mated with males from different origins (Warton and Hui 2011). Finally, Cox regression was applied to assess the influence of male origin, female pupal mass, and fecundity on female longevity.

Results

Male pupal mass

Male pupal mass varied significantly according to the origin (cultivar and site) of the field larvae ($F_{4,217}=24.22$, $p<0.0001$). In a given site (Perpignan), males from Mourvèdre were larger than those from Carignan (Table 1). Between different sites, males from Grenache in Estézargues and Sénas were heavier than those from Grenache in Perpignan (Table 1).

Mating success, mating duration, and precopulatory behaviors

The mating success of virgin *L. botrana* males (proportion of pairs for which genital coupling was observed more than 1 minute) did not vary according to their origin ($\chi^2_4=4.90$, $p=0.30$), between 72 and 88 % of males having successfully achieved their mating (Table 1). The onset time of calling was affected neither by male origin (cultivar or site) nor by female or male pupal mass (Table 1 and 2). However, the percentage of calling (expressed by the time spent calling divided by the onset time of mating $\times 100$), which is an indication of female motivation, was affected by the male cultivar (Table 1 and 2). Females in the presence of males from Mourvèdre spent about 20 % of their time in calling position and therefore were less motivated than females with males of other cultivars which spent about 40 % of their time in calling position (Table 1). The percentage of activity by males was not affected by the cultivar on which they fed as larvae but was negatively related to their pupal mass (Table 2). There was no effect of male origin or male pupal mass on the number of attempts a male performed before successfully mating with a female (Table 1 and 2).

The time spent mating varied among larval cultivars and was negatively affected by male pupal mass (Table 2).

Table 1 Mating success and pupal mass of males of *L. botrana* depending on their origin (cultivars and sites) as well as male and female precopulatory behaviors and mating duration for each moth pair.

Cultivar	Mating success ^a (%)	Male pupal mass ^b (mg)	Mating duration		Male behaviors		Female behaviors	
			Onset time of mating ^c (min)	Time spent mating ^c (min)	Percentage of activity ^c (%)	Number of attempts ^d	Onset time of calling ^c (s)	Percentage of calling ^c (%)
Carignan (P)	85.19	5.06±0.11 (a)	11.2±2.0	61.3±3.9 (ab)	51.6±6.1	9.2±1.9	180.1±34.2	40.7±6.0 (a)
Mourvèdre (P)	88.16	5.52±0.06 (b)	9.3±2.3	50.3±1.7 (b)	39.9±4.5	4.7±0.6	158.8±18.9	21.1±3.9 (b)
Grenache (P)	72.41	5.19±0.10 (ab)	14.5±5.0	66.5±4.5 (a)	51.2±6.6	8.4±2.7	212.9±57.5	36.8±8.6 (ab)
Grenache (S)	88.09	6.27±0.06 (c)	12.9±3.6	63.5±4.0 (a)	45.7±5.8	6.1±0.8	167.3±39.6	43.0±4.9 (a)
Grenache (E)	81.58	5.91±0.09 (c)	10.5±2.7	68.5±4.5 (a)	41.8±7.9	6.0±1.1	114.1±41.9	45.1±5.2 (a)

The capital letters in brackets correspond to the different sites: (P) Perpignan, (S) Sènas, and (E): Estézargues. Values in each column with the same lowercase letter are not significantly different ($p>0.05$)

^a Pearson χ^2

^b ANOVA

^c ANCOVA

^d NBGLM

Copulation duration of males from Mourvèdre was shorter than those of males from Grenache (Table 1). However, the onset time of mating was not affected by larval origin or by male or female pupal mass (Table 1 and 2).

Male spermatophore volume and consequences on female fecundity and longevity

The volume of the spermatophore transferred by males during their first mating was correlated with their pupal mass and depended on their larval origin (ANCOVA, larval origin effect: $F_{4,87}=6.85$, $p<0.0001$; male mass effect: $F_{1,87}=13.83$, $p=0.0003$; female mass effect: $F_{1,87}=1.87$, $p=0.17$; Fig. 1a). Males emerged from Mourvèdre and Carignan produced a smaller spermatophore compared to males from Grenache. There was no geographical effect on the volume of the spermatophore transferred by males from the same cultivar on

three different sites (Fig. 1a). The number of eggs laid by females depends on the male with which they mate and is also positively related to female pupal mass (ANCOVA, larval origin effect: $F_{4,99}=5.44$, $p=0.0008$; female mass effect: $F_{1,99}=11.48$, $p=0.001$; Fig. 1b). Females mated with males from Mourvèdre (the smallest spermatophores) laid fewer eggs than females mated with males from Grenache (males with the biggest spermatophores; Fig. 1a, b). Surprisingly, males raised on Carignan produced a small spermatophore which still allows the females to lay as much eggs as the females that received a bigger spermatophore (mated with males from Grenache). Moreover, there was no geographic effect on the fecundity of females mated with males from Grenache originating from the different sites (Fig. 1b). By contrast, female longevity, ranged from 10.1 to 11.1 days, was not affected by the origin of the male with which they mated but was positively related to female pupal mass (Cox

Table 2 Cultivar and male and female pupal mass effects on female behaviors (onset time of calling and percentage of calling), male behaviors (percentage of activity and number of mating attempts), onset time of mating, and mating duration

Source	Mating duration				Male behaviors				Female behaviors			
	Onset time of mating ^a		Time spent mating ^a		Percentage of activity ^a		Number of attempts ^b		Onset time of calling ^a		Percentage of calling ^a	
	Test value	<i>p</i>	Test value	<i>p</i>	Test value	<i>p</i>	Test value	<i>p</i>	Test value	<i>p</i>	Test value	<i>p</i>
Cultivar	$F_{4,77}=0.35$	0.84	$F_{4,77}=5.33$	<i><0.001</i>	$F_{4,66}=0.74$	0.57	LR=7.39	0.12	$F_{4,66}=1.34$	0.27	$F_{4,66}=4.33$	<i>0.01</i>
Male mass	$F_{1,77}=0.51$	0.82	$F_{1,77}=4.69$	0.003	$F_{1,66}=4.55$	<i>0.04</i>	LR=1.34	0.25	$F_{1,66}=2.91$	0.09	$F_{1,66}=0.67$	0.42
Female mass	$F_{1,77}=0.10$	0.76	$F_{1,77}=0.01$	0.90	$F_{1,66}=0.69$	0.41	LR=0.78	0.38	$F_{1,66}=0.72$	0.72	$F_{1,66}=0.61$	0.44

p values <0.05 are shown in italics

^a ANCOVA

^b NBGLM

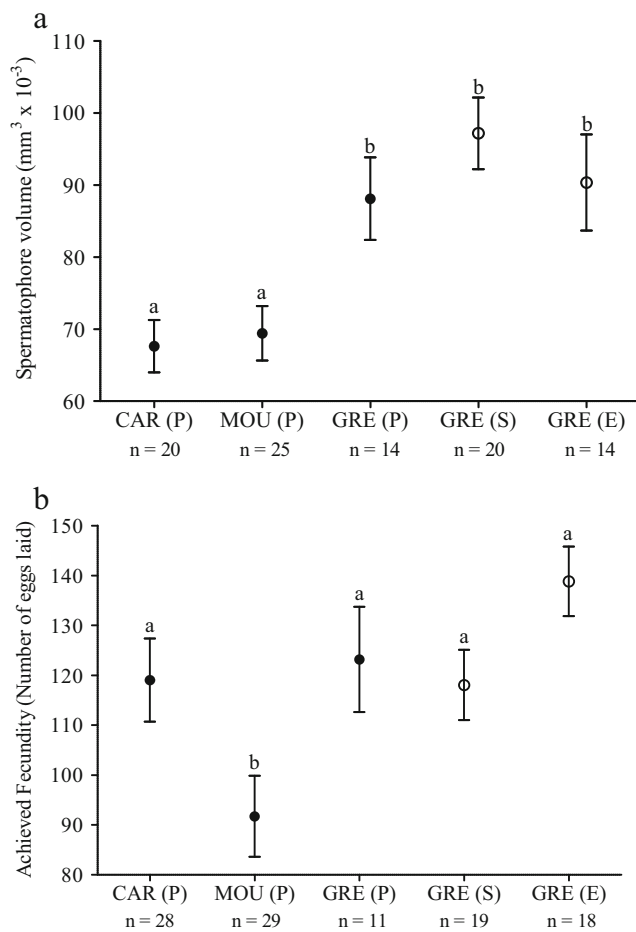


Fig. 1 **a** Spermatophore volume (mean±SEM) of *L. botrana* males fed as larvae on different cultivars and sites and **b** consequences on female achieved fecundity (mean±SEM) mated with males from these different origins: cultivars (black circles) and sites (white circles). The capital letters in brackets correspond to the different sites: (P) Perpignan, (S) S  nas, and (E) Estézargues. Acronyms correspond to the different cultivars: CAR cv “Carignan,” GRE cv “Grenache,” and MOU cv “Mourvèdre.” Numbers at the bottom of each column represent the sample size

regression, $\chi^2_{2,99}=14.12, p=0.015$) and negatively correlated to female fecundity (Cox regression, $\chi^2_{2,99}=11.77, p=0.038$).

Male eupyrene sperm and consequences on female fertility

The number of eupyrene sperm produced by males depended on the cultivar on which they grew up. In Perpignan, males from Mourvèdre produced and transferred less eupyrene sperm than males from Carignan or Grenache (NBGLM, larval origin effect: LR=10.46, $p=0.03$; male mass effect: LR=0.04, $p=0.83$; Fig. 2a). The proportion of eggs hatched depended on the male with which females mated (GLM with quasi-binomial distribution, $p=0.02$). Females mated with males from Mourvèdre, which produced fewer eupyrene sperm, had fewer hatched eggs than females mated with males from other cultivars (Fig. 2a, b).

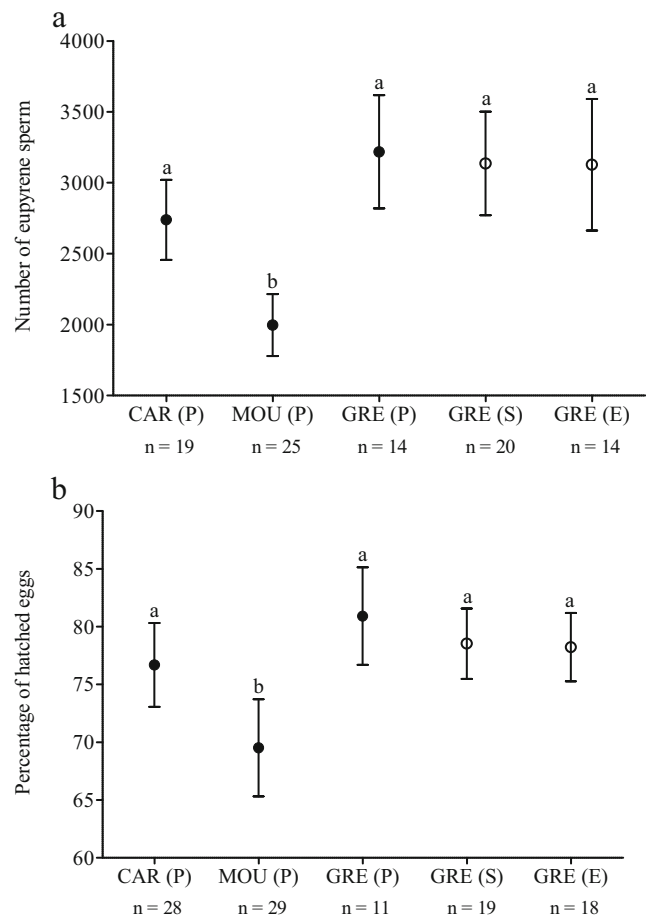


Fig. 2 **a** Eupyrene sperm number (mean±SEM) of *L. botrana* males fed as larvae on different cultivars and sites and **b** consequences on female fertility (percentage of hatched eggs, mean±SEM) mated with males from these different origins: cultivars (black circles) and sites (white circles). The capital letters in brackets correspond to the different sites: (P) Perpignan, (S) S  nas, and (E) Estézargues. Acronyms correspond to the different cultivars: CAR cv “Carignan,” GRE cv “Grenache,” and MOU cv “Mourvèdre.” Numbers at the bottom of each column represent the sample size

However, the number of non-fertilizing apyrene sperm, ranged from 39,183 to 48,259 sperms, was not affected by the origin (cultivar or site) of males and was not related to their pupal mass (NBGLM, respectively, LR=0.91, $p=0.98$; LR 0.27, $p=0.60$).

Finally, the number of eupyrene sperm and apyrene sperm were both positively related to the volume of the spermatophore [Spearman, respectively, $\rho=0.38$, IC95% (0.20; 0.54), $p=0.0002$; $\rho=0.22$, IC95% (0.01; 0.42), $p=0.0427$].

Discussion

Our results provide experimental evidence that larval nutrition on different grape cultivars affects male reproductive

performances in the European grapevine moth. This effect appears to be relatively strong because it was not modified according to the three geographical origins (from Grenache), except for pupal mass. The pupal mass, the volume of the spermatophore, and the number of fertilizing sperm transferred by males were affected by the cultivar on which they grew up. These male performances, related with larval nutrition, had important repercussions on female reproductive output. Indeed, females mated with males producing the biggest spermatophore and more fertilizing sperm (e.g. males from Grenache) had a higher fecundity and fertility than females mated with “low spermatophore quality” males (e.g. males from Mourvèdre). Moreover, the time spent mating and the female motivation for copulating (assessed by the percentage of female calling) also depended on the male’s origin, suggesting that females could modulate their behaviors in response to different male spermatophore qualities.

The mating success of virgin males was relatively high (above 80 % for all cultivars and locations), confirming that almost all *L. botrana* males were sexually mature 2 days after their adult emergence, whatever their origin is. Although most males mated with a female, they did not have similar reproductive performances (spermatophore size and sperm numbers) according to their larval cultivar. This may be partly related to their pupal mass because larger males have more energetic and metabolic reserves than smaller males and can produce bigger spermatophores (Svård and Wiklund 1989; Royer and McNeil 1993; LaMunyon and Eisner 1994). The differences in spermatophore size between males had important repercussions on female fecundity, an effect reported in numerous studies (LaMunyon and Eisner 1994; Wedell and Karlsson 2003; McNamara et al. 2009). In the present experiments, females mated with males from Mourvèdre, which transferred the smallest spermatophore, laid fewer eggs than females mated with males from Carignan or Grenache. This is in agreement with a recent meta-analysis led on 38 Lepidoptera species which demonstrated that the larger the ejaculate is, the more eggs the female lays (South and Lewis 2011). However, males raised from Carignan produced a small spermatophore which still allows the females to lay as much eggs as the females that received a bigger spermatophore. This suggests that the volume of the spermatophore is not the only factor influencing female fecundity. Rather than quantity, the quality of the spermatophore might better explain the variation observed in female fecundity (Marshall and McNeil 1989; Bissoondath and Wiklund 1996). An analysis of male spermatophore for nutrients such as protein content of males raised from different cultivars would be interesting. Finally, female longevity was not directly related to male quality which indicates that spermatophore would not play a significant role in female longevity. This is consistent with the meta-analysis cited above (South and Lewis 2011). However, female longevity was positively correlated with her pupal

mass and negatively with her fecundity, a link that has already been observed in *L. botrana* females (Moreau et al. 2006a). These results are consistent with the well-documented trade-off between fecundity and longevity reported in a several insect species (for a review, see Jervis et al. 2007).

Moreover, the results also showed that larval food influenced the number of eupyrene-fertilizing sperm transferred during mating but not the apyrene sperm. Apyrene and eupyrene sperm numbers were both positively related to the volume of the spermatophore. These two positive correlations are not universal and probably depend on the moth or butterfly species. Our results are in agreement with a study on the armyworm *Pseudaletia separata* (He and Miyata 1997), but no correlation between spermatophore and eupyrene sperm has been found in other works (Cook and Wedell 1996, 1999). The existence of an effect of larval food only on eupyrene sperm number could be explained by the fact that eupyrene sperms are produced during larval stages until male pupation and are not renewed in the adult stage while apyrene sperms are produced just before pupation and continue to be produced during adult life (Friedländer 1997; Friedländer et al. 2005). Globally, our results contrast with studies that have not found any link between larval nutrition and sperm production (Lewis et al. 2011; Velde et al. 2013). These differences in eupyrene sperm numbers related to male origin may have a major impact on female fertility. Indeed, females mated with males which produced a higher number of eupyrene sperm had a higher number of fertilized eggs (i.e., fertility) than females mated with males which had the lowest level of these fertilizing sperm. Additionally, it is possible that all males produce sufficient sperms to fecund all female eggs, but their spermatophore could contain inadequate levels of ions that are known to negatively affect sperm motility (Khan and Musgrave 1969; Leopold 1976).

Here, we clearly showed that males had very different performances according to their larval cultivar. Furthermore, male origin also had repercussions on female precopulatory behaviors. Interestingly, females mated with “low-quality” males (from Mourvèdre) spent less time in calling position before copulation than females mated with “high-quality” males (from Carignan and Grenache). This indicates that females can recognize their mate quality before or during the precopulatory phase. It has been recently demonstrated that the pheromone production is costly for *L. botrana* females (Harari et al. 2011), and females signaling by sex pheromone production bear a cost and thus calling may serve to reflect the female motivation to copulate if these females are able to discriminate among males of different qualities. In this study, male origin did not affect male sexual vigor to mate suggesting that female preferences are not based on male courtship displays but probably depends on the “chemical fingerprint” of males which can differ according to their origin. Furthermore, the copulation duration was shorter for females

mated with low-quality males (from Mourvèdre). Some studies have suggested that copulation duration was under male control (Barbosa 2011) and depended on male's ability to produce a spermatophore (Wedell and Cook 1999). In our study, the time spent mating did not appear to be the result of a small spermatophore production. To better understand why we observed these differences in mating duration, it would be interesting to know when the spermatophore is transferred into the female bursa copulatrix, at the beginning or the end of mating. Given the importance of male quality (spermatophore size and sperm numbers) on female reproductive success (fecundity and fertility), one would expect *L. botrana* females to exhibit some degree of mate choice. Indeed, some phenotypic indicators of male quality such as male pupal mass are known to impact male precopulatory success, larger males being more chosen by females and getting advantages through male-male competition (Hunt et al. 2009). Our study suggests that females might be more or less motivated to mate according to the origin of male and paves the way for a potential degree of female mate choice *in natura*, based on, for instance, the chemical fingerprints of individuals.

In summary, this study demonstrated a strong effect of larval nutrition on male reproductive performances of the European grapevine moth, *L. botrana*. These male performances have important repercussions on motivation to mate and reproductive output of females. Our results suggest that the European grapevine moth would be an excellent experimental system to examine mate choice by both sexes because the variation found in male and female reproductive performances is partly explained by their larval nutrition and may lead to male and female mate choice, mediated by their larval cultivars. We suggest that studies on reproductive output in phytophagous females should not focus solely on female-host plant relationships but also take into account the effect of male reproductive performances on female reproductive output.

Acknowledgments We thank L. Delbac, J. Oustric, D. Richy, and M. Guisset for their valuable experimental assistance. This study was supported by the CNRS and grants from the ANR (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006). We also thank the Conseil Régional of Aquitaine, the Conseil Régional of Bourgogne, and the Chambre d'Agriculture des Bouches-du-Rhône, du Gard et des Pyrénées-Orientales. Second author belongs to the Labex Cote research program.

References

- Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Ann Rev Entomol* 47:817–844
- Barbosa F (2011) Copulation duration in the soldier fly: the roles of cryptic male choice and sperm competition risk. *Behav Ecol* 22: 1332–1336
- Bissoondath CJ, Wiklund C (1996) Effect of male mating history and body size on ejaculate size and quality in two polyandrous butterflies, *Pieris napi* and *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Funct Ecol* 10:457–464
- Boggs CL (1990) A general model of the role of male-donated nutrients in female insects' reproduction. *Am Nat* 136:598–617
- Boggs CL (1995) Male nuptial gifts: phenotypic consequences and evolutionary implications. In: Leather SR, Hardie J (eds) *Insect reproduction*. CRC Press Inc, Florida, pp 215–242
- Cahenzli F, Erhardt A (2012) Nectar sugars enhance fitness in male *Coenonympha pamphilus* butterflies by increasing longevity or realized reproduction. *Oikos* 121:1417–1423
- Cardoso MZ, Gilbert LE (2007) A male gift to its partner? Cyanogenic glycosides in the spermatophore of longwing butterflies (*Heliconius*). *Naturwissenschaften* 94:39–42
- Carrière Y (1992) Host plant exploitation within a population of a generalist herbivore, *Choristoneura rosaceana*. *Entomol Exp Appl* 65:1–10
- Carroll AL (1994) Interactions between body size and mating history influence the reproductive success of males of a tortricid moth, *Zeiraphera canadensis*. *Can J Zool* 72:2124–2132
- Cook PA, Gage MJ (1995) Effects of risks of sperm competition on the numbers of eupyrene and apyrene sperm ejaculated by the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Behav Ecol Sociobiol* 36:261–268
- Cook PA, Wedell N (1996) Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy for maximizing fertilization success? *Proc R Soc Lond* 263:1047–1051
- Cook PA, Wedell N (1999) Non-fertile sperm delay female remating. *Nature* 397:486–486
- Delisle J, Bouchard A (1995) Male larval nutrition in *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae): an important factor in reproductive success. *Oecologia* 104:508–517
- Delisle J, Hardy M (1997) Male larval nutrition influences the reproductive success of both sexes of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Funct Ecol* 11:451–463
- Eichhorn KW, Lorenz DH (1977) Phaenologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachr bl. Dtsch Pflanzenschutz* 29:119–120
- Eisner T, Meinwald J (1995) The chemistry of sexual selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:50–55
- Foster SP, Ayers RH (1996) Multiple mating and its effects in the lightbrown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker). *J Insect Physiol* 42:657–667
- Forstmeier W, Schielzeth H (2011) Cryptic multiple hypotheses testing in linear models: overestimated effect sizes and the winner's curse. *Behav Ecol Sociobiol* 65:47–55
- Friedländer M (1997) Control of the eupyrene–apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. *J Insect Physiol* 43:1085–1092
- Friedländer M, Seth RK, Reynolds SE (2005) Eupyrene and apyrene sperm: dichotomous spermatogenesis in Lepidoptera. *Adv Insect Physiol* 32:206–308
- Gage MJG, Cook PA (1994) Sperm size or numbers? Effects of nutritional stress upon eupyrene and apyrene sperm production strategies in the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Funct Ecol* 8:594–599
- González A, Rossini C, Eisner M, Eisner T (1999) Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5570–5574
- Gwynne DT (2008) Sexual conflict over nuptial gifts in insects. *Ann Rev Entomol* 53:83–101
- Harari AR, Zahavi T, Thiéry D (2011) Fitness cost of pheromone production in signaling female moths. *Evol* 65:1572–1582
- He Y, Miyata T (1997) Variations in sperm number in relation to larval crowding and spermatophore size in the armyworm, *Pseudaletia separata*. *Ecol Entomol* 22:41–46

- Hunt J, Breuker CJ, Sadowski JA, Moore AJ (2009) Male–male competition, female mate choice and their interaction: determining total sexual selection. *J Evol Biol* 22:13–26
- Jervis MA, Boggs CL, Ferns PN (2007) Egg maturation strategy and survival trade-offs in holometabolous insects: a comparative approach. *Biol J Linnean Soc* 90:293–302
- Khan NR, Musgrave AJ (1969) Observations on the functional anatomy of the reproductive organs of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Can J Zool* 47:665–669
- LaMunyon CW, Eisner T (1994) Spermatophore size as determinant of paternity in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7081–7084
- Lederhouse RC, Ayres MP, Scriber JM (1990) Adult nutrition affects male virility in *Papilio glaucus* L. *Funct Ecol* 4:743–751
- Leopold RA (1976) The role of male accessory glands in insect reproduction. *Ann Rev Entomol* 21:199–221
- Lessells CM, Boag PT (1987) Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 104:116–121
- Lewis Z, Wedell N (2007) Effect of adult feeding on male mating behaviour in the butterfly, *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae). *J Insect Behav* 20:201–213
- Lewis Z, Sasaki H, Miyatake T (2011) Sex starved: do resource-limited males ensure fertilization success at the expense of precopulatory mating success? *Anim Behav* 81:579–583
- Mann T (1984) Spermatophores: development, structure, biochemical attributes and role in the transfer of spermatozoa. Springer, Berlin
- Marshall LD, McNeil JN (1989) Spermatophore mass as an estimate of male nutrient investment: a closer look in *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *Funct Ecol* 3:605–612
- McNamara KB, Elgar MA, Jones TM (2009) Large spermatophores reduce female receptivity and increase male paternity success in the almond moth, *Cadra cautella*. *Anim Behav* 77:931–936
- Mevi-Schütz J, Erhardt A (2005) Amino acids in nectar enhance butterfly fecundity: a long-awaited link. *Am Nat* 165:411–419
- Milonas PG, Farrell SL, Andow DA (2011) Experienced males have higher mating success than virgin males despite fitness costs to females. *Behav Ecol Sociobiol* 65:1249–1256
- Moreau J, Benrey B, Thiéry D (2006a) Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Bull Entomol Res* 96:205–212
- Moreau J, Benrey B, Thiéry D (2006b) Assessing larval food quality for phytophagous insects: are facts as simple as it appears? *Funct Ecol* 20:592–600
- Moreau J, Arruego X, Benrey B, Thiéry D (2006c) Differences in nutritional quality of parts of *Vitis vinifera* berries affect fitness of the European grapevine moth. *Entomol Exp Appl* 119:93–99
- Moreau J, Thiéry D, Troussard JP, Benrey B (2007) Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecol Entomol* 32:747–753
- Oberhauser KS (1988) Male monarch butterfly spermatophore mass and mating strategies. *Anim Behav* 36:1384–1388
- Oberhauser KS (1989) Effects of spermatophores on male and female monarch butterfly reproductive success. *Behav Ecol Sociobiol* 25:237–246
- Phelan PL, Baker TC (1990) Comparative study of courtship in twelve phycitine moths (Lepidoptera: Pyralidae). *J Insect Behav* 3:303–326
- Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J Cell Biol* 44:243–277
- R Core Team (2013) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Royer L, McNeil JN (1993) Male investment in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): impact on female longevity and reproductive performance. *Funct Ecol* 7:209–215
- Savopoulou-Soultani M, Nikolaou N, Milonas PG (1999) Influence of maturity stage of the grape berries on the development of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *J Econ Entomol* 92:551–556
- Silberglied RE, Shepherd JG, Dickinson JL (1984) Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *Am Nat* 123:255–265
- South A, Lewis SM (2011) The influence of male ejaculate quantity on female fitness: a meta-analysis. *Biol Rev* 86:299–309
- Svård L, Wiklund C (1989) Mass and production rate of ejaculates in relation to monandry/polyandry in butterflies. *Behav Ecol Sociobiol* 24:395–402
- Thiéry D, Moreau J (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia* 143:548–557
- Tigeros N (2013) Linking nutrition and sexual selection across life stages in a model butterfly system. *Funct Ecol* 27:145–154
- Torres-Vila LM, Jennions MD (2005) Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners? *Behav Ecol Sociobiol* 57:318–326
- Torres-Vila LM, Rodriguez-Molina MC, Roehrich R, Stockel J (1999) Vine phenological stage during larval feeding affects male and female reproductive output of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bull Entomol Res* 89:549–556
- Vahed K (1998) The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. *Biol Rev* 73:43–78
- Velde LV, Schtickzelle N, Van Dyck H (2013) Effect of larval food stress on male adult behaviour, morphology and reproductive investment in the butterfly *Pararge aegeria*. *Evol Ecol* 27:221–234
- Virkki N (1969) Sperm bundles and phylogenesis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 101:13–27
- Warton DI, Hui FK (2011) The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology* 92:3–10
- Wedell N, Cook PA (1999) Strategic sperm allocation in the small white butterfly *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Funct Ecol* 13:85–93
- Wedell N, Karlsson B (2003) Paternal investment directly affects female reproductive effort in an insect. *Proc R Soc Lond* 270:2065–2071
- Whittier TS, Nam FY, Shelly TE, Kaneshiro KY (1994) Male courtship success and female discrimination in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J Insect Behav* 7:159–170

2. EFFET DU CÉPAGE DE VIGNE SUR LES RESSOURCES ÉNERGÉTIQUES DES MÂLES

Lors du sous-chapitre précédent (IV.1), nous avons démontré que le cépage de vigne influençait fortement la qualité des mâles à travers le volume du spermatophore et la quantité de spermatozoïdes qu'ils transféraient lors de l'accouplement. Ces variations dans les performances sexuelles des mâles, ont eu d'importantes conséquences sur le potentiel reproductif des femelles. En effet, les femelles accouplées avec des mâles capables de leur procurer de gros spermatophores riches en spermatozoïdes et provenant de certains cépages (Carignan et Grenache), ont obtenu plus de descendants que celles accouplées avec des mâles de qualité reproductive amoindrie provenant d'autres cépages (Mourvèdre).

L'objectif de ce second sous-chapitre est d'aller un peu plus loin en essayant de corrélérer plus directement la qualité intrinsèque du mâle (à travers les ressources énergétiques dont il dispose à l'émergence) à sa qualité reproductrice (à travers la qualité du spermatophore qu'il transfère lors de l'accouplement). Dans le sous-chapitre IV.1, nous avons également mis en évidence que le volume du spermatophore n'était pas forcément un bon indice reflétant sa qualité puisque certains mâles produisaient de petits spermatophores (*i.e.* les mâles provenant du Carignan) qui permettaient cependant aux femelles d'avoir une fécondité aussi élevée que celle des femelles ayant reçu de plus gros spermatophores de la part de leur partenaire (*i.e.* les mâles du Grenache). Dans cette seconde étude, nous avons donc pris en compte à la fois le volume du spermatophore mais également son contenu en protéines – les protéines étant essentielles à la reproduction des deux sexes chez les insectes (Wheeler 1996, Mevi-Schütz & Erhardt 2003, Cordés et al. 2014) – afin d'avoir une vision plus représentative de la « qualité » du spermatophore.

Ainsi, nous avons examiné l'effet de la nutrition larvaire sur différents cépages de vigne sur la quantité de réserves énergétiques des mâles à l'émergence (concentration en protéines, lipides et glycogène), sur leur condition corporelle (établie à partir d'une régression entre leur masse et la taille de leurs ailes) et sur leurs performances reproductives (volume du spermatophore et quantité de protéines contenue dans cette offrande nuptiale) pouvant en retour, influencer l'aptitude phénotypique des femelles en modulant leur potentiel reproductif (fécondité et fertilité) ainsi que leur longévité.

Des chenilles ont été récoltées sur le terrain à la fin de leur développement larvaire sur les mêmes cépages de vigne que ceux étudiés dans le chapitre IV.2 (Carignan, Grenache et Mourvèdre) et sur un quatrième cépage (Syrah) au sein du même vignoble à Perpignan.

Différentes mesures morphologiques (taille du corps, taille des ailes, masse des adultes) et énergétiques (concentration en protéines, lipides et glycogène du corps) ont été réalisées sur des mâles nouvellement émergés (voir **MATERIEL & METHODES, PARTIE 2.4**). En parallèle, les performances reproductives ont été mesurées sur d'autres mâles accouplés avec des femelles provenant de la même souche de laboratoire que celle utilisée dans le sous-chapitre IV.1. À l'issue des accouplements avec les mâles provenant des différents cépages, un premier lot de femelles a été disséqué et nous avons quantifié le volume ainsi que le contenu en protéines du spermatophore. Les femelles du second lot ont été maintenues dans leur tube d'accouplement dans lequel elles ont pu pondre leur œufs librement jusqu'à leur mort, nous permettant d'estimer leur fécondité, leur fertilité et leur longévité.

Nos résultats démontrent que le cépage de vigne sur lequel se développent les mâles influence fortement la quantité de réserves énergétiques dont ils disposent à l'émergence (notamment la concentration en protéines et en glycogène de leur corps), ce qui affecte en retour leur condition corporelle et leurs performances reproductives (à travers le volume et le contenu en protéines du premier spermatophore transféré lors de l'accouplement). Ainsi, les mâles disposant de peu de réserves énergétiques provenant d'une plante de faible qualité nutritive font face à des compromis et doivent ajuster la quantité de ressources à allouer à leurs différentes fonctions, en investissant soit dans leur condition corporelle (mâles provenant de la Syrah) soit dans leur reproduction (mâles provenant du Carignan). Cette étude supporte donc l'idée que les organismes sont capables de limiter les effets des contraintes nutritives en ajustant leurs ressources à différents traits liés à leur aptitude phénotypique (Boggs & Freeman 2005). Ces compromis semblent directement dépendre du cépage sur lequel les mâles se sont nourris et probablement des différents nutriments qu'ils ont pu acquérir pendant leur développement larvaire sur ces différents cépages.

Notre étude révèle également que les femelles accouplées avec les mâles transférant le plus de protéines dans leur spermatophore sont celles qui ont la meilleure fécondité (*i.e.* les femelles accouplées avec les mâles du Carignan). Ces résultats confirment que, plus que la taille, c'est bien le contenu du spermatophore qui joue un rôle primordial dans le potentiel reproductif des femelles chez cette espèce. Les études cherchant à identifier l'impact de la « qualité » des mâles sur le potentiel reproductif des femelles chez les espèces offrant des cadeaux nuptiaux endogènes devraient donc systématiquement tenir compte de plusieurs facteurs reflétant la qualité de ces offrandes nutritives, à savoir leur taille, leur contenu en nutriments ainsi que la quantité de spermatozoïdes qu'elles renferment.

MANUSCRIT 3

LINKING MALE ENERGY RESERVES AND
REPRODUCTIVE OUTPUT IN A POLYPHAGOUS MOTH

LINKING MALE ENERGY RESERVES AND REPRODUCTIVE OUTPUT IN A POLYPHAGOUS MOTH

Karen MULLER^a, Maria TEIXEIRA-BRANDAO^a, Denis THIERY^{b, c} and Jérôme MOREAU^a

^a Université Bourgogne Franche-Comté, Équipe Écologie Évolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France.

^b INRA UMR 1065 Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France.

^c Université de bordeaux, INRA UMR 1065, Save, Bordeaux Sciences Agro, Villenave d'Ornon Cedex

ABSTRACT

Sexual selection theory predicts that females are selective and choose the highest quality males, with the expectation that the selected male traits reflect their health, ability to offer large nuptial gifts, and/or their genetic quality. One good indicator of the quality of a male as a mate is its nutritional condition, which enables it to find partners and to provide females with sufficient sperm for egg fertilization. In holometabolous insects, the main factor that influences adult male nutritional condition is nutrition during the larval stage. Lepidopteran phytophagous insects are an ideal model to evaluate how larval nutrition affects adult reproductive strategies, because larval host plant quality is considered a key determinant of the adult phenotype and the performance of both males and females. We studied a capital breeder moth species, the European grapevine moth (*Lobesia botrana*), to investigate the effect of host plant nutrition on male energy reserves, body condition and reproductive traits that could influence female reproductive output and mate choice. We found that the host cultivar for the larvae strongly influenced the energy reserves of male adult moths, affecting their body condition and ultimately their reproductive potential through the size and content of spermatophores they transfer to females at mating. Moreover, males having different levels of energy reserves may alter the allocation of energy between body condition and spermatophore size and composition, supporting the idea that organisms can buffer the effect of nutritional constraints by changing allocation to different fitness-related traits. Females receiving protein-rich spermatophores at mating had an overall greater reproductive output than females mated with poor quality males producing less nutritionally rich spermatophores. The results have important implications for understanding of the population dynamics of this moth species and elucidating the ecological factors that affect male reproductive quality will contribute to understanding of the basis for female choice, and sexual selection in general.

KEY WORDS: body condition, energy reserves, insect-plant interactions, *Lobesia botrana*, reproductive success, spermatophore.

INTRODUCTION

Female mate preference, whereby a female selects a reproductive partner based on perceived benefits, is a key process within the realm of sexual selection (Andersson 1994). Females may choose mates based on direct material benefits, such as nuptial gifts or parental care from the male (Vahed 1998), or on secondary sexual characteristics that are indicative of indirect benefits including good genes or superior health (Andersson 1994; Kokko et al. 2003). Females boost their fitness by being selective and choosing the highest quality males, with the expectation that the selected male traits reflect their health, ability to offer large nuptial gifts, and/or their genetic quality. One good indicator of the overall quality of males as mates is their nutritional condition, which enables them to find partners and to provide females with sufficient ejaculate to fertilize their eggs (Blanco et al. 2009; Perry & Rowe 2010). As reproduction can have energetic and physiological costs, individuals in good condition are assumed to invest substantial resources in reproduction, while those in poor condition are unable to do this (van Noordwijk & de Jong 1986; Iwasa & Pomiankowski 1994; Katsuki et al. 2012). Indeed, males having poor nutritional status usually have lower mating success (Lewis et al. 2011), produce smaller ejaculate volumes (Ferkau & Fischer 2006; Blanco et al. 2009), transfer less sperm (Simmons 2011; Perry et al. 2013), and provide females with less ejaculate-derived nuptial gifts (Jia et al. 2000; Tigreros 2013). Thus, elucidating the ecological factors that affect male reproductive quality will contribute to understanding of the basis for female choice, and sexual selection in general.

The activities associated with reproduction are amongst the most energetically demanding that an individual will face during its lifetime (Elkin & Reid 2005; Harshman & Zera 2007). In most insect species, reproduction is a nutrient-limited process for both males and females, and is largely related to their energy reserves (Boggs 1997). For females, egg production is costly because successful development of offspring depends primarily on the quantity of lipids and proteins they invest in the eggs (Fischer & Fiedler 2001; Mevi-Schütz & Erhardt 2003). For males, ejaculate production represents a significant energetic cost, especially in species giving nuptial gifts (Oberhauser 1989; Wedell & Cook 1999; Scharf et al. 2013). Thus, numerous empirical studies have shown condition-dependent expression of female reproduction-related traits (Fisher & Fiedler 2001; Awmack & Leather 2002; Roff 2002), and also male sexual traits (Hunt et al. 2004; Bonduriansky 2007; McGuigan 2009).

In holometabolous insects having complex life cycles, including Lepidoptera, the conditions for larval development can greatly affect adult morphology and reproductive traits (Boggs &

Freeman 2005; Tigreros 2013). Organisms are confronted with various forms of nutritional challenge throughout the larval stages, which often result in delayed growth, smaller body size and wing loading at maturity, and ultimately reduced fitness in terms of survival and fecundity (Telang & Wells 2004; Andersen et al. 2010). Adults emerge from the pupal stage having residual energy stores that they accumulated during successive larval stages, and these stores contribute to somatic maintenance and the reproductive success of the adult stage (Oberhauser 1997). Thus, nutritionally stressful conditions occurring early in life are of major importance because of their immediate impact on juvenile growth, and also because they have considerable implications for the lifetime fitness of individuals, including the ability to attract and locate mates (Metcalf & Monaghan 2001; Barrett et al. 2009). The effect of low energy reserves on reproduction will depend on the energy sources an animal uses to provision offspring (Boggs 1997). Reductions in energy reserves are particularly important for capital breeders, which do not replenish their nutritional resources as adults (Jönsson 1997). Thus, capital breeder species probably have to make trade-offs in the allocation of their energy reserves between reproduction and other functions including flight (which is used for dispersal and mate location, and greatly depends on male wing loading) and survival (Berwaerts et al. 2002; Boggs & Freeman 2005; Van Velde et al. 2012).

Lepidopteran phytophagous insects are ideal models to evaluate how larval nutrition affects adult resource allocation strategies because larval host plant quality is considered to be a key determinant of the adult phenotype, and the performance of both males and females (Awmack & Leather 2002; Bede et al. 2007). The effect of host plant quality on holometabolous female fitness has been extensively studied, with females shown to use larval residual energy derived from the host plant for egg development (Oberhauser 1997; and Awmack & Leather 2002 for a review). Furthermore, host plant quality can also affect male reproductive success in lepidopteran species through its effect on the size and nutrient content of the spermatophore males transfer to females at mating (Delisle & Bouchard 1995; Muller et al. 2015). Male larvae feeding on host plants of varying nutritive quality will store different levels of energy reserves available to be reallocated into adult tissues during metamorphosis, and this will consequently affect their future reproductive performance. However, no study has been conducted to investigate in parallel the role of host plant-mediated larval nutrition on male energy reserves, morphological characteristics (body mass, wing size, body condition) and reproductive potential (size and content of spermatophore, reproductive capacity and consequences for female fitness). In this study we adopted an overall approach to quantify in a capital breeder moth species the effect of host plant nutrition on male energy reserves, and on various adult

morphological and reproductive traits that could influence female reproductive output and mate choice.

Larvae of wild populations of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*), which is a very important pest of grapes worldwide, have been used for testing how different host plant varieties affect larval nutrition, adult energy reserves and reproductive success. Several traits related to male fitness in *L. botrana* have been studied and linked to the differing nutritive value of the host plant cultivars used by larvae (Moreau et al. 2007; Muller et al. 2015). We quantified three key energetic and nutritional resources (protein, glycogen and lipid content) of newly emerged *L. botrana* male moths raised on four different grape cultivars. We measured various morphological traits of these males, including body length, forewing area and adult mass to determine if one or more of these parameters reflect male energy reserves, and could serve as a measure of male quality as a mate for females. We had previously demonstrated that male larval nutrition affects spermatophore size and the amount of fertilizing sperm, and that these male traits have important repercussions for female fecundity (Muller et al. 2015). The results of this previous study suggested that the volume of the spermatophore was not the only factor influencing female fecundity, and that the quality of the spermatophore, such as its protein content, might better explain the variation observed in female fecundity. Thus, in this study we also investigated the size and protein content of the first spermatophore transferred by males during copulation, and the consequences of this in terms of fecundity, fertility and longevity in females.

MATERIALS AND METHODS

Insect model and field sampling

L. botrana is one of the major pests of grapes (*Vitis vinifera*). It is widely distributed, occurring in almost all European vineyards, and produces 3–4 larval generations each year. This pest is expanding geographically, with vineyards in the USA and the Chile having been recently colonized (Gilligan et al. 2011). The larvae are polyphagous and can develop on almost any grape cultivar, but important differences in male and female reproductive output occur as a result of the plant quality (Torres villa et al. 1999; Thiéry and Moreau 2005). To test for a cultivar effect within a given population, larvae of *L. botrana* were collected in June 2014 (corresponding to the first larval generation in that year) from four grape varieties ('Carignan', 'Mourvèdre', 'Grenache' and 'Syrah') from the same vineyard (N 42°44'7.063", E 2°52'56.441"; Perpignan, France); this avoided potential biases resulting from environmental

variation among vineyards (e.g. temperature, light exposure, humidity, parasitism rate). We sampled larvae of *L. botrana* at the end of the larval cycle (fifth instar) when building a glomerulae made of silk and flower buds (phenology 17–25; Eichhorn and Lorenz 1977). Characteristically in this pest species, most larvae complete their development in a single grape bunch, and each glomerulae contains only one larva (Torres-Vila 1997). To obtain newly emerged adults, larvae within their bunches of origin were brought to the laboratory, and the life cycle was completed in large polyethylene boxes (60 × 40 cm, height 21 cm) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ RH and the ambient photoperiod. The larvae were checked daily until pupation, at which time the pupae were gently extracted from the glomerulae. The pupae were weighed to the nearest 0.01 mg using a Precisa 262 SMA-FR microbalance, then placed individually in glass tubes (70 × 9 mm diameter) stoppered with cotton plugs, and stored at 22°C under the ambient photoperiod. The pupae were checked each morning, and the newly emerged adults were sexed. Adults were used for the experiments, and were randomly separated into three subsamples for measurement of (i) morphological traits and energy reserve, (ii) male reproductive performances and, (iii) consequence for female reproductive output, because it was impossible to measure these parameters using the same individuals. To eliminate possible effects of moth phenology, each day we assigned newly emerged individuals to the three subsamples. The first subsample was used to measure morphological traits and the energy reserves of male adults derived from the different cultivars, the second subsample was used to evaluate the size and protein content of spermatophores transferred by males to females during their first mating, and the third subsample was used to evaluate the consequence of the male's host cultivar on the reproductive output of females.

Morphological traits of males

Following the emergence of moths from the first subsample, the males were immediately frozen at -28°C , and various morphological characters were immediately quantified. The morphological features included the body length and the length and surface area of the left forewing, which were measured using a stereomicroscope (Nikon SMZ1500) at a magnification of 10×. Two replicate measurements for each character were made to ensure that this process was repeatable (range of repeatability coefficients for the various characteristics: 0.987–0.998; Lessells & Boag 1987). Each moth was also weighed to the nearest 0.1 mg using a Precisa 262 SMA-FR microbalance. Immediately following measurement the males were stored at -80°C until analyzed for energy reserves. Morphological measures and

biochemical analyses were carried out using 85 newly emerged males from the four cultivars: Carignan, n = 29; Grenache, n = 15; Mourvèdre, n = 25; and Syrah, n = 16.

Analysis of energy reserves

Sample preparation

The measurements of energy reserves (proteins, lipids and glycogen; described below) were determined using entire male moths of *L. botrana*, following a modification of the method of Foray et al. (2012). Individual moths were ground in 180 μ L lysis buffer (100 mM KH_2PO_4 , 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA; pH 7.4) using 3 mm chrome steel beads for 30 s at 25 Hz in a Retsch MM 400 mixer mill (Retsch, Haan, Germany). Each moth homogenate was centrifuged at 1200 rpm for 5 min, then used to assess the protein content using the Bradford assay. Following the protein assay (see below), 20 μ L of 20% sodium sulfate (Na_2SO_4) solution and 1500 μ L of 1:2 chloroform:methanol solution was added to the remaining moth homogenate, which was stored at room temperature for 24 h, then centrifuged at 6000 rpm for 6 min. The supernatant was divided in two equal parts, one of which was used for lipid analysis and the other for glycogen analysis.

Protein analysis

A sample of each moth homogenate (2.5 μ L) was diluted with 2.5 μ L of lysis buffer, transferred to a 96-well microtiter-plate with 225 μ L of Bradford micro-assay reagent (B6916; Sigma, France), and incubated at room temperature for 15 min, according to the manufacturer's instructions. The protein content in each sample was determined from a calibration curve constructed using 125, 250, 500, 1000 and 2000 μ g of bovine gamma globulin (IgG) dissolved in the same buffer used in the standard (regression coefficient $R^2 = 0.998$). The standard curves were systematically duplicated in each microtiter plate, and measured simultaneously with measurement of the insect samples. Prior to reading the plates were gently shaken for 5 s in the microplate reader to disrupt protein-dye aggregates. The protein concentration was determined spectrophotometrically at 750 nm using a tunable microplate reader (VersamaxTM, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) and SoftMax Pro v5.2 software. The Bradford assay was chosen because it is known to provide reliable results (Foray et al. 2012).

Lipid analysis

Lipid analysis was undertaken using the vanillin assay procedure (Van Handel 1985a). For each centrifuged moth homogenate (see above) the supernatant for lipid analysis was transferred to a clean 16 $\times$ 100 mm culture tube. The tube was placed in a dry heating bath at 95°C inside a fume cupboard to evaporate any remaining solvent from the supernatant.

Concentrated (95%) sulfuric acid (200 μ L) was added to the supernatant and the solution was incubated for 10 min at 90°C. After cooling, 4.5 mL of a vanillin/phosphoric acid solution was added and the tube was vortexed then left for 5 min to enable the color to develop. A sample of the reaction mixture (100 μ L) was pipetted into a well of a 96 well microtiter plate, and the optical density was read directly at 525 nm using a tunable microplate reader (Versamax™; Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) and SoftMax Pro v5.2 software. The lipid content in each sample was determined from a calibration curve constructed using 8, 16.5, 32, 63, 125, 250 and 500 μ g of commercial vegetable oil (regression coefficient $R^2 = 0.995$). The standard curve was systematically duplicated in each microtiter plate and measured simultaneously with the insect samples.

Glycogen analysis

Glycogen analysis was undertaken using the anthrone procedure described by Van Handel (1985b). The supernatant from each centrifuged moth homogenate (see above) for glycogen analysis was decanted into a 16 $\times$ 100 mm culture tube for glucose analysis (not reported here). The remaining *L. botrana* tissue and glycogen (adsorbed onto the precipitated sodium sulfate) in the tube was washed into a clean 16 $\times$ 100 mm culture tube using 1 mL of anthrone reagent. A further 3.5 mL of anthrone reagent was then added to the tube, which was placed into a dry heating bath at 95°C for 17 min, after which the tube was removed from the heating bath, vortexed for 20 s and left to cool. A 100 μ L subsample of the solution in the tube was pipetted into a well of a 96 well microtiter plate. The optical density of the solution in the well was read at 625 nm, as described above. The glycogen content of the sample was determined from a calibration curve, constructed using 25, 50, 100, 150, 200 and 400 μ g of glucose (regression coefficient $R^2 = 0.993$).

Spermatophore quantity and quality

The second subsample of males was used to evaluate their reproductive success, based on the size and protein content of the first spermatophore transferred to females. At dusk a 2-day-old virgin male from each cultivar was placed into a mating tube (100 $\times$ 15 mm diameter) with one 1- or 2-day-old virgin standardized female originating from an inbred strain of *L. botrana* (INRA, Bordeaux), and the pair were observed for 4 h until the occurrence of mating. This procedure was based on previous studies of the same species (Moreau et al. 2006; Muller et al. 2015). Immediately following mating the females were removed and placed at -25°C for 10 min, then dissected on a glass slide. The bursa copulatrix containing the male spermatophore

was removed and the spermatophore size was estimated. The spermatophore produced by male *L. botrana* is very small (less than 1 mg), and consequently difficult to weigh accurately. Therefore, the spermatophore size was estimated by extrapolating its volume; this is a standard method used in studies of moths including those involving *L. botrana* (Torres-Vila et al. 1999; Milonas et al. 2011; Muller et al. 2015). To calculate the spermatophore size, its dimensions (length: l ; width: w ; thickness: t) were measured using a stereomicroscope (NIKON SMZ1500) at a magnification of 20 $\times$. The volume of the spermatophore was estimated as an ellipsoid balloon using the equation reported by Torres Vila et al. 1999 ($V = \pi/6 (l \times w \times t)$). Immediately following this measurement procedure the spermatophore was transferred to a microtube and stored at -80°C for subsequent protein analysis. This involved homogenizing the spermatophore in 100 μL lysis buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 0.15% w:v polyvinyl pyrrolidone, 153 μM MgSO_4 and 0.2% w:v Triton X-100) using 3 mm chrome steel beads for 5 min sec in a Retsch MM 400 mixer mill (Retsch; Haan, Germany). The homogenate was centrifuged at 14,000 rpm for 3 min at 4°C , and the supernatant was used to assess the protein content using the Bradford assay described above. The protein content in each sample was determined from a calibration curve constructed using 62.5, 125, 250, 500, 1000 and 2000 μg samples of bovine gamma globulin (IgG) dissolved in the same buffer as the standard ($R^2 = 0.998$). The protein concentration was determined from two replicates from each sample, and based on the average value the total amount of protein (ng) in the ejaculate was estimated. In total, 98 males that successfully mated in less than 4 h were analyzed in this experiment (Carignan: $n = 34$; Grenache; $n = 12$; Mourvèdre: $n = 22$; Syrah: $n = 20$).

Consequences for female reproductive output

The third subsample of males was used to evaluate male host plant cultivar on female reproductive output. Following a single successful mating between a 2-day-old virgin male from each cultivar and a 1- or 2-day-old standardized virgin female (following the same mating procedure described above), the males were removed and the females were held in the mating tube with water provided *ad libitum*. The females oviposited freely on the inside surface of the glass tube. Female survival was checked daily until death, following which the eggs were incubated for 1 week under the same conditions as for moth maintenance. The following parameters were recorded: (i) female fecundity (number of eggs laid per female); (ii) fertility (proportion of hatched eggs); and (iii) longevity. A total of 66 females that successfully mated were used in this experiment (Carignan: $n = 24$; Grenache: $n = 9$; Mourvèdre: $n = 25$; Syrah $n = 8$).

Statistical analysis

All statistical tests were performed using R software version 3.2.0 (R Core Team 2015). For each analysis we report the full model with insignificant interactions deleted (Forstmeier & Schielzeth 2011). Principal component analysis was used to summarize the information for the three energy reserve parameters (protein, lipid and glycogen content) into one orthogonal principal component (the summary energetic value), which describes the energy reserves in adult males following emergence. To estimate the body condition for each moth, the residuals were extracted from a regression of the adult mass as a function of the log-transformed ($F_{1,83} = 13.17$, $p = 0.0005$, $R^2 = 0.14$) left forewing surface area; this approach has been used before to estimate energy reserves of butterflies following emergence (Oberhauser 1997; Davis 2014). Negative values indicated poor body condition of males, and positive values indicated good body condition. To determine how the host cultivar for the male larvae affected adult energy reserves, a linear model was developed using the summary energetic value as the response, and body condition as a covariable. Because energy reserves and reproductive performance were measured on different males, the design used did not enable these two measurements to be directly linked. The effect of male larval host cultivar on spermatophore size and female fecundity was analyzed using ANCOVAs, with male and female pupal mass as covariates. A generalized linear model having a quasi-binomial error structure was used to analyze the proportion of hatched eggs produced by females mated with males from larvae reared on the various cultivars, and a Cox regression was applied to assess the influence of male larval host cultivar and female pupal mass on the latency of first oviposition and the longevity of females.

RESULTS*Adult morphological traits, body condition and energy reserves*

The adult male body mass depended on the male larval host cultivar. Males from larvae on Carignan were lighter than males from larvae reared on the other three cultivars (Table 1; $F_{3,81} = 8.74$, $p < 0.0001$). However, the male body length was not affected by the male mass or larval cultivar (Table 1; mass effect: $F_{1,81} = 0.15$, $p = 0.697$; cultivar effect: $F_{3,81} = 1.11$, $p = 0.351$). The male forewing area covaried positively with the adult body mass, and depended on the larval cultivar (Table 1; mass effect: $F_{1,81} = 9.45$, $p = 0.003$; cultivar effect: $F_{3,81} = 2.98$, $p = 0.036$), with males from larvae on Mourvedre having smaller wings than males from larvae on Syrah.

Table 1. Mean [IC95] values for the adult morphological parameters (body mass and length; surface area of the left forewing; log of the forewing surface area; body condition corresponding to the residual of the relationship between the log of the adult mass at emergence: negative values indicate poor body condition and positive values indicate good body condition) and energy reserves (lipid, protein and glycogen content) for *L. botrana* males derived from larvae reared on four different grape cultivars. Values having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Cultivar	Male adult morphological characters (mean [IC 95%])				Male adult energy reserves (mean [IC 95%])		
	Body mass (mg)	Body length (mm)	Forewing surface area (mm ²)	Body condition	Lipid content (µg/mg)	Protein content (µg/mg)	Glycogen content (µg/mg)
Carignan (29)	2.6 ^a [2.4 ; 2.8]	4.60 ^a [4.49 ; 4.71]	7.73 ^{ab} [7.55 ; 7.92]	-0.10 ^a [-0.16 ; -0.04]	53.2 ^a [50.0 ; 56.3]	126.1 ^a [120.1 ; 132.3]	4.9 ^a [3.5 ; 6.4]
Grenache (15)	3.0 ^b [2.8 ; 3.2]	4.54 ^a [4.37 ; 4.71]	8.04 ^{ab} [7.76 ; 8.32]	0.03 ^b [-0.03 ; 0.08]	56.3 ^a [51.3 ; 61.5]	116.4 ^{ab} [108.4 ; 124.1]	1.9 ^b [0.8 ; 3.3]
Mourvedre (25)	3.0 ^b [2.8 ; 3.1]	4.41 ^a [4.25 ; 4.56]	7.67 ^a [7.38 ; 7.95]	0.06 ^b [0.02 ; 0.10]	58.4 ^a [53.1; 54.0]	127.0 ^a [119.5 ; 135.2]	4.3 ^a [2.8 ; 5.7]
Syrah (16)	3.2 ^b [6.0 ; 3.4]	4.53 ^a [4.38 ; 4.68]	8.30 ^b [8.05 ; 8.58]	0.06 ^b [-0.01 ; 0.12]	51.0 ^a [44.7 ; 57.2]	107.0 ^b [97.4 ; 115.2]	1.6 ^b [0.9 ; 2.6]

The male body condition (corresponding to the residual of the relationship between the log of the adult mass at emergence and the log of left forewing surface area) was affected by the larval cultivar (Table 1; $F_{3,81} = 7.89$, $p = 0.0001$). Males from larvae on Carignan had a poorer body condition than males from larvae on the other cultivars. The male body condition was positively correlated with lipid reserves ($F_{1,83} = 10.71$, $p = 0.002$) but was not correlated with either the protein ($F_{1,83} = 1.19$, $p = 0.279$) or the glycogen ($F_{1,83} = 0.01$, $p = 0.934$) concentrations. Male protein and glycogen concentrations were influenced by the male larval cultivar (respectively, ANCOVA correcting for male body condition: $F_{3,81} = 4.66$, $p = 0.005$, Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 84$, $p = 0.479$). Males from larvae on Syrah had lower protein and glycogen body concentrations than males from larvae on Carignan or Mourvedre, and males from larvae on Grenache had lower glycogen concentrations than males from larvae on Carignan and Mourvedre. However, lipid concentration was not affected by the male larval cultivar (ANCOVA; cultivar effect: $F_{3,81} = 2.02$, $p = 0.118$; body condition effect: $F_{1,81} = 11.55$, $p = 0.001$).

PC1 explained 48.19% of the variation in energy reserves, with positive coefficients for the protein, lipid and glycogen contents (Table 2). A score for individual moths along PC1 was thus used as an index of energy reserves: individuals having high PC1 values had high concentrations of protein, lipid and glycogen. The synthetic value for the male energy reserves (PC1) differed significantly depending on the male larval cultivar, and covaried positively with body condition (Fig. 1; cultivar effect: $F_{3,81} = 25.62$, $p = 0.0002$; body condition effect: $F_{1,81} = 4.36$, $p = 0.04$). Taking into account their body condition, males from larvae on Syrah had fewer lipid, glycogen and protein reserves than males from larvae on the Mourvedre and Carignan cultivars.

Table 2. Principal component analysis of energy reserves (protein, lipid and glycogen content) for *L. botrana* males derived from larvae reared on four different grape cultivars (Carignan, Grenache, Mourvedre and Syrah). Component loadings describe the relationships between the first principal components (PC1) and the variables from which they were derived. The three energy reserve components were positively correlated with PC1 ($p < 0.0001$).

Parameter	PC1
Eigenvalue	1.45
Explained variance (%)	48.19
Component loading	
Protein concentration	0.76
Lipid concentration	0.74
Glycogen concentration	0.58

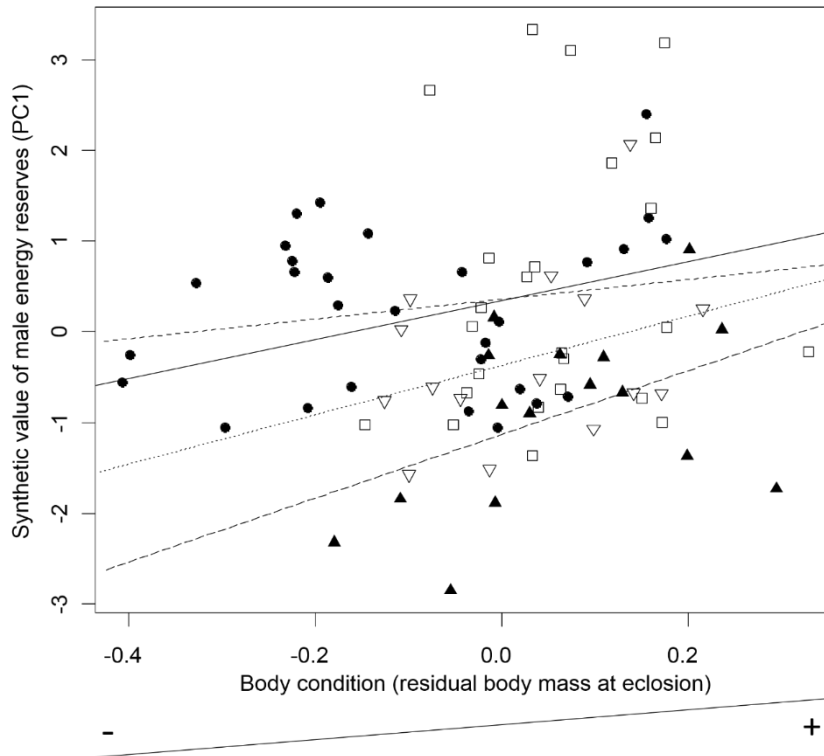


Figure 1. Relationships among PC1 scores, summarizing adult energy reserves and body condition (corresponding to the residual of the relationship between the log of the adult mass at emergence and the log of the forewing surface area) of male adult moths derived from larvae reared on four different grape cultivars (black circles and full line: Carignan; downward triangles and short dashed line: Grenache; squares and dotted line: Syrah; black upward triangle and large dashed line: Mourvedre).

Spermatophore quantity and quality

The cultivar used for larval growth influenced the male reproductive performance by affecting the volume of the spermatophore transferred to females during the first mating event, with heavier males transferring larger spermatophores (Fig. 2a; cultivar effect: $F_{3,93} = 6.10$, $p = 0.0007$; pupal mass effect: $F_{1,93} = 16.41$, $p = 0.0001$). Males from larvae on Mourvedre produced significantly heavier spermatophores than males from larvae on Carignan or Syrah (Fig. 2a). The protein concentration in the spermatophore was affected by the larval cultivar, suggesting that, independently of its volume, spermatophores produced by males from larvae on Carignan had higher protein concentrations than spermatophores produced by males from larvae on Syrah (Fig. 2b; cultivar effect: $F_{3,94} = F = 2.92$, $p = 0.038$). Based on the total quantity of protein transferred per spermatophore (spermatophore volume $\times$ protein concentration), females mated to males from larvae on Carignan received more protein during the first mating than females mated with males from larvae on Syrah (Fig. 2c; cultivar effect: $F_{3,93} = 3.08$, $p = 0.031$; mass effect: $F_{1,93} = 0.78$, $p = 0.380$).

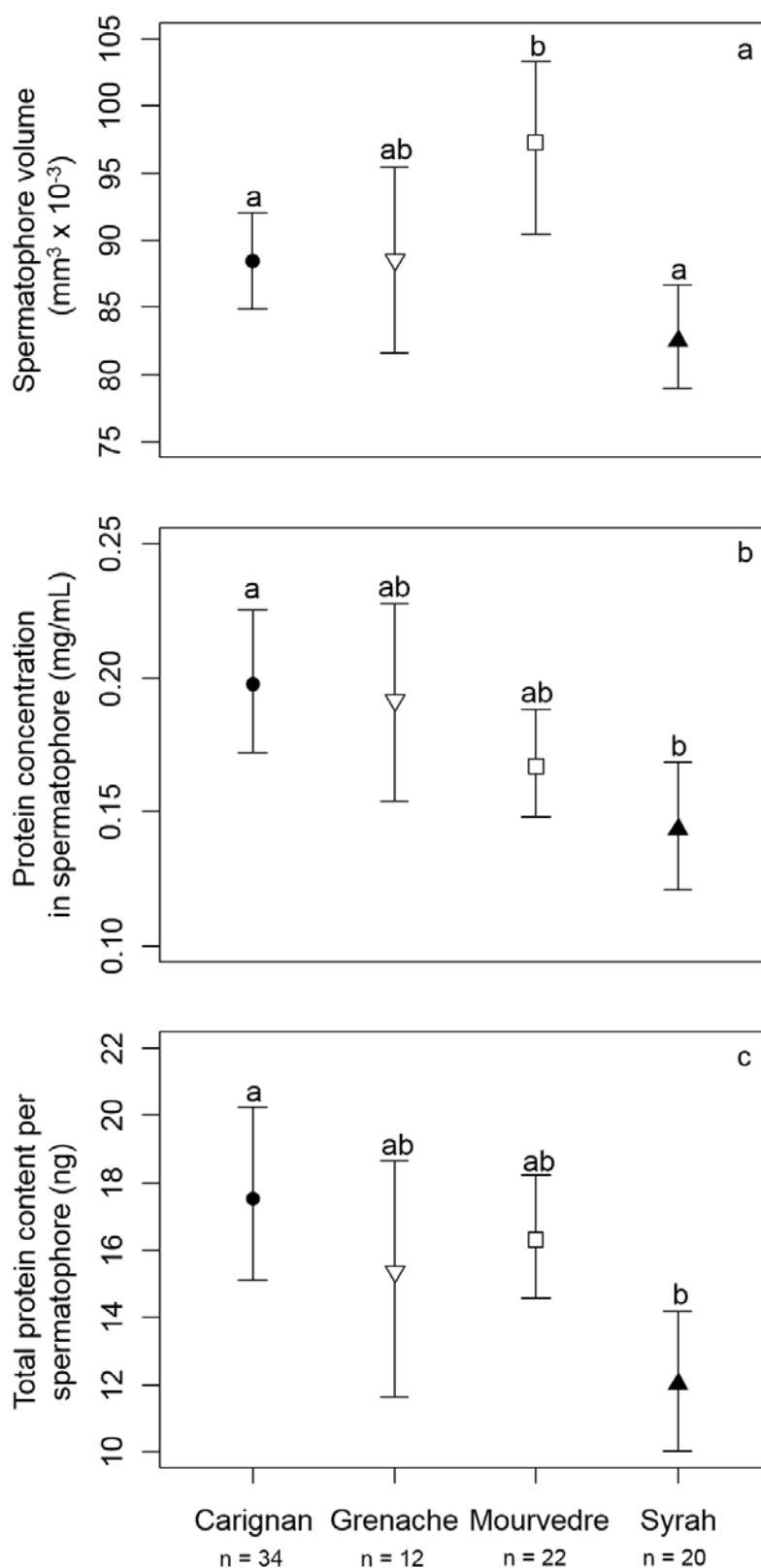


Figure 2. Mean [IC95] values for: a) the spermatophore volume; b) the spermatophore protein concentration (mg/mL); and c) the total amount of protein per spermatophore (ng) for *L. botrana* males derived from larvae reared on four different grape cultivars (Carignan, Grenache, Mourvedre and Syrah). For each cultivar the numbers in brackets at the bottom represent the sample size.

Consequences for female reproductive output

The latent period prior to the first egg being laid depended of the male larval cultivar. Females mated with males from larvae on Syrah (transferred nutrient-poor spermatophores) took longer to oviposit than females from larvae on Carignan or Mourvedre (Fig. 3a; correcting for female mass, $W = 20.91$, $p = 0.0003$). Females mated with males from larvae on Syrah (transferred small spermatophores containing low protein concentrations) also had reduced fecundity compared with females mated with males from larvae on Carignan (transferred large spermatophore containing more protein) (Fig. 3b; male mass effect: $F_{1,60} = 4.98$, $p = 0.029$; female mass effect: $F_{1,60} = 5.73$, $p = 0.020$; cultivar effect: $F_{3,60} = 3.09$, $p = 0.034$). However, the male larval cultivar did not affect either female fertility ($F_{1,62} = 29.21$, $p = 0.223$; minimum and maximum of the mean percent of eggs hatched for the four cultivars: 88.9 and 91.5%) or longevity (corrected for female mass, $W = 5.91$, $p = 0.206$; minimum and maximum of the mean number of days for the four cultivars: 10.88 and 13.75).

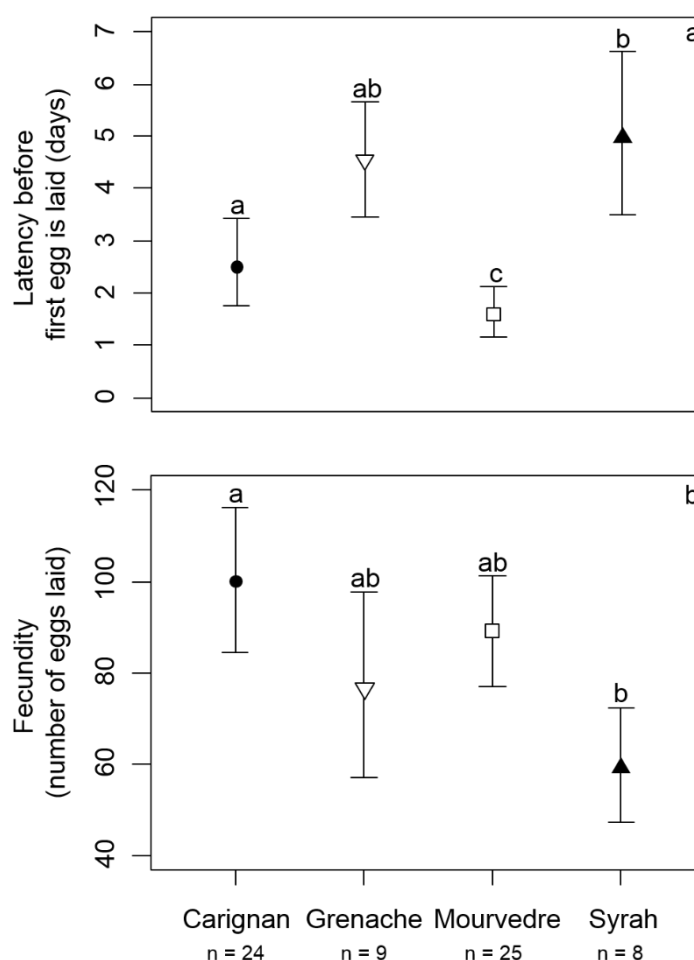


Figure 3. Mean [IC95] values for: a) latency period to first oviposition (days); and b) fecundity (number of eggs laid) for *L. botrana* females mated with males derived from larvae reared on four different grape cultivars (Carignan, Grenache, Mourvedre and Syrah). For each cultivar the numbers in brackets at the bottom represent the sample size.

DISCUSSION

The results of the experiments in this study, conducted using wild populations, have important implications for the understanding of insect population dynamics. We found that the larval host cultivar strongly influenced the energy reserves of male adult moths, affecting their body condition and ultimately their reproductive potential through the size and content of spermatophores they transferred to females at mating. For example, males from larvae reared on Mourvedre had more energy reserves and produced larger spermatophores than males from larvae on Syrah. Furthermore, males having differing reserves may alter the allocation of energy between body condition and spermatophore size and composition. In our study the males from larvae on Carignan had the poorest body condition, but at mating transferred the most protein to females in their spermatophores. These results support the idea that organisms can buffer the effect of nutritional constraints by changing energy allocation to different fitness-related traits. The females receiving protein-rich spermatophores at mating had an overall greater reproductive output (e.g. females mated with males from larvae on Carignan) than females mated with poor quality males producing less nutritive spermatophores (e.g. females mated with males from larvae on Syrah).

Males having large energy reserves (i.e. from larvae on Mourvedre) produced more ejaculate than males having few energy reserves (i.e. from larvae on Syrah), which is a result consistent with many studies of lepidopteran species (Delisle & Bouchard 1995; Ferkau & Fischer 2006; Lewis & Wedell 2007; Blanco et al. 2009). Indeed, there is a growing body of evidence linking energy reserves to the reproductive success of male insects, with males containing larger reserves of lipid, protein and glycogen usually having greater mating success in terms of mate acquisition than males having fewer energy reserves (Blay & Yuval 1997; Kehl et al. 2015). Food availability during larval development is also an important factor determining the body condition a male can achieve as an adult. For each male larval cultivar we found a positive relationship between male body condition (corresponding to the regression between their body mass and their wing area surface) and energy reserves, but the males from larvae on Carignan, which had a large pool of reserves, nevertheless had a poorer body condition than males from larvae on Syrah, which had fewer reserves. The body condition of males has been shown to be strongly related to the body fat content (Zwaan et al. 1991; Oberhauser et al. 1997). This measure also reflects the male wing loading, which typically increases the flight capacity of insects (Berwaerts et al. 2002; Stjernholm et al. 2005). In general, nutritional deprivation suppresses the development of flight muscles and decreases long-duration flight capacity (Sappington & Showers 1993; Zhang et al. 2008), which affects the ability of males to

find a mate. If poor body condition males are limited in flight performance, we would expect that male *L. botrana* from larvae on Carignan would have greater difficulty in finding females, which are very dispersed in the landscape, than males from larvae on the three other cultivars, which had better body condition. This effect will depend on the population size, and be critical at low density and/or in cases of male biased operational sex ratio, where the probability of male/female encounters is lower. However, males from larvae on Carignan compensated by having greater reproductive success (in terms of offspring sired) than males from larvae on Syrah or Grenache. This suggests that Carignan-origin males may have altered their allocation of energy reserves to different fitness-related traits, increasing the investment in spermatophore composition for immediate reproduction at the expense of flight capacity for future reproduction. Laboratory wind tunnel studies on the flight performance of *L. botrana* males will be needed to determine whether their ability to disperse and find mates varies as a function of the host plant on which their larvae are reared.

Although most studies have focused on the relationship between physiological trade-offs and female fitness, for several species there is evidence that males also face important physiological trade-offs that have an impact on fitness, often because of the high energetic cost of courtship and spermatophore production. Producing sperm, searching for and obtaining females, competing with rivals and ensuring paternity are clear examples of the reproductive costs for insect males (Papadopoulos et al. 2010; Bretman et al. 2013). Thus, high nutritional status is a prerequisite for energy demanding activities including courtship and mating. Therefore, males in poor condition usually face trade-offs between immediate reproductive effort and future reproductive output (Stearns 1992; Roff 2002; Boggs 2009). In our study, males in good condition, derived from larvae reared on Mourvedre, could afford to invest in both body condition and spermatophore production, unlike the other males. Thus, poor quality host plants providing suboptimal nutrition are expected to result in males having to trade off investments in various fitness traits including courtship activity, flight capacity and spermatophore production. This seems to have been the strategy adopted by males from larvae on Syrah and Carignan, which invested in either body condition (important in flight performance, and hence mate acquisition; males from larvae on Syrah) or spermatophore quality (important in offspring production; males from larvae on Carignan). Such trade-offs can also occur within a function during one reproduction event; for example, the quantity of resources put into the spermatophore at each mating. Males from larvae on Carignan produced small spermatophores that contained as much protein as the large spermatophores transferred by males from larvae on Mourvedre. These results suggest that adjustment in

spermatophore size and protein content is constrained by male larval nutrition, and thus by their adult energy reserves, and that these male reproductive traits are of critical importance in determining the female reproductive output.

The effects of male ejaculate and nuptial gifts on female reproduction have been extensively studied in a number of animals (see South & Lewis 2011 for a review). Our results are consistent with the general view that the size and content of spermatophores can be used as a measure of male reproductive quality (Simmons et al. 1999; South & Lewis 2011). Indeed, males from larvae on Carignan and Mourvedre had high levels of energy reserves. They could be considered to be males of high reproductive quality, because females mating with these males received large quantities of spermatophore-derived protein that would enhance their lifetime fecundity, and accelerate short-term egg production compared with females mated with males from larvae on Syrah. The extent to which nutrients donated by males are used by females will depend on the opportunity for the use of these nutrients, including the timing of egg maturation, the female adult diet and the degree to which spermatophores are adsorbed. In *L. botrana* the females are capital breeders and emerge with some of their eggs immature (Torres-Vila & Rodriguez-Molina 2002), and consequently may use male spermatophore-derived nutrients in egg maturation. The fecundity of *L. botrana* females is known to be influenced by their larval host plant (Moreau et al. 2006), and by the spermatophore they receive from their mate during copulation (Moreau et al. 2007; Muller et al. 2015). Our results suggest that rather than its size, the quality of the spermatophore better explains the variation observed in female fecundity. Thus, while males raised from larvae on Carignan produced a small spermatophore, it still enabled the females to lay as many eggs as females that received a larger spermatophore. Evidence has been provided for the role of ejaculatory proteins as fecundity-enhancing substances in insects (Wolfner 2002; Gillot 2003), and our results are consistent with these findings.

Given the importance of male spermatophore quality on female reproductive output, *L. botrana* females are expected to exhibit a degree of mate choice based on the male nutritional status, as a signal of male quality. Female mate choice in the Lepidoptera has been demonstrated to be influenced by both visual and olfactory cues (Candolin 2005; Costanzo & Monteiro 2007). For example, a large male body size is often positively related to mating success, and females usually prefer to mate with large males displaying specific cues including ornaments or sex pheromones (Velando et al. 2006; Nieberding et al. 2012). As the male's body condition in our study did not reflect its capacity to inseminate females with a high quality

spermatophore (e.g. males from larvae on Carignan), *L. botrana* females would not be expected to discriminate among males based on their morphology. However, male chemical cues may be reliable indicators of the male nutritional state, as metabolic energy can be converted directly into chemical cues (Bradbury & Vehrencamp 1998). Further study is needed to assess whether male chemical scents are used as cues for female choice in *L. botrana*. However, as yet there is little evidence for variation in the male scent in this species.

In summary, in *L. botrana* the male condition may influence mating behavior in two distinct ways. Firstly, males in good condition, probably as a result of larval development on a highly nutritive host plant, have a large pool of resources to invest in sexual traits, and the expression of these traits may be relatively unconstrained compared with males in poor condition. Secondly, males in poor condition may face a trade-off in their allocation of energy to reproductive traits, because those in poor condition may alter the optimal allocation of resources to traits and relative trait expressions (Boggs & Freeman 2005; Perry & Rowe 2010). We found evidence for these two condition-dependent changes in mating behavior, based on the male larval cultivar. In particular, males from larvae on Mourvedre appeared to be high quality, investing in both current reproductive traits and in body condition, which would influence their future reproductive effort. However, males from larvae on Syrah and Carignan faced trade-offs in their reproductive traits, investing either in immediate reproductive effort or in body condition (and therefore flight performance). Overall, the main finding of this study is that the total amount of male reserves derived from larval feeding markedly influences reproductive potential by affecting the adult phenotype and its sexual traits. However, our experimental design did not enable us to distinguish direct trade-offs among individuals; to elucidate mating strategies throughout the lifecycle of *L. botrana*, future studies will be needed to evaluate individual-based allocation of reserves.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Guisset, L. Delbac, S. Motreuil, J. Oustric and D. Richy and for their valuable experimental assistance. This study was supported by the CNRS and grants from the ANR (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006). We also thank the Conseil Régional of Aquitaine, the Conseil Régional of Bourgogne, the Chambre d'Agriculture des Bouches-du-Rhône, du Gard and des Pyrénées-Orientales. The second author is associated with the Labex Cote research programme.

REFERENCES

- Andersen, L. H., Kristensen, T. N., Loeschcke, V., Toft, S., & Mayntz, D.** (2010). Protein and carbohydrate composition of larval food affects tolerance to thermal stress and desiccation in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 56, 336-340.
- Andersson, M. B.** (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Awmack, C. S., & Leather, S. R.** (2002). Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, 47, 817-844.
- Bede, J. C., McNeil, J. N., & Tobe, S. S.** (2007). The role of neuropeptides in caterpillar nutritional ecology. *Peptides*, 28, 185-196.
- Berwaerts, K., Van Dyck, H., & Aerts, P.** (2002). Does flight morphology relate to flight performance? An experimental test with the butterfly *Pararge aegeria*. *Functional Ecology*, 16, 484-491.
- Blanco, C. A., Rojas, M. G., Groot, A. T., Morales-Ramos, J., & Abel, C. A.** (2009). Size and chemical composition of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) spermatophores. *Annals of the Entomological Society of America*, 102, 629-637.
- Blay, S., & Yuval, B.** (1997). Nutritional correlates of reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Animal Behaviour*, 54, 59-66.
- Boggs, C. L.** (1997). Reproductive allocation from reserves and income in butterfly species with differing adult diets. *Ecology*, 78, 181-191.
- Boggs, C. L., & Freeman, K. D.** (2005). Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia*, 144, 353-361.
- Boggs, C. L.** (2009). Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology*, 23, 27-37.
- Bonduriansky, R.** (2007). The Evolution of Condition-Dependent Sexual Dimorphism. *The American Naturalist*, 169, 9-19.
- Bradbury, J. W., & Vehrencamp, S. L.** (1998). *Principles of animal communication*. Sinauer, Sunderland, USA.
- Bretman, A., Westmancoat, J. D., Gage, M. J., & Chapman, T.** (2013). Costs and benefits of lifetime exposure to mating rivals in male *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 67, 2413-2422.
- Candolin, U.** (2005). Why do multiple traits determine mating success? Differential use in female choice and male competition in a water boatman. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272, 47-52.
- Costanzo, K., & Monteiro, A.** (2007). The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274, 845-851.

- Davis, A. K.** (2014). Intraspecific variation in wing colour is related to larval energy reserves in monarch butterflies (*Danaus plexippus*). *Physiological Entomology*, 39, 247-253.
- Delisle, J., & Bouchard, A.** (1995). Male larval nutrition in *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae): an important factor in reproductive success. *Oecologia*, 104, 508-517.
- Eichhorn, K. W., & Lorenz, D. H.** (1977). Phanologische entwicklungsstadien der rebe. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 29, 119-120.
- Elkin, C. M., & Reid, M. L.** (2005). Low energy reserves and energy allocation decisions affect reproduction by mountain pine beetles, *Dendroctonus ponderosae*. *Functional Ecology*, 19, 102-109.
- Ferkau, C., & Fischer, K.** (2006). Costs of reproduction in male *Bicyclus anynana* and *Pieris napi* butterflies: effects of mating history and food limitation. *Ethology*, 112, 1117-1127.
- Fischer, K., & Fiedler, K.** (2001). Effects of larval starvation on adult life-history traits in the butterfly species *Lycaena tityrus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Entomologia generalis*, 25, 249-254.
- Foster, S. P., & Ayers, R. H.** (1996). Multiple mating and its effects in the lightbrown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker). *Journal of Insect Physiology*, 42, 657-667.
- Foray, V., Pelisson, P. F., Bel-Venner, M. C., Desouhant, E., Venner, S., Giron, D., & Rey, B.** (2012). A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: the van Handel's method (1985) revisited. *Physiological Entomology*, 37, 295-302.
- Forstmeier, W., & Schielzeth, H.** (2011). Cryptic multiple hypotheses testing in linear models: overestimated effect sizes and the winner's curse. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65, 47-55.
- Gilligan, T. M., Epstein, M. E., Passoa, S. C., Powell, J. A., Sage, O. C., & Brown, J. W.** (2011). Discovery of *Lobesia botrana* ([Denis & Schiffermüller]) in California: An Invasive Species New to North America (Lepidoptera: Tortricidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 113, 14-30.
- Gillott, C.** (2003). Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*, 48, 163-184.
- Harshman, L. G., & Zera, A. J.** (2007). The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 80-86.
- Hunt, J., Brooks, R., Jennions, M. D., Smith, M. J., Bentsen, C. L., & Bussiere, L. F.** (2004). High-quality male field crickets invest heavily in sexual display but die young. *Nature*, 432, 1024-1027.
- Iwasa, Y., & Pomiankowski, A.** (1994). The evolution of mate preferences for multiple sexual ornaments. *Evolution*, 48, 853-867.
- Jia, Z., Jiang, Z. H., & Sakaluk, S. K.** (2000). Nutritional condition influences investment by male katydids in nuptial food gifts. *Ecological Entomology*, 25, 115-118.

- Jönsson, K. I.** (1997). Capital and income breeding as alternative tactics of resource use in reproduction. *Oikos*, 78, 57-66.
- Katsuki, M., Okada, Y., & Okada, K.** (2012). Impacts of diet quality on life-history and reproductive traits in male and female armed beetle, *Gnatocerus cornutus*. *Ecological Entomology*, 37, 463-470.
- Kehl, T., Bensch, J., Böhm, F., Kniepkamp, B. O., Leonhardt, V., Schwieger, S., & Fischer, K.** (2015). Fat and sassy: factors underlying male mating success in a butterfly. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 155, 257-265.
- Kokko, H., Brooks, R., Jennions, M. D., & Morley, J.** (2003). The evolution of mate choice and mating biases. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 653-664.
- Lessells, C. M., & Boag, P. T.** (1987). Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *The Auk*, 104, 116-121.
- Lewis, Z., & Wedell, N.** (2007). Effect of adult feeding on male mating behaviour in the butterfly, *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Behavior*, 20, 201-213.
- Lewis, Z., Sasaki, H., & Miyatake, T.** (2011). Sex starved: do resource-limited males ensure fertilization success at the expense of precopulatory mating success?. *Animal Behaviour*, 81, 579-583.
- McGuigan, K.** (2009). Condition dependence varies with mating success in male *Drosophila bunnanda*. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 1813-1825.
- Metcalf, N. B., & Monaghan, P.** (2001). Compensation for a bad start: grow now, pay later?. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 254-260.
- Mevi-Schütz, J., & Erhardt, A.** (2003). Larval nutrition affects female nectar amino acid preference in the map butterfly (*Araschnia levana*). *Ecology*, 84, 2788-2794.
- Milonas, P. G., Farrell, S. L., & Andow, D. A.** (2011). Experienced males have higher mating success than virgin males despite fitness costs to females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65, 1249-1256.
- Moreau, J., Thiéry, D., Troussard, J. P., & Benrey, B.** (2007). Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology*, 32, 747-753.
- Moreau, J., Benrey, B., & Thiéry, D.** (2006). Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 96, 205-212.
- Muller, K., Thiéry, D., Moret, Y., & Moreau, J.** (2015). Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69, 39-47.

- Nieberding, C. M., Fischer, K., Saastamoinen, M., Allen, C. E., Wallin, E. A., Hedenström, E., & Brakefield, P. M. (2012). Cracking the olfactory code of a butterfly: the scent of ageing. *Ecology Letters*, 15, 415-424.
- Oberhauser, K. S. (1989). Effects of spermatophores on male and female monarch butterfly reproductive success. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 25, 237-246.
- Oberhauser, K. S. (1997). Fecundity, lifespan and egg mass in butterflies: effects of male-derived nutrients and female size. *Functional Ecology*, 11, 166-175.
- Papadopoulos, N. T., Liedo, P., Müller, H. G., Wang, J. L., Molleman, F., & Carey, J. R. (2010). Cost of reproduction in male medflies: the primacy of sexual courting in extreme longevity reduction. *Journal of Insect Physiology*, 56, 283-287.
- Perry, J. C., & Rowe, L. (2010). Condition-dependent ejaculate size and composition in a ladybird beetle. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277, 3639-3648.
- Perry, J. C., Sirot, L., & Wigby, S. (2013). The seminal symphony: how to compose an ejaculate. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 414-422.
- R. Core Team. (2015). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria; 2014. URL <http://www.R-project.org>.
- Roff, D. A., Mostow, S., & Fairbairn, D. J. (2002). The evolution of trade-offs: testing predictions on response to selection and environmental variation. *Evolution*, 56, 84-95.
- Sappington, T. W., & Showers, W. B. (1993). Influence of larval starvation and adult diet on long-duration flight behavior of the migratory moth *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 22, 141-148.
- Scharf, I., Peter, F., & Martin, O. Y. (2013). Reproductive trade-offs and direct costs for males in arthropods. *Evolutionary Biology*, 40, 169-184.
- Simmons, L. W., Beesley, L., Lindhjem, P., Newbound, D., Norris, J., & Wayne, A. (1999). Nuptial feeding by male bushcrickets: an indicator of male quality?. *Behavioral Ecology*, 10, 263-269.
- Simmons, L. W. (2011). Resource allocation trade-off between sperm quality and immunity in the field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. *Behavioral Ecology*, 23, 168-173.
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Stjernholm, F., Karlsson, B., & Boggs, C. L. (2005). Age-related changes in thoracic mass: possible reallocation of resources to reproduction in butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 86, 363-380.
- South, A., & Lewis, S. M. (2011). The influence of male ejaculate quantity on female fitness: a meta-analysis. *Biological Reviews*, 86, 299-309.
- Telang, A., & Wells, M. A. (2004). The effect of larval and adult nutrition on successful autogenous egg production by a mosquito. *Journal of Insect Physiology*, 50, 677-685.

- Thiéry, D., & Moreau, J.** (2005). Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, 143, 548-557.
- Tigreros, N.** (2013). Linking nutrition and sexual selection across life stages in a model butterfly system. *Functional Ecology*, 27, 145-154.
- Torres-Vila, L. M., Stockel, J., Roehrich, R., & Rodríguez-Molina, M. C.** (1997). The relation between dispersal and survival of *Lobesia botrana* larvae and their density in vine inflorescences. *Entomologia experimentalis et applicata*, 84, 109-114.
- Torres-Vila, L. M., Rodríguez-Molina, M. C., Roehrich, R., & Stockel, J.** (1999). Vine phenological stage during larval feeding affects male and female reproductive output of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 89, 549-556.
- Torres-Vila, L. M., & Rodríguez-Molina, M. C.** (2002). Egg size variation and its relationship with larval performance in the Lepidoptera: the case of the European grapevine moth *Lobesia botrana*. *Oikos*, 99, 272-283.
- Vahed, K.** (1998). The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. *Biological Reviews*, 73, 43-78.
- Van Handel, E.** (1985a). Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1, 302-304.
- Van Handel, E.** (1985b). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1, 299-301.
- Van Noordwijk, A. J., & de Jong, G.** (1986). Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *The American Naturalist*, 128, 137-142.
- Velando, A., Beamonte-Barrientos, R., & Torres, R.** (2006). Pigment-based skin colour in the blue-footed booby: an honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia*, 149, 535-542.
- Velde, L. V., Silvestre, P., Damiens, D., & Van Dyck, H.** (2012). Male reproductive investment relative to age and flight behaviour in the monandrous butterfly *Pararge aegeria*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66, 347-359.
- Wedell, N., & Cook, P. A.** (1999). Butterflies tailor their ejaculate in response to sperm competition risk and intensity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266, 1033-1039.
- Wolfner, M. F.** (2002). The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, 88, 85-93.
- Zhang, Y., Wang, L., Wu, K., Wyckhuys, K. A., & Heimpel, G. E.** (2008). Flight performance of the soybean aphid, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) under different temperature and humidity regimens. *Environmental entomology*, 37, 301-306.
- Zwaan, B., Bijlsma, R., & Hoekstra, R. F.** (1995). Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 49, 649-659.

3. QU'EST-CE QU'UN MÂLE DE QUALITÉ EN TANT QUE PARTENAIRE SEXUEL ?

Au cours des précédentes études, nous avons mis en évidence dans deux expériences distinctes que la qualité reproductive des mâles se reflétait à travers la qualité de leur spermatophore, contrainte par deux principaux facteurs, leur expérience sexuelle, mesurée sur des mâles de laboratoire (Chapitre III) et leur nutrition larvaire sur différents cépages, mesurée sur des mâles provenant de populations naturelles (Chapitre IV.1 et 2). L'étude qui suit se propose de tester les effets combinés de l'expérience sexuelle et du cépage d'origine des mâles sur leurs performances reproductives en populations naturelles et d'examiner comment ces deux facteurs, qui modulent la qualité des mâles, participent au potentiel reproductif des femelles.

Pour répondre à ces questions, nous avons récolté des chenilles en fin de développement sur trois cépages (Carignan, Mourvèdre et Grenache) au sein du même vignoble (Perpignan) et dans deux autres sites géographiques (Nîmes et Sènas) sur du Grenache. Une fois adultes, les mâles provenant de différentes origines (cépages ou sites géographiques), ont eu accès à autant d'opportunités de reproduction qu'ils ont vécu de jours. Pour cela, chaque jour, une nouvelle femelle vierge provenant de la souche d'élevage de l'INRA de Bordeaux leur a été présentée, les deux partenaires disposant de 4 heures pour s'accoupler. Une partie des individus a été filmée depuis la mise en place de la paire jusqu'à l'accouplement afin de relever les comportements précopulatoires reflétant la motivation sexuelle des deux partenaires à s'accoupler. Après l'accouplement, deux lots ont été constitués (suivant la procédure présentée dans le **MATÉRIEL & MÉTHODES, PARTIE 2.3**). Les femelles appartenant au premier lot ont été disséquées afin d'extraire le spermatophore transféré par le mâle et d'en mesurer le volume et le contenu en spermatozoïdes eupyrènes et apyrènes. Les femelles appartenant au second lot ont été maintenues dans leur tube d'accouplement dans lequel elles ont pondu librement jusqu'à leur mort, nous donnant accès à leur fécondité, fertilité et longévité en fonction de l'origine (cépage ou site géographique) et de l'expérience sexuelle de leur partenaire sexuel (correspondant à leur rang d'accouplement).

Nos résultats démontrent que la qualité reproductive des mâles dépend à la fois du cépage sur lequel ils ont effectué leur développement larvaire et également de leur expérience sexuelle. Le nombre d'opportunités de reproduction des mâles est contraint par leur longévité, elle-même largement dépendante de leur cépage d'origine. Assez intuitivement, les mâles qui vivent longtemps ont une probabilité plus élevée de rencontrer des partenaires au cours de

leur vie par rapport à des mâles dont la longévité est courte. De plus, l'investissement reproductif des mâles dans la production de spermatophores décline au cours des accouplements successifs et dépend également de leur cépage d'origine. Ainsi, le potentiel reproductif des femelles, qui est directement affecté par la qualité du spermatophore qu'elles reçoivent lors de l'accouplement, est influencé à la fois par l'expérience sexuelle et par le cépage d'origine de leur partenaire sexuel.

De manière générale, au sein d'un même cépage, les femelles s'accouplant avec des mâles vierges pondent plus d'œufs que celles s'accouplant avec des mâles déjà accouplés une ou plusieurs fois. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec des mâles vierges et non-vierges provenant du laboratoire (Chapitre III). De plus, si on s'intéresse maintenant aux conséquences de la qualité reproductrice des mâles – qui dépend de leur cépage d'origine – sur le potentiel reproductif des femelles, les femelles s'accouplant avec des mâles vierges provenant du Mourvèdre ont une fécondité plus faible que celles s'accouplant avec les mâles vierges provenant des deux autres cépages. Enfin, il apparaît important de considérer ces deux facteurs combinés puisque par exemple, les femelles s'accouplant avec des mâles vierges provenant du Mourvèdre ont une fécondité plus faible que les femelles s'accouplant avec des mâles déjà accouplés une fois provenant du Grenache.

Nos résultats démontrent également que les femelles sont capables de discriminer parmi les mâles en fonction de leur expérience sexuelle et de leur cépage d'origine. En effet, les femelles sont plus motivées à s'accoupler avec les mâles de qualité reproductrice élevée (*i.e.* les mâles vierges ou accouplés une seule fois et les mâles provenant du Grenache et du Carignan), ces mâles leur procurant de larges bénéfices directs (un résultat cohérent avec les études précédentes, respectivement dans le chapitre III et dans le chapitre IV.1 et 2).

MANUSCRIT 4

WHAT MAKES A GOOD MATE? FACTORS INFLUENCING MALE AND FEMALE REPRODUCTIVE SUCCESS IN A POLYPHAGOUS MOTH

WHAT MAKES A GOOD MATE? FACTORS INFLUENCING MALE AND FEMALE REPRODUCTIVE SUCCESS IN A POLYPHAGOUS MOTH

Karen MULLER ^{a, a}, Denis THIERY ^{b, c}, Sébastien MOTREUIL ^a and Jérôme MOREAU ^a

^a Université Bourgogne Franche-Comté, Équipe Écologie Évolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France.

^b INRA UMR 1065 Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France.

^c Université de bordeaux, INRA UMR 1065, Save, Bordeaux Sciences Agro, Villenave d'Ornon Cedex

ABSTRACT

Male and female interest in mating is known to be asymmetrical. Classical sexual selection theory predicts that males will maximize their reproductive success by mating with several females, whereas females boost their fitness by being selective and choosing the highest quality mate. An important question concerns what makes an optimal mate. Females are expected to prefer males providing direct material benefits for the present generation and/or indirect genetic benefits for their offspring in the subsequent generation. However, the male contribution to these benefits is limited, as reproduction imposes non-trivial costs on males. Thus, female benefits from mating can vary markedly as a function of the condition of their mate. In capital breeding monandrous species, in which males invest the majority of their larval resources in a single reproductive event, the females are likely to prefer to mate with virgin males in good condition (i.e. males that have developed on high quality food sources). In this study we used the European grapevine moth (*Lobesia botrana*) to test experimentally whether the mating history and larval nutrition of males influence their quality as mates. We provided wild *L. botrana* males originating from different cultivars and vineyards with unlimited access to females originating from an inbred strain, and examined the lifetime reproductive success of the males and the consequences for the reproductive output of females in relation to male larval origin and mating history. Our results show that 'male quality' depended on both the male larval origin and mating history, and that females discriminated among males and mated more with males having high sperm quality (virgin males or males from certain cultivars or geographical origins) to obtain substantial direct benefits.

KEY WORDS: female reproductive success, insect-plant interactions, lifetime reproductive success, *lobesia botrana*, male quality, mating history

INTRODUCTION

Sexual partners have different objectives. To increase fitness, males attempt to maximize their reproductive success by copulating with as many females as possible, because each additional mating offers an opportunity to father offspring (Bateman 1948, Trivers 1972). Consequently, to optimize fertilization opportunities males usually expend substantial effort in searching for mates (Andersson 1994). Male mating effort is not only restricted to precopulatory strategies to achieve mating, but continues following copulation, through competition among sperm derived from the ejaculate of two or more males, which also affects the fertilization success (Parker 1970, Simmons 2001). Sperm quantity and quality, timing of mating relative to oviposition, male mating history, and copulatory plugs are the main contributors to variation in fertilization success among males (Simmons 2001). Thus, 'male quality' is determined by a variety of behavioral, physiological and morphological traits (Lailvaux & Kasumovic 2010, Wilson & Nussey 2010) that influence the propensity to mate (through precopulatory behaviors including courtship, production of sex pheromone, and mate guarding) and sperm competition following mating (particularly through the quality of the ejaculate), which helps ensure fertilization (Andersson 1994, Simmons 2001).

From a female perspective, good mates are those that are able to provide direct and indirect benefits (Møller & Jennions 2001). According to Bateman's principle, to generate more or fitter offspring, females will preferentially mate with few, but good quality males (Andersson 1994, Kokko et al. 2003). Indirect benefits can arise from genetic traits of the chosen male (e.g. good genes), which lead to increased fitness of the resulting offspring (Tregenza & Wedell 2000, Mays & Hill 2004). Direct benefits are related to whether the chosen male is sufficiently fertile (Thornhill & Alcock 1983, Choe & Crespi 1997), free of disease, or able to provide parental care, access to territories or to nutritive resources including nuptial gifts (Vahed 1998, Gillot 2003). However, the male contribution to these direct benefits is limited, as reproduction imposes non-trivial costs on males, arising from mate location, competition, courtship, parental care, and especially ejaculate production (Kotiaho & Simmons 2003, Paukku & Kotiaho 2005, Janowitz & Fischer 2010, Scharf et al. 2013). Thus, female benefits from mating can be extremely variable based on the quality of their mate, because factors limiting the reproduction of males can have profound consequences for female reproductive output.

For species in which males provide females with material resources including nutritive ejaculate (for example, spermatophores in lepidopteran species), the influence of male mating

frequency on future reproductive output can also be extremely pronounced (Wedell et al. 2002, Torres-Vila & Jennions 2005). For example, males may be limited in the amount of sperm they can transfer to a female during mating (Marcotte et al. 2005), and male mating history (the number of previous matings) is certainly a key factor determining female fitness, especially in species in which males can keep copulating despite being sperm depleted (Damiens & Bovin 2006, Steiner et al. 2008). Because ejaculate production is costly (Dewsbury 1982), male performance usually declines across multiple matings, leading to diminishing reproductive returns for males (reviewed by Simmons 2001).

It has been commonly assumed that males have to face trade-offs between an investment in somatic maintenance or in reproduction because they have finite resources to invest (Stearns 1992, Barnes & Partridge 2003). Such trade-offs typically arise under food limitation, because male expenditure in ejaculate production is constrained in part by resource availability; consequently males have to invest in either current or future reproduction (Simmons 2001). In capital breeders, which rely mainly on larval reserves for successful reproduction, the resources needed to produce a nutritive ejaculate can be a limiting factor. Therefore, ejaculate production could be related to the number of copulations and male larval nutrition, but few studies have reported the quantitative and qualitative relationships involved. Diet quality can have a significant influence on the rate at which males produce ejaculate, the quality of the seminal fluid proteins, and the effectiveness of the ejaculate in achieving fertilization (Gage & Cook 1994, Simmons & Kvarnemo 1997, Arnqvist & Danielsson 1999, Simmons 2001). When males lack adequate protein sources or when they have developed on nutritionally limited host plants, critical depletion of their ejaculate generally occurs during successive matings (Gage & Cook 1994). However, the trade-offs between larval nutrition and male lifetime reproductive investment have often been neglected because most studies have focused on the factors affecting male reproductive output following emergence, particularly during the first two mating events (Delisle & Hardy 1997, Tigreros 2013).

The European grapevine moth (*Lobesia botrana*; Lepidoptera: Tortricidae) (Denis & Schiffermüller 1775) is a very important pest of grapes worldwide (Delbac & Thiéry, 2015), and several studies of wild insects have shown marked effects of larval nutrition on male and female fitness (Moreau et al. 2006, 2007, Muller et al. 2015). The grapevine moth is considered to be monandrous, with approximately 70% or less of wild females mating only once during their lives (Torres-Vila et al. 1997). The lifetime reproductive capacity of male moths of this species remains unknown because most studies have concerned only the first mating of

individuals (Torres-Vila et al. 1995, Moreau et al. 2006, 2007, Muller et al. 2015; see Torres-Vila et al. 1999 for an exception). We recently found that *L. botrana* females prefer to mate with virgin males to maximize the direct benefits associated with receiving large spermatophores (Muller et al., unpublished data). In the present study we provided wild *L. botrana* males that developed on different grape cultivars and in different vineyards with unlimited access to females of an inbred strain, and investigated the lifetime reproductive success of the males. We also investigated the consequences for the reproductive output of females as a function of male larval origin and mating history. In a first step we explored variation in male reproductive investment (spermatophore size, number of eupyrene and apyrene sperm) during successive matings. In a second step we studied the consequences of male mating history and larval nutrition on the reproductive output of females (fecundity, fertility, and longevity). Consistent with recent studies on lepidopteran species (Torres-Vila et al. 2005, McNamara et al. 2009), we predicted that male reproductive investment would decline over consecutive matings, and would be affected by male larval nutrition on different cultivars. Each of these factors is known to influence male reproductive performance (Muller et al. unpublished data, Muller et al. 2015), and together could reflect ‘male quality’ and influence female mate choice, so affecting offspring size and population dynamics in this species.

MATERIALS & METHODS

Field sampling

Lobesia botrana is a major pest of grapes. It is widely distributed in most European vineyards and is now present in the USA, where 3–4 larval generations occur each year, depending on latitude. First generation larvae of *L. botrana* were collected in the field during June 2013. To test for a cultivar effect within a given population, larvae were sampled from three grape (*Vitis vinifera*) cultivars (‘Carignan’, ‘Mourvèdre’ and ‘Grenache’) in the same vineyard (Perpignan, France; N 42°44′7.063″, E 2°52′56.441″), ensuring the same abiotic conditions (temperature, light exposure, humidity) for larval development. To test for a geographical effect we sampled larvae from the cultivar ‘Grenache’ from two additional geographically distinct French vineyards; Estézargues (N 43°56′49.781″, E 4°39′39.372″) and Sénas (N 43°43′54.251″, E 5°1′45.621″). Larvae were sampled at the end of the larval cycle (fifth instar), following construction of glomerulae made of flower buds aggregated in larval silk (phenology 17–25; Eichhorn & Lorenz 1977). Larvae usually complete their development in a single grape bunch, and each glomerulus is only occupied by a single larva (Torres-Vila et al.

1997). To collect newly emerged adults, larvae at the end of their development were placed in large polyethylene boxes (60 × 40 cm, height 21 cm) in the laboratory and fed *ad libitum* on grape bunches from the same cultivar and site where they developed, and were incubated at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ RH, and under natural photoperiod conditions. The larvae were checked daily until pupation, at which time they were gently removed from their glomerulae. The pupae were weighed to the nearest 0.1 mg using a Precisa 262 SMA-FR microbalance, placed individually in glass tubes (70 × 9 mm diameter) stoppered with cotton wool plugs, and stored at $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ under natural photoperiod conditions. The pupae were checked each morning, and newly emerged adults were visually sexed by examination of the ventral tip of the abdomen.

To assess the importance of male larval origin and mating history on male reproductive investment and female reproductive output, 2-day-old males of different larval origin (cultivar and site) were given daily mating access to a new 1- or 2-day-old standardized virgin female; this was continued until death of the male. To assess the effect of males on the reproductive performances of both sexes, we used standardized females from an inbred strain (INRA Bordeaux) maintained without diapause on a semi-artificial diet (see Moreau et al. 2007 and Muller et al. 2015 for more details). Males used for the following mating experiments were randomly distributed into two subsamples. The first subsample was used to evaluate the effect of male origin (cultivar and site) and mating history on male lifetime reproductive investment, and was also used to monitor the male precopulatory behavior for each mating event. The second subsample was used to assess the consequences of male origin (cultivar and site) and mating history on the reproductive output of females.

Mating procedure

At dusk, one male (2 days old on the first day of the experiment) randomly selected from each test condition (cultivar or site) was placed into a mating tube (100 × 15 mm diameter) with a single 1- or 2-day-old standardized virgin female, and the pair were observed until mating took place, or for a maximum of 4 h in the absence of mating. The male was returned to the pupation tube after mating or at 4 h, and held under the same conditions as for moth maintenance, with water provided *ad libitum*. This process was repeated 24 h later in a new mating tube, and the procedure was repeated sequentially until the death of the male. A mating was considered to have been successful if a sperm-filled spermatophore was observed in the bursa copulatrix of the female. Matings in which males failed to transfer a spermatophore (if no spermatophore was found in the bursa copulatrix of the female, or if the

female lay no eggs during her life following the observed mating) were discarded from the analysis. Various reproductive traits were measured in each subsample.

First subsample: precopulatory behavior of males and females as a function of male origin and mating history

For the first subsample the male and female sexual activity was videotaped (Sony HDR CX220E) until mating; only recordings of successful matings (with effective spermatophore transfer or female egg laying) were analyzed. The latency period prior to mating (the time elapsed from male/female pairing until coupling) and the duration of each mating (time during which we observed a mating couple) were recorded along with the occurrence of four behaviors reflecting female and male sexual motivation (as described by Muller et al. 2015). In *L. botrana* a female that is ready to mate signals readiness by releasing sex pheromone at dusk, which is an action that represents a fitness cost (Harari et al. 2011). To do this the female assumes a calling position with wings raised and the pheromone gland exposed. This behavior reflects the penchant of a female to mate, and therefore we used it as a proxy of female motivation. Thus, we recorded data on: (i) the latency period to calling (time elapsed from pairing until the female initiated calling); and (ii) the female motivation to mate (expressed as the time a female spent calling divided by the courtship duration $\times 100$). To evaluate mating ability and sexual vigor of males in courtship we also recorded data on: (iii) the percentage of male activity (the time spent in movement by the male expressed as a percent of the total courtship period); and (iv) the number of male mating attempts, corresponding to curving of the abdomen and touching of the female abdomen without successful copulation.

First subsample: reproductive performance as a function of male origin and mating history

Immediately following mating the females were anesthetized (-25°C for 10 min), then dissected on a glass slide. The bursa copulatrix containing the male spermatophore was removed and measured. The spermatophore produced by *L. botrana* males is very small (< 1 mg) and consequently difficult to weigh accurately. We estimated the spermatophore size by extrapolating its volume; this is a well-established method used for small moths including *L. botrana* (Torres-Vila et al. 1999, Muller et al. 2015). The spermatophore length (l), width (w), and thickness (t) were measured using a stereomicroscope (Nikon SMZ1500) at a magnification of $20\times$, and the spermatophore volume was estimated as an ellipsoid balloon [$V = \pi/6 (l \times w \times t)$], as described previously (Torres Vila et al. 1999, Muller et al. 2015). In common with all Lepidoptera, male *L. botrana* transfer fertile eupyrene sperm and non-fertile

anucleate apyrene sperm at mating. The sperm-containing ampulla was ruptured in a drop of distilled water and the sperm mass was gently stirred to ensure dispersion. In Lepidoptera at this stage the eupyrene sperm are encysted in bundles, and each bundle contains 256 eupyrene sperm (Virkki 1969, Cook & Gage 1995). The number of intact bundles was counted at 40×/0.65 magnification using a Nikon Eclipse E600 microscope; this number was multiplied by 256 to estimate the total number of eupyrene sperm. The solution was then washed from the slide into a 1.5 mL centrifuge tube and diluted with distilled water. Four subsamples (10 µL) were removed from the diluted sperm solution, and the number of apyrene sperm was counted by microscopy (Nikon Eclipse E600; 100× magnification). The total number of apyrene sperm was estimated by multiplying the average sperm count for the four subsamples (coefficient of variation = 12%) by the dilution factor.

We recorded: (i) the total number of matings by males during their lifespan; (ii) male longevity; (iii) the lifetime spermatophore quantity produced; (iv) the lifetime number of eupyrene and apyrene sperm transferred; (v) the spermatophore volume; and (vi) the number of eupyrene and apyrene sperm transferred at each male mating.

Second subsample: male origin and mating history consequences for female reproductive output

Following mating (see general mating procedure) the females were held in the mating tube and could oviposit freely on the inside surface of the glass tub. Female survival was checked daily, and following death the eggs were incubated for 7 days under the same conditions as for moth maintenance. We recorded several female traits as a function of male larval origin (cultivar or site) and mating history, including: (i) the latency period to first oviposition; (ii) the lifetime number of eggs obtained by males (iii) the number of offspring sired by males during their lifetime; (iv) fecundity (the number of eggs laid per female at each mating); (v) female fertility (the proportion of hatched eggs for each mating); and (vi) female longevity.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using R Software version 3.2.0 (R Core Team 2015). For each analysis we report the full model with insignificant interactions deleted, following the approach of Forstmeier & Schielzeth (2011). The effect of male origin (cultivar and site) on male pupal mass was tested using a one-way ANOVA followed by Tukey's test. A cox regression was applied to assess the influence of male origin and pupal mass on male longevity. We used Pearson's χ^2 tests to assess the mating success of males (percentage of

successful matings) as a function of larval origin (cultivar and site) and mating history. Sources of variation in the total number of matings by males during their lifetime, the lifetime quantity of spermatophore produced by males, and female fecundity were identified using ANCOVAs, with male larval origin as the explanatory variable, and the number of male matings and the male and female pupal masses as covariates. Because the sperm were counted and were over-dispersed, a generalized linear model with a negative binomial distribution (NBGLM) was used to evaluate the effect of male origin on the total number of apyrene and eupyrene sperm transferred by males during their lifetime.

We used a general mixed model with male identity as a random effect to assess the combined effects of male mating history and larval origin on precopulatory behavior, the spermatophore size, the number of eupyrene and apyrene sperm, and the female fecundity and fertility. Male mating history was recorded as a categorical variable (1, 2, 3, 4, or 5 matings); the data for the previous 5, 6 and 7 matings were excluded because the sample size was too small for certain male origins (< 5 individuals). Because of heteroscedasticity, female motivation to mate (percent of time spent in the calling position) and male activity (percent of time spent in movement) were arcsine square root transformed prior to analysis. The latency period prior to mating, the duration of mating, the male activity, the female latency period prior to calling, and the motivation to mate were analyzed using general linear mixed models. Because data on sperm and male mating attempts were best approximated by an over-dispersed Poisson distribution, we fitted the model with a negative binomial error structure and used the glmmADMB library to perform the analysis, which included male mating history and male larval origin as fixed effects, male and female mass as covariates, and male identity as a random factor. The proportion of eggs hatched was analyzed using the glmmPQL function with a quasi-binomial error structure. A cox regression was applied to assess the influence of male origin, male mating history, and female fecundity on female longevity.

RESULTS

Male pupal mass, longevity, and mating success

Male pupal mass was affected by male larval origin (Table 1; $F_{4,181} = 20.63$, $p < 0.0001$). Males from Mourvèdre in the Perpignan vineyard were larger than those from Carignan (Table 1). Among sites, the males from Grenache in Estézargues and Sénas were heavier than those from this cultivar in Perpignan. Male longevity was also influenced by the origin of the males ($\chi^2_{4,181} = 23.23$, $p < 0.0001$), and was positively correlated with male pupal mass ($\chi^2_{1,181} = 26.02$, $p < 0.0001$) (Table 1). In Perpignan the males from Carignan died earlier than males from

Grenache and Mourvèdre. However, the longevity of males from Grenache in Perpignan was similar to that of males from Grenache in Estézargues or Sénas. As a consequence of differing longevity, males did not have the same number of mating opportunities over their lifetimes. Consequently, male mating capacity (i.e. the maximum number of matings that males undertook during their lifetimes) was positively correlated to male longevity ($F_{1,179} = 188.01$, $p < 0.00001$). For example, in a given vineyard the males from Carignan lived an average of 6 days, and tended to mate less often than males from Grenache or Mourvèdre, which lived for more than 7 days (Table 1 and Fig. 1). Moreover, among the males from Grenache in Sénas and Estézargues (which lived the longest), 50–75% mated 5 or more times during their lifetime, while only 30% of the males from Grenache in Perpignan mated at least 5 times (Table 1 and Fig. 1). The mating success of males was relatively high (range 72.7–100%), and was not affected by male larval origin or mating history (Table 2).

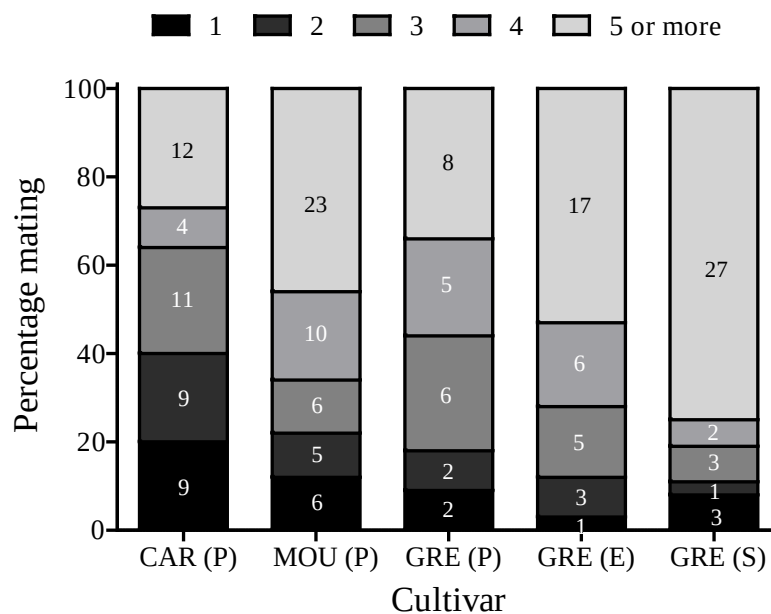


Figure 1. Percentage of *L. botrana* males having n mating events (from 1 to > 5) with a different female each day during their lifetime, as a function of male origin (cultivar and site). Numbers inside bars are the sample sizes.

Latency period to mating, mating duration, and precopulatory behavior

The latency period prior to mating was affected by male mating history (Fig. 2a; LR = 28.50, $p < 0.0001$) but not by male larval origin, or male or female pupal mass (LR = 5.06, $p = 0.281$, LR = 0.16, $p = 0.689$, and LR = 0.82, $p = 0.366$, respectively). The mating of males occurred sooner for the first mating relative to the third or fourth mating (Fig. 2a). Moreover, the mating duration differed markedly among matings (Fig. 2b; LR = 456.19, $p < 0.0001$) and was affected by male larval origin (Fig. 2b; LR = 20.34, $p < 0.0001$) but not by the male or female pupal mass (LR = 2.60, $p = 0.106$ and LR = 0.51, $p = 0.476$, respectively).

Table 1. Traits of *L. botrana* males having different larval origins (cultivar and site). The capital letters in brackets correspond to the various sites: (P) Perpignan, (S) S  nas, and (E) Estézargues. In each column, values having different uppercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Cultivar	Male pupal mass (mg)	Male longevity (days)	Male number of matings	Male lifetime reproductive investment & reproductive output			
				Total spermatophore quantity (mm ³ .10 ⁻⁶)	Total number of eupyrene sperm	Total number of apyrene sperm	Total number of eggs
Carignan (P)	5.1 ^a [4.9 ; 5.3]	6.0 ^a [5.5 ; 6.5]	3.3 [2.8 ; 3.8]	96.6 ^a [80.87 ; 116.3]	4665 [4821 ; 7829]	72467 [50988 ; 108750]	336 ^a [255 ; 417]
Mourvèdre (P)	5.5 ^b [5.4 ; 5.7]	7.6 ^b [7.0 ; 8.2]	4.3 [3.7 ; 4.9]	125.0 ^a [111.3 ; 139.9]	6118 [4877 ; 7322]	91609 [74296 ; 108750]	282 ^b [230 ; 334]
Grenache (P)	5.3 ^{ab} [5.0 ; 5.5]	7.3 ^b [6.6 ; 8.0]	3.9 [3.3 ; 4.6]	132.7 ^b [111.5 ; 155.1]	6315 [4877 ; 7829]	75497 [57205 ; 93589]	392 ^a [292 ; 493]
Grenache (E)	6.2 ^c [5.9 ; 6.4]	8.2 ^b [7.6 ; 8.8]	4.9 [4.2 ; 5.6]	177.2 ^b [145.0 ; 212.9]	8363 [6763 ; 10112]	80340 [65881 ; 96104]	554 ^a [464 ; 643]
Grenache (S)	6.2 ^c [6.0 ; 6.5]	8.6 ^b [8.0 ; 9.1]	5.4 [4.8 ; 6.1]	197.8 ^b [168.5 ; 226.5]	7950 [6371 ; 9571]	87093 [73264 ; 101928]	620 ^a [534 ; 704]

Table 2. Mating success (%) as a function of male larval origin (cultivar and site) and mating history (the first to the fifth mating).

Cultivar	N	Mating success for each male mating history					χ^2_4	P
		1	2	3	4	5		
Carignan (P)	49	91.8%	87.8%	90.0%	80.0%	92.3%	0.79	0.940
Mourvèdre (P)	53	94.3%	88.0%	92.9%	89.2%	95.8%	2.32	0.678
Grenache (P)	26	88.5%	87.5%	100%	92.9%	72.7%	5.75	0.218
Grenache (E)	35	91.4%	100%	90.3%	92.0%	80.9%	6.02	0.198
Grenache (S)	39	92.3%	89.2%	97.0%	90.6%	96.4%	2.41	0.661
χ^2_4		0.85	4.13	3.14	2.19	7.61	-	-
P		0.931	0.388	0.534	0.699	0.107	-	-

The duration of the first and second matings was shorter for males than the duration of subsequent matings (Fig. 2b). Furthermore, males from Grenache in Estézargues copulated for longer than males from Mourvèdre and Carignan in Perpignan, but no geographical effect was found for the mating duration among males from Grenache from the three sites, and no cultivar effect was found between males from the different cultivars at Perpignan (Fig. 2b).

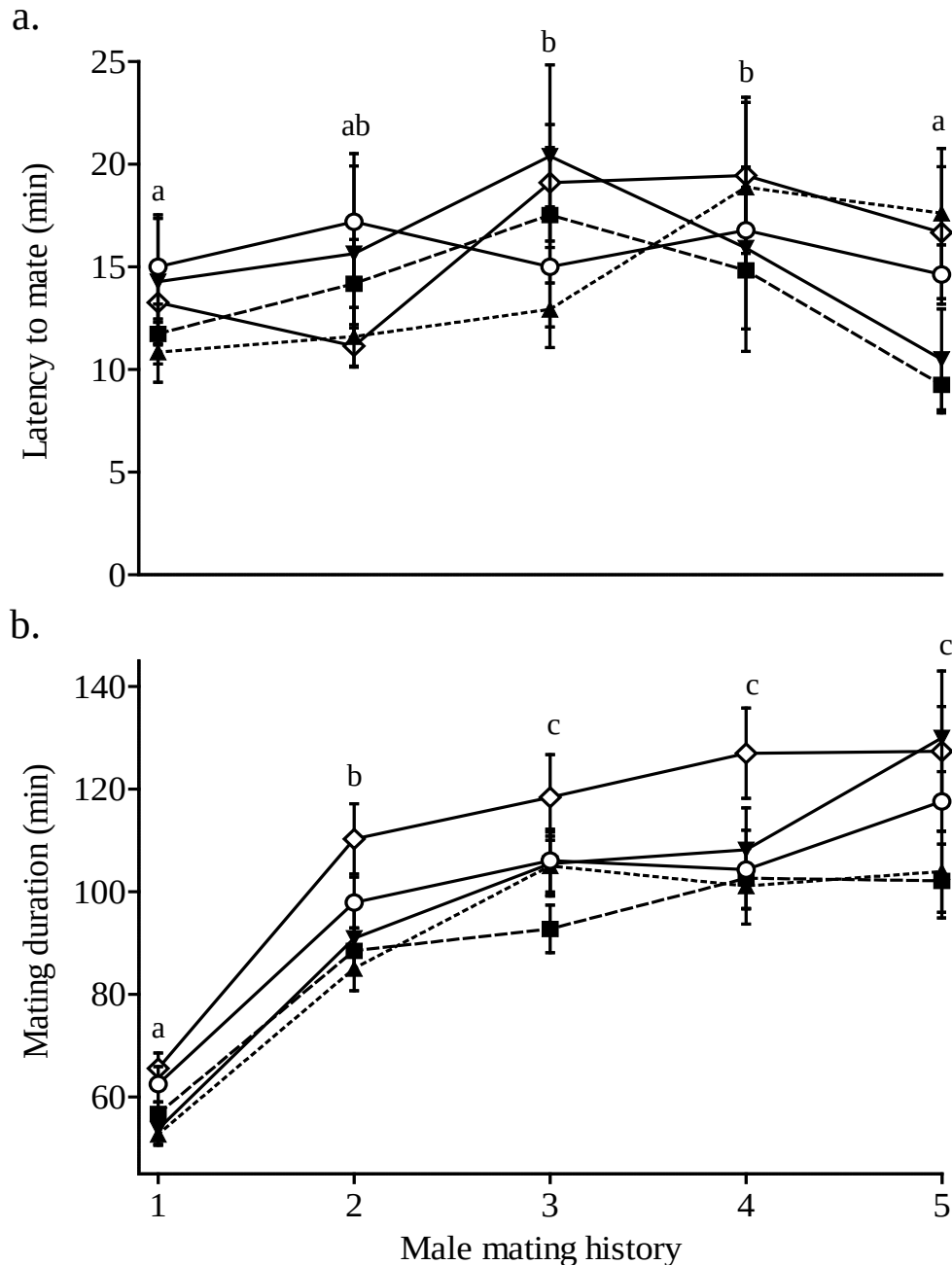


Figure 2. Mean $\pm$ SEM of (a) the latency period to mating and (b) the mating duration for *L. botrana* males, as a function of their mating history (the first to the fifth mating) and larval origin (cultivar and site). Black squares and dashed line: Carignan in Perpignan; black downward triangles and short full line: Grenache in Perpignan; black upward triangles and dotted line: Mourvèdre in Perpignan; white circles and full line: Grenache in Sénas; and white diamonds and full lines: Grenache in Estézargues.

Male activity (expressed as the proportion of time a male spent in activity divided by the latency period prior to mating) was not influenced by male larval origin (LR = 4.81, $p = 0.308$). Regardless of their larval origin, males spent on average between 41.9% (males from Mourvèdre) and 55.5 % (males from Grenache) of their time in courtship. Moreover, the time spent in courtship was not dependent on male mating history (LR = 4.19, $p = 0.381$), ranging from 37.4% (5th mating) to 50.3% (2nd mating) of male courtship activity. However, in females the latency period prior to calling was affecting by the male mating history (Fig. 3a; LR = 53.37, $p < 0.0001$) and male larval origin (Fig. 3a; LR = 14.18, $p = 0.007$).

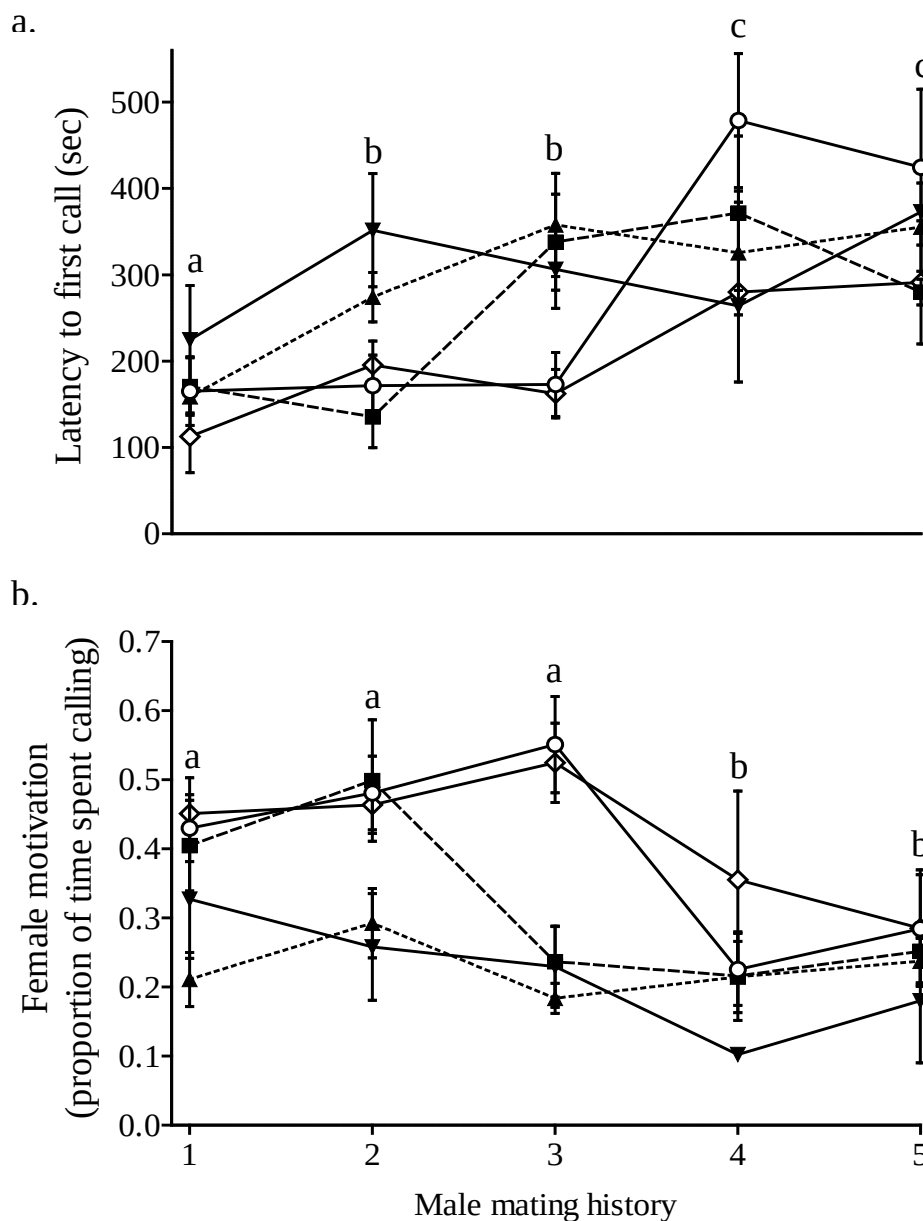


Figure 3. Mean $\pm$ SEM of (a) the latency period to calling and (b) the motivation to mate for *L. botrana* females mated with males of different larval origin (cultivar and site), as a function of their mating history (the first to the fifth mating). Symbols and lines as for Figure 2.

Females in the presence of virgin males called significantly earlier than females with non-virgin males (irrespective of their number of matings). Moreover, females in the presence of males from Grenache in Estézargues called sooner than those with males from Grenache in Perpignan. Female motivation to mate (i.e. the proportion of time spent calling expressed as the time spent calling divided by the timing of onset of mating) was also affected by the male larval origin (Fig. 3b; LR = 39.85, $p < 0.0001$) and male mating history (Fig. 3b; LR = 17.47, $p = 0.0016$). Females were more motivated to mate with virgin males or males that had mated once compared with males that had mated 4 or 5 times (Fig. 3b). At a given site, females in the presence of males from Mourvèdre were less motivated to mate (calling from 18 to 24% of the time according to male mating history) than females mated with males from Carignan (calling from 22 to 50% of the time depending on male mating history). Among the sites, females paired with males from Grenache in Perpignan spent less time in the calling position than females paired with males from Grenache in Estézargues or Sénas. There was no effect of male origin or male pupal mass on the number of mating attempts required for successfully mating with a female (origin effect: LR = 2.422, $p = 0.6586$; pupal mass effect: LR = 3.4701, $p = 0.0625$), but male mating history markedly affected the number of male mating attempts (Fig. 4; LR = 48.44, $p < 0.0001$). Virgin males had more mating attempts before successfully mating with a female than males that had already mated once or twice. However, at their fifth mating males had more mating attempts than males at their second or third matings (Fig. 4).

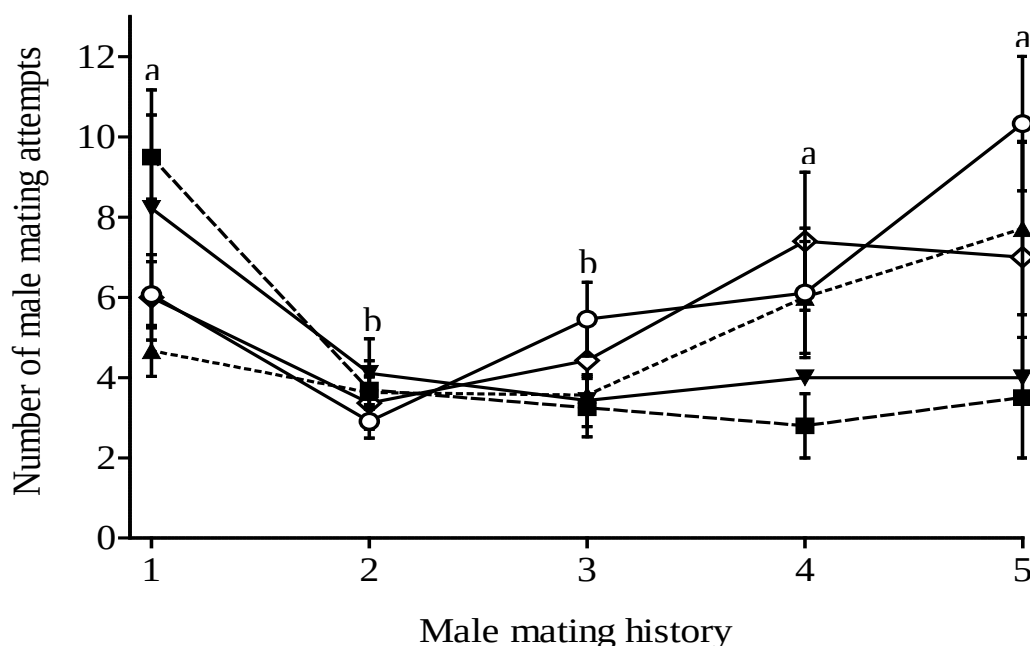


Figure 4. Mean $\pm$ SEM of mating attempts for *L. botrana* males as a function of their mating history (the first to the fifth mating) and larval origin (cultivar and site). Symbols and lines as for Figure 2.

Male lifetime reproductive investment

The overall spermatophore quantity produced by males during their lifetime varied with the total number of matings ($F_{1,73} = 146.36$, $p < 0.0001$), the host plant origin ($F_{4,73} = 9.76$, $p < 0.0001$), and the pupal mass ($F_{1,73} = 17.86$, $p < 0.0001$) (Table 1). At a given site, males from Grenache transferred a greater quantity of spermatophore to females at mating (average $132.7 \times 10^{-6} \text{ mm}^3$) than males from Carignan (approximately $96.6 \times 10^{-6} \text{ mm}^3$) or Mourvèdre (approximately $125 \times 10^{-6} \text{ mm}^3$). However, males from the three geographically distinct sites transferred approximately the same quantities of spermatophore during their lifetimes. The numbers of eupyrene and apyrene sperm were positively correlated with the number of male matings ($F_{1,73} = 57.34$, $p < 0.0001$ and $F_{1,73} = 16.76$, $p = 0.0001$, respectively), but were not correlated with the male larval origin ($F_{4,73} = 1.87$, $p = 0.1246$ and $F_{4,73} = 0.53$, $p = 0.7134$, respectively) or the pupal mass ($F_{1,73} = 1.44$, $p = 0.2344$ and $F_{1,73} = 1.17$, $p = 0.2826$, respectively) (Table 1).

The total number of eggs derived from male matings during their lifetimes was influenced by male mating number and larval origin (Fig. 5 & Table 1; interaction term: $F_{4,95} = 2.64$, $p = 0.0382$; number of male matings: $F_{1,95} = 169.41$, $p < 0.0001$; male larval origin: $F_{4,95} = 13.62$, $p < 0.0001$) but not by male pupal mass ($F_{1,95} = 0.61$, $p = 0.4349$).

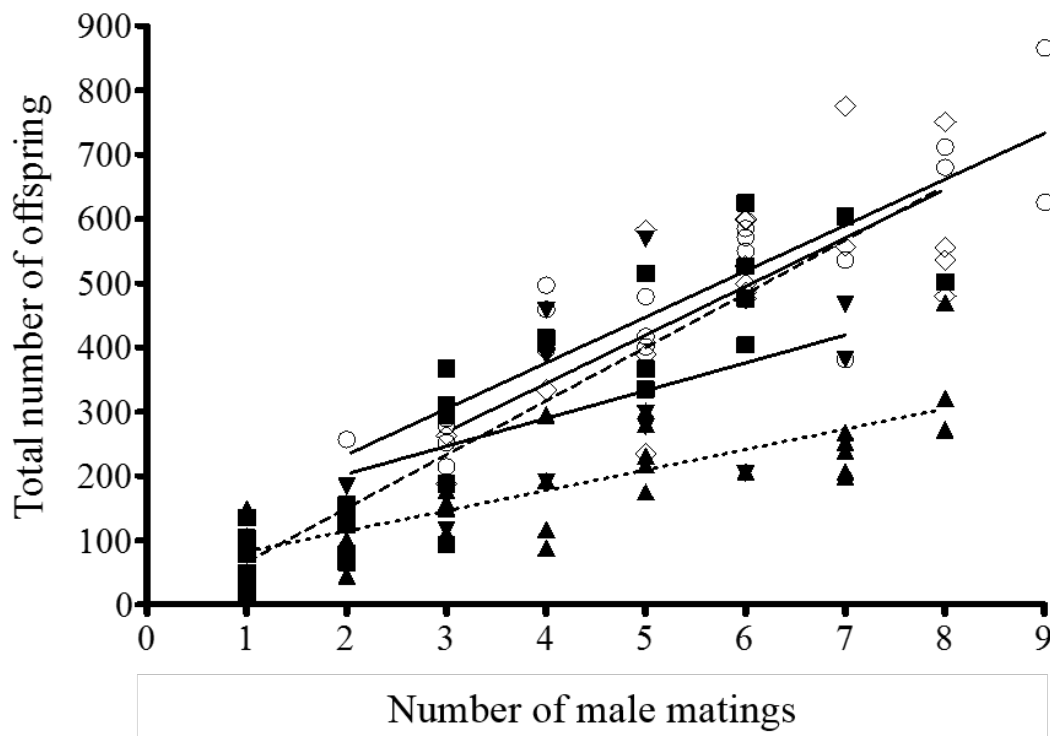


Figure 5. Lifetime number of offspring sired by *L. botrana* males, as a function of the number of male matings. Symbols and lines as for Figure 2.

In a given vineyard, males from Mourvèdre always produced the least quantity of spermatophore, which reduced the egg production compared with the two other cultivars (Table 1). However, for males from Grenache there was no effect of geographical location on the number of eggs derived from male matings, which is consistent with the observation that these males produced the same amount of spermatophore during their lifetimes. Moreover, the number of offspring derived from males during their lifetime was influenced by the number of male matings and the male larval origin (Fig. 5; interaction term: $F_{4,95} = 5.97$, $p = 0.0002$; male mating number effect: $F_{1,95} = 151.73$, $p < 0.0001$; male larval origin: $F_{4,95} = 21.46$, $p < 0.0001$), but not by the male pupal mass ($F_{1,95} = 1.25$, $p = 0.2657$). Males from Mourvèdre in Perpignan produced fewer offspring than males from the two other cultivars, and there was no geographical effect on the number of offspring sired by males.

Male reproductive investment over successive matings

The volume of spermatophore transferred to the female at each mating (from the first to the fifth mating) was affected by the male mating history (Fig. 6a; LR = 1548.74, $p < 0.0001$) and the male larval origin (Fig. 6a; LR = 43.07, $P < 0.0001$). It was positively correlated with male pupal mass (LR = 26.20, $p < 0.0001$) but not with female pupal mass (LR = 1.85, $p = 0.1742$). The spermatophore produced by males at their first mating was 3–5 times larger than spermatophores transferred during subsequent matings, irrespective of the male larval origin (cultivar or site), and the fifth spermatophore was smaller than spermatophores produced at the second and third matings (Fig. 6a). At Perpignan the males from Carignan produced significantly smaller spermatophores than males from the two others cultivars, but there was no geographical effect on the spermatophore volume produced by males from Grenache among the three geographically distinct sites. The numbers of eupyrene and apyrene sperm produced by males were also affected by male mating history (Fig. 6b and 6c, respectively; eupyrene sperm: LR = 76.44, $p < 0.0001$; apyrene sperm: LR = 105.94, $p < 0.0001$). However, the numbers of eupyrene or apyrene sperm were not influenced by male larval origin (eupyrene sperm: LR = 5.48, $p = 0.2415$; apyrene sperm: LR = 2.08, $p = 0.721$) or by male pupal mass (eupyrene sperm: LR = 0.42, $p = 0.5169$; apyrene sperm: LR = 0.68, $p = 0.4096$). Males transferred more eupyrene and apyrene sperm during their first mating compared with their subsequent matings, and also transferred more sperm during their second mating compared with their fifth mating (Fig. 6b and 6c).

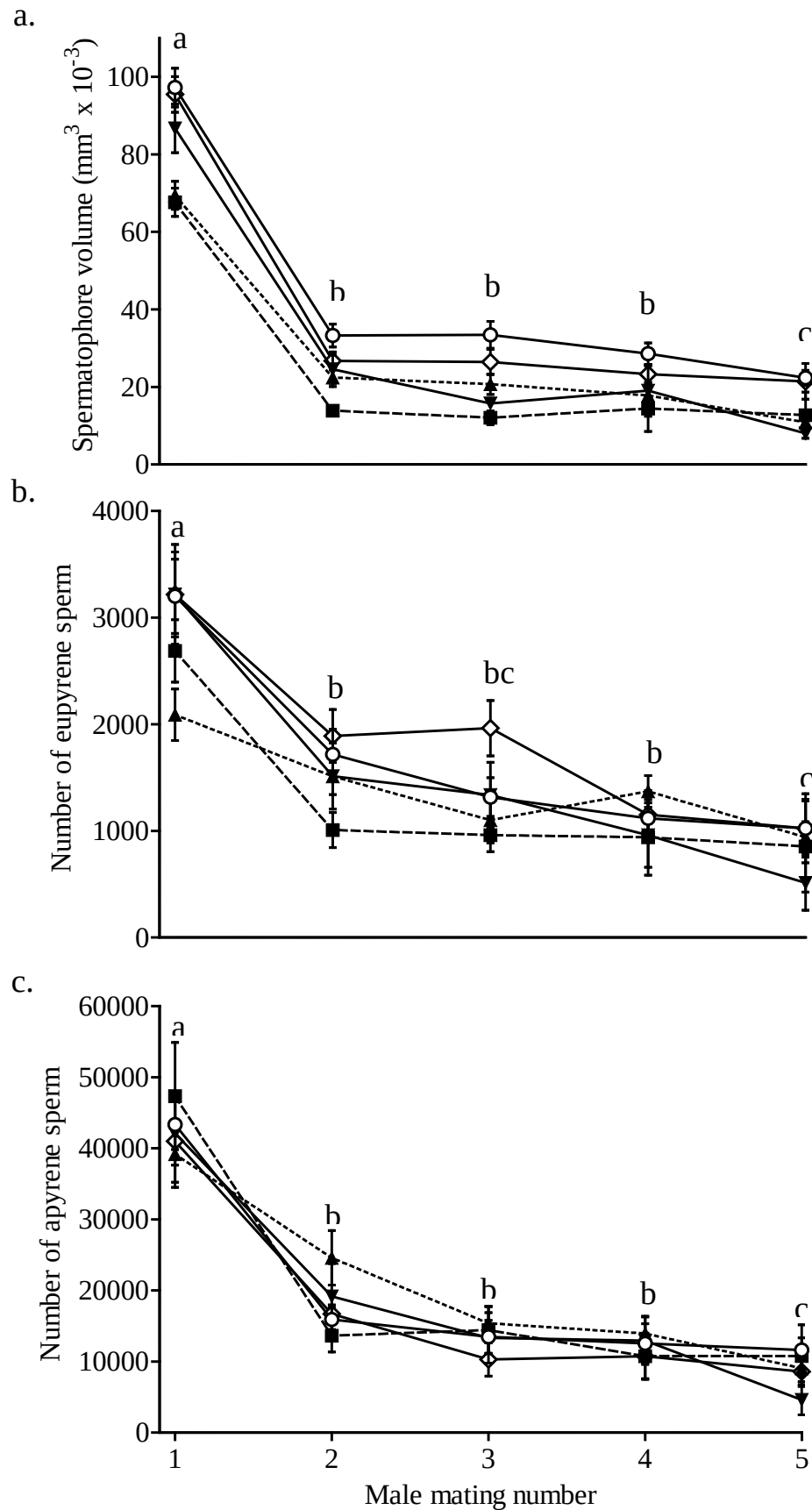


Figure 6. Mean $\pm$ SEM of (a) the spermatophore volume, (b) the number of eupyrene sperm, and (c) the number of apyrene sperm for *L. botrana* males of different larval origin (cultivar and site), as a function of their mating history (the first to the fifth mating). Symbols and lines as for Figure 2.

Consequences for the reproductive output of females

The number of eggs laid by a female at each mating strongly depended on the male mating history (Fig. 7a; LR = 99.53, $p < 0.0001$) and larval origin (LR = 47.74.65, $p < 0.0001$). It was also positively correlated with the female pupal mass (Fig 7a; LR = 34.65, $p < 0.0001$) but not the male pupal mass (LR = 2.76, $p = 0.0969$). At Perpignan, females mated to males from Mourvèdre laid significantly fewer eggs than females mated to males from the other two cultivars, but there was no geographical effect on the fecundity of females mated with males from Grenache at the three geographically distinct sites.

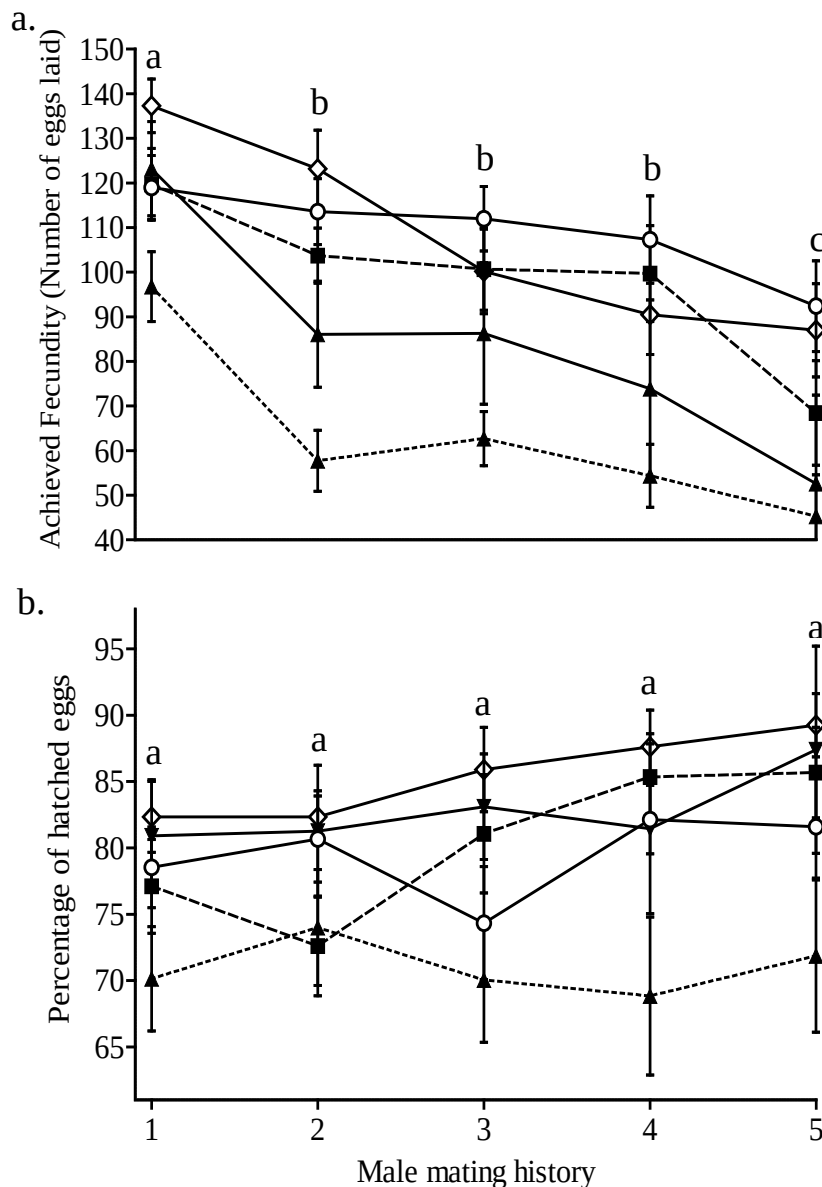


Figure 7. Mean $\pm$ SEM of (a) the female fecundity (number of eggs laid) and (b) the female fertility (percent of eggs hatched) mated with males of different larval origin (cultivar and site) and males having different mating histories (the first to the fifth mating). Symbols and lines as for Figure 2.

Moreover, females that had copulated with virgin males (first mating) had a lower level of fecundity than females mated to non-virgin males (subsequent matings), and females mated to males that had mated four times previously laid fewer eggs than females mated with males that had mated once or twice (Fig. 7a). Female fertility was positively correlated with male larval origin (Fig. 7b; LR = 35.38, $p < 0.0001$) and female pupal mass (LR = 7.77, $p = 0.0053$), but did not depend on male mating history (Fig. 7b; LR = 1.74, $p = 0.7835$) or male pupal mass (LR = 2.71, $p = 0.0998$), suggesting that males provide female with sufficient sperm to fertilize the same proportion of eggs over five successive matings. The longevity of females was strongly negatively correlated to female fecundity ($\chi^2_{1,421} = 31.63$, $p < 0.0001$), and was affected by male larval origin ($\chi^2_{4,421} = 9.57$, $p = 0.048$) but not male mating history ($\chi^2_{4,421} = 8.09$, $p = 0.0883$) or male pupal mass ($\chi^2_{1,421} = 2.51$, $p = 0.1132$). Females mated with males from Grenache in Sénas lived for a shorter period (9.9 days average; range 9.5–10.3 days) than females mated with males from Grenache in Estézargues (10.4 days average; range 9.8–11.0 days) or Perpignan (12.0 days average; range 11.4–12.6 days). However, there was no difference in the longevity of females mated with males from Carignan (10.6 days average; range 10.2–11.1 days), Grenache (see above), and Mourvèdre (11.4 days average; range 10.9–11.8 days).

DISCUSSION

We found that the lifetime reproductive output of males was constrained by mating opportunities, and was also closely linked to their larval stage nutrition. The number of offspring sired by males over their lifetime was highly dependent on male longevity and mating capacity. Male reproductive investment decreased over successive matings, and was largely affected by male larval nutrition on the different grape cultivars and among geographically distinct sites. The male spermatophore volume and the number of sperm in each ejaculate decreased from the first to subsequent matings, and these parameters were affected by the cultivar on which the male larvae were reared. These factors had major repercussions for female reproductive output. Females mated with virgin males (i.e. their first mating) had a greater fecundity than females mated with non-virgin males (i.e. their subsequent matings), regardless of the male larval origin. Thus, females were more motivated to mate with virgin males having high sperm quality than with non-virgin males, which transferred less nutritive substances and fewer sperm at mating. Moreover, females mated with males producing the largest spermatophore and more sperm (e.g. males from Grenache) also had greater fecundity and fertility than females mated with males producing small

spermatophores and less sperm (e.g. males from Mourvèdre) across different mating ranks and females were less motivated to mate with the ‘lower quality’ males from Mourvèdre. Our results suggests that ‘male quality’ depended on both male larval origin and mating history, and had major consequences for female reproductive output. Moreover, females were able to discriminate among these males, and to receive large direct benefits were more motivated to mate with males having high sperm quality (virgin males or males from certain cultivars or geographical locations).

For each mating opportunity, the mating success (i.e. the probability of a male acquiring a mate) of males did not vary according to their larval origin, and remained high and constant over successive matings [min: 80%; max: 100%], suggesting that almost all males had a non-limited mating capacity until their death (based on an inter-mating recovery period of 24 h). However, their larval origin and pupal mass strongly influenced male longevity, with small males reared on Carignan in Perpignan living for a shorter period than large males from Grenache; consequently, these males had fewer mating opportunities over their lifetime *in natura*. This may be partly related to the pupal mass because smaller males have less energy reserves than larger males (Muller, unpublished data), and cannot afford to invest in both somatic maintenance and reproductive effort (Boggs & Freeman 2005, Boggs 2009). Indeed, males in good condition may be better competitors and have generally better mating success than males in poor condition, without incurring any survival cost (Grandison et al. 2009, Engqvist 2011, Albo et al. 2014). We found that the number of male matings was positively related to male longevity: the longer a male lived, the better its chance of reproducing several times (Molleman et al. 2009). Our results suggest that males from Grenache in Estézargues and Sénas were in the best condition, investing in both somatic maintenance (lived for > 8 days) and reproduction (had the largest number of copulations).

The latency period to mating significantly increased with increasing number of matings, with non-virgin males that had already mated twice or more times taking 20–25% more time to mate than virgin or once-mated males. This suggests that after their third mating, males needed more time to successfully mate. This may be because of cumulative fatigue resulting from successive mating, or because the females were able to detect that these males were potentially sperm-depleted, and were more reluctant to mate with them. Analysis of the precopulatory behavior of each sex suggested that the amount of time required to mate by experienced males was not merely a result of cumulative fatigue, because males were equally active during courtship regardless of their mating history. Thus, the longer latency period

prior to mating for non-virgin males was probably the result of female reluctance to mate with previously mated males. Indeed, females were more motivated to mate with virgin males than with non-virgin males, and called virgin males earlier than non-virgin males. In a recent study of *L. botrana* involving mate-choice experiments, we demonstrated a female preference for virgin males, which maximized the direct benefits associated with receiving large spermatophores (Muller, unpublished data). These findings suggest that females are able to discriminate among males based on male mating experience, probably using multiple cues, as demonstrated in various insect species (Harris & Moore 2005, Costanzo & Monteiro 2007). For example, it is possible that non-virgin males are permeated with female substances at their first mating, and that females use these chemical cues to recognize and avoid non-virgin males. In Perpignan we found that female motivation varied with male origin, with females being less motivated (spent less time in the calling position) to mate with males having lower sperm quality (those reared on Mourvèdre) than males from the other cultivars, suggesting that the females used other cues (perhaps chemical fingerprints of males having different host origins) that provided information on male condition, and therefore sperm quality. Female motivation to mate may also be based on male pupal mass, because we found that females were more motivated to mate with larger males from Grenache in Estézargues and Sénas than with the smaller males from Grenache in Perpignan; by mating with larger rather than smaller males, the females obtained larger spermatophores, and hence greater direct fitness benefits. However, this assumption cannot be generalized at the cultivar scale, as male pupal mass did not reflect sperm quality (e.g. small males from Carignan transferred rich-nutrient spermatophores that increased female fecundity). As in other lepidopteran species (Bissondath & Wiklund 1996), the mating duration increased by 40–50% at successive matings. This prolonged copulation may be a physiological effect, or may reflect mate guarding to deny other matings with the female during the same day (*in copula* guarding hypothesis; Alcock et al. 1993). The adaptive value of prolonged copulation in *L. botrana* and the reasons for this behavior should be further explored.

Our findings revealed that male reproductive investment markedly decreased with increasing number of copulations, which was largely because of male inability to replenish resources in the adult stage. Between the first and subsequent matings of males, there was a > 60% decrease in spermatophore volume, confirming that male spermatophore production is very costly (Vahed 1998). Thus, in *L. botrana* and more generally in capital breeder species, males have only a single nutrient-rich spermatophore, which is produced using energy reserves derived from larval nutrition. Consequently, the evolution of some degree of male mate choice in this

system is expected (Bonduriansky 2001). We previously demonstrated in a laboratory strain of the usually monandrous *L. botrana* that the first spermatophore of males plays a crucial role in female egg production (Muller et al., unpublished data), and the present study confirms this finding in wild populations of *L. botrana*. This is consistent with the general assumption that male multiple mating can result in the depletion of specific ejaculate components, resulting in decreased fecundity and fertility of their mates (Pérez-Staples et al. 2008, Wigby et al. 2009). However, our results also indicate that the second spermatophore delivered by *L. botrana* males was 66–80 % smaller than the first (according to their larval origin) but the fecundity of the female mated to a once-mated male decreased by only 5–40% according to male larval origin. This suggests that spermatophore size may not be a reliable predictor of female fecundity, and that the quality of the spermatophore rather than its quantity might better explain the variation observed in female fecundity (Marshall & McNeil 1989, Bissondath & Wiklund 1996, Muller et al. 2015). Both the number of sperm and/or the composition of the ejaculate (e.g. accessory gland secretions) can affect female fecundity (reviewed by Perry et al. 2013), and we recently found that protein-derived spermatophores are a key factor in female reproductive output (Muller et al., unpublished data).

The numbers of apyrene and eupyrene spermatozooids transferred at mating were not affected by male larval origin or male pupal mass, but decreased with increasing number of matings. Eupyrene and apyrene spermatogenesis is known to occur at different stages during moth development (Friedlander 1997, Friedlander et al. 2005). Eupyrene spermatogenesis typically begins during the later larval instar stages and ceases at pupation, while apyrene spermatogenesis usually starts just prior to pupation and continues throughout adulthood. All the *L. botrana* males sampled in this study emerged with a finite number of eupyrene sperm, and the males did not release all sperm during the first mating, but retained some for future mating opportunities, ensuring fertilization of the same proportion of female eggs over consecutive matings. However, female fertility was affected by male larval origin, with females mated with males from Mourvèdre having reduced fertility compared with females mated with males from Grenache or Carignan. Males from Mourvèdre were likely to have low quality sperm, and although they transferred the same number of eupyrene sperm as males from the other cultivars, they were not able to fertilize > 70% of female oocytes, regardless of their mating history. As with the spermatophore volume, the quantity of sperm (which is always in excess compared with the number of eggs) is probably a minor factor relative to its quality (Snook 2005, Werner & Simmons 2008). Numerous sperm traits that

contribute to paternity (including sperm size, viability, and mobility) are known to influence fertilization efficiency in moths (Morrow & Gage 2000, Perry et al. 2013), and as has been demonstrated in other moth species (Gage & Cook 1994, Cordes et al. 2014), in *L. botrana* may be influenced by male larval food composition.

In addition to providing nutritional resources for the females, spermatophores may also be viewed as mating plugs that can delay or prevent successful subsequent female matings (Morrow & Gage 2000). Numerous studies have shown that larger ejaculates containing high levels of apyrene sperm reduce female post-mating receptivity (Simmons 2001, Kelly & Jennions 2011), and that monandrous females mated with virgin males usually do not mate again, while females first mated with non-virgin males exhibit a high degree of motivation to mate again (Torres-Vila & Jennions 2005, Muller et al. unpublished data). In *L. botrana* males the first ejaculate contains two to three time more apyrene sperm than subsequent ejaculates, and the disproportionate number of anucleate sperm could delay female re-mating and so, as demonstrated in other moth species (Cook & Wedell 1999), reduce the potential for sperm competition. Further studies on the influence of male mating history and larval nutrition on the propensity of females to re-mate are needed to evaluate the relative roles of these factors in the dynamics of female reproduction in this pest insect.

In summary, male reproductive investment declined with increased number of mating events, (suggesting that spermatophores are energetically expensive to produce in this monandrous capital breeding species), and females that received spermatophores from non-virgin males had reduced fecundity. In our model system, the reproductive potential of males was closely linked to their larval nutrition, which greatly influenced their longevity and therefore their mating capacity. Males reared on highly nutritive host plants had more energy reserves to invest in somatic maintenance and/or reproduction; such males are expected to outcompete smaller males reared on less nutritive host plants. A recent study of *L. botrana* demonstrated that the phenology of adult emergence was influenced by the grape variety (Thiéry et al. 2014), as males usually emerged before females, and this protandry was more or less marked according to the grape variety. Grape variety constraints on the level of protandry may influence the number of male mating opportunities, favoring males that emerge earlier. Our results highlight the overall importance of larval nutrition in male mating capacity and lifetime reproductive investment, all of which could modulate the reproductive strategies of this pest. Indeed, because males and females have non-trivial reproductive costs (Harari et al. 2011), the evolution of mate choice by both sexes in this monandrous species is to be expected.

Firstly, females that invest many resources in egg production would be expected to preferentially mate with high quality males (virgin males or males in good condition as a consequence of their larval nutrition) to obtain large direct benefits from mating (such as large and nutrient-rich spermatophores). Secondly, males are also expected to exhibit some mate choice, because spermatophore production is costly and they only produce one nutrient-rich spermatophore. The occurrence of mate choice by both sexes of this species should be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Guisset, L. Delbac, S. Motreuil, J. Oustric and D. Richy and for their valuable experimental assistance. This study was supported by the CNRS and grants from the ANR (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006). We also thank the Conseil Régional of Aquitaine, the Conseil Régional of Bourgogne, the Chambre d'Agriculture des Bouches-du-Rhône, du Gard and des Pyrénées-Orientales. The second author is associated with the Labex Cote research programme.

REFERENCES

- Andersson, M. B.** (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press, Princeton, USA
- Barnes, A. I., & Partridge, L.** (2003). Costing reproduction. *Animal Behaviour*, 66, 199-204.
- Arnqvist, G., & Danielsson, I.** (1999). Postmating sexual selection: the effects of male body size and recovery period on paternity and egg production rate in a water strider. *Behavioral Ecology*, 10, 358-365.
- Bateman, A. J.** (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2, 349-368.
- Bissoondath, C. J., & Wiklund, C.** (1996). Effect of male mating history and body size on ejaculate size and quality in two polyandrous butterflies, *Pieris napi* and *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Functional Ecology*, 10, 457-464.
- Boggs, C. L.** (2009). Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology*, 23, 27-37.
- Boggs, C. L., & Freeman, K. D.** (2005). Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia*, 144, 353-361.
- Bonduriansky, R.** (2001). The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews*, 76, 305-339.

- Choe, J. C., & Crespi, B. J.** (1997). *The evolution of social behaviour in insects and arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Cook, P. A., & Gage, M. J.** (1995). Effects of risks of sperm competition on the numbers of eupyrene and apyrene sperm ejaculated by the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36, 261-268.
- Cook, P. A., & Wedell, N.** (1999). Non-fertile sperm delay female remating. *Nature*, 397, 486-486.
- Cordes, N., Albrecht, F., Engqvist, L., Schmoll, T., Baier, M., Mueller, C., & Reinhold, K.** (2015). Larval food composition affects courtship song and sperm expenditure in a lekking moth. *Ecological Entomology*, 40, 34-41.
- Costanzo, K., & Monteiro, A.** (2007). The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274, 845-851.
- Damiens, D., & Boivin, G.** (2006). Why do sperm-depleted parasitoid males continue to mate?. *Behavioral Ecology*, 17, 138-143.
- Delisle, J., & Hardy, M.** (1997). Male larval nutrition influences the reproductive success of both sexes of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Functional Ecology*, 11, 451-463.
- Dewsbury, D. A.** (1982). Ejaculate cost and male choice. *The American Naturalist*, 119, 601-610.
- Eichhorn, K. W., & Lorenz, D. H.** (1977). Phanologische entwicklungsstadien der rebe. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*.
- Engqvist, L.** (2011). Male attractiveness is negatively genetically associated with investment in copulations. *Behavioral Ecology*, 22, 345-349.
- Friedländer, M.** (1997). Control of the eupyrene–apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. *Journal of Insect Physiology*, 43, 1085-1092.
- Friedländer, M., Seth, R. K., & Reynolds, S. E.** (2005). Eupyrene and apyrene sperm: dichotomous spermatogenesis in Lepidoptera. *Advances in Insect Physiology*, 32, 206-308.
- Forstmeier W, Schielzeth H.** 2011. Cryptic multiple hypotheses testing in linear models: overestimated effect sizes and the winner's curse. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65, 47-55.
- Gage, M. J. G., & Cook, P. A.** (1994). Sperm size or numbers? Effects of nutritional stress upon eupyrene and apyrene sperm production strategies in the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidea). *Functional Ecology*, 8, 594-599.
- Gillott, C.** (2003). Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*, 48, 163-184.

- Grandison, R. C., Piper, M. D., & Partridge, L.** (2009). Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature*, 462, 1061-1064.
- Harris, W. E., & Moore, P. J.** (2005). Sperm competition and male ejaculate investment in *Nauphoeta cinerea*: effects of social environment during development. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 474-480.
- Janowitz, S. A., & Fischer, K.** (2010). Costing reproduction: effects of mating opportunity on mating success in male *Bicyclus anynana* butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64, 1999-2006.
- Kelly, C. D., & Jennions, M. D.** (2011). Sexual selection and sperm quantity: meta-analyses of strategic ejaculation. *Biological Reviews*, 86, 863-884.
- Kokko, H., Brooks, R., Jennions, M. D., & Morley, J.** (2003). The evolution of mate choice and mating biases. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 653-664.
- Kotiaho, J. S., & Simmons, L. W.** (2003). Longevity cost of reproduction for males but no longevity cost of mating or courtship for females in the male-dimorphic dung beetle *Onthophagus binodis*. *Journal of Insect Physiology*, 49, 817-822.
- Lailvaux, S. P., & Kasumovic, M. M.** (2010). Defining individual quality over lifetimes and selective contexts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 278, 321-328.
- Marcotte, M., Delisle, J., & McNeil, J. N.** (2005). Impact of male mating history on the temporal sperm dynamics of *Choristoneura rosaceana* and *C. fumiferana* females. *Journal of Insect Physiology*, 51, 537-544.
- Marshall, L. D., & McNeil, J. N.** (1989). Spermatophore mass as an estimate of male nutrient investment: a closer look in *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *Functional Ecology*, 3, 605-612.
- Mays, H. L., & Hill, G. E.** (2004). Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 554-559.
- McNamara, K. B., Elgar, M. A., & Jones, T. M.** (2009). Large spermatophores reduce female receptivity and increase male paternity success in the almond moth, *Cadra cautella*. *Animal Behaviour*, 77, 931-936.
- Molleman, F., Ding, J., Boggs, C. L., Carey, J. R., & Arlet, M. E.** (2009). Does dietary restriction reduce life span in male fruit-feeding butterflies?. *Experimental gerontology*, 44, 601-606.
- Møller, A., & Jennions, M.** (2001). How important are direct fitness benefits of sexual selection?. *Naturwissenschaften*, 88, 401-415.
- Moreau, J., Benrey, B., & Thiéry, D.** (2006). Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 96, 205-212.

- Moreau, J., Thiéry, D., Troussard, J. P., & Benrey, B.** (2007). Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology*, 32, 747-753.
- Morrow, E. H., & Gage, M. J.** (2000). The evolution of sperm length in moths. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267, 307-313.
- Muller, K., Thiéry, D., Moret, Y., & Moreau, J.** (2015). Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69, 39-47.
- Parker, G. A.** (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, 45, 525-567.
- Paukku, S., & Kotiaho, J. S.** (2005). Cost of reproduction in *Callosobruchus maculatus*: effects of mating on male longevity and the effect of male mating status on female longevity. *Journal of Insect Physiology*, 51, 1220-1226.
- Perez-Staples, D., Aluja, M., Macías-Ordóñez, R., & Sivinski, J.** (2008). Reproductive trade-offs from mating with a successful male: the case of the tephritid fly *Anastrepha obliqua*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 1333-1340.
- Perry, J. C., Sirot, L., & Wigby, S.** (2013). The seminal symphony: how to compose an ejaculate. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 414-422.
- Scharf, I., Peter, F., & Martin, O. Y.** (2013). Reproductive trade-offs and direct costs for males in arthropods. *Evolutionary Biology*, 40, 169-184.
- Simmons, L. W.** (2001). *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Simmons, L. W., & Kvarnemo, C.** (1997). Ejaculate expenditure by male bush crickets decreases with sperm competition intensity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 264, 1203-1208.
- Snook, R. R.** (2005). Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 46-53.
- Stearns, S. C.** (1992). *The evolution of life histories*. Oxford: Oxford University Press, Oxford, UK.
- Steiner, S., Henrich, N., & Ruther, J.** (2008). Mating with sperm-depleted males does not increase female mating frequency in the parasitoid *Lariophagus distinguendus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 126, 131-137.
- Thiéry, D., Monceau, K., & Moreau, J.** (2014). Different emergence phenology of European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae) on six varieties of grapes. *Bulletin of entomological research*, 104, 277-287.
- Thornhill, R., & Alcock, J.** (1983). *The evolution of insect mating systems*. Harvard University Press, Cambridge, UK.

- Tigreros, N.** (2013). Linking nutrition and sexual selection across life stages in a model butterfly system. *Functional Ecology*, 27, 145-154.
- Torres-Vila, L. M., & Jennions, M. D.** (2005). Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57, 318-326.
- Torres-Vila, L. M., Rodriguez-Molina, M. C., Roehrich, R., & Stockel, J.** (1999). Vine phenological stage during larval feeding affects male and female reproductive output of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 89, 549-556.
- Torres-Vila, M., Stockel, J., & Rodriguez-Molina, M. C.** (1997). Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Physiological Entomology*, 22, 387-393.
- Tregenza, T., & Wedell, N.** (2000). Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Molecular Ecology*, 9, 1013-1027.
- Trivers, R.** (1972). Parental investment and sexual selection. *Sexual Selection & the Descent of Man*. Aldine, Chicago, USA.
- Vahed, K.** (1998). The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. *Biological Reviews*, 73, 43-78.
- Virkki, N.** (1969). Sperm bundles and phylogenesis. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 101, 13-27.
- Wedell, N., Gage, M. J., & Parker, G. A.** (2002). Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 313-320.
- Werner, M., & Simmons, L. W.** (2008). Insect sperm motility. *Biological Reviews*, 83, 191-208.
- Wigby, S., Sirot, L. K., Linklater, J. R., Buehner, N., Calboli, F. C., Bretman, A., Wolfner, M. R., Chapman, T.** (2009). Seminal fluid protein allocation and male reproductive success. *Current Biology*, 19, 751-757.
- Wilson, A. J., & Nussey, D. H.** (2010). What is individual quality? An evolutionary perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 207-214.

4. ÉVOLUTION DU CHOIX DE PARTENAIRE CHEZ LES MÂLES

Nous avons suggéré dans les sous-chapitres précédents que les femelles Eudémis devraient adopter des stratégies spécifiques de choix de partenaire en sélectionnant des mâles de bonne qualité (*i.e.* des mâles vierges disposant de larges ressources énergétiques) afin de maximiser l'acquisition de bénéfices directs (Chapitre III et IV.3). Dans le chapitre III, nous avons effectivement mis en évidence que les femelles préféraient s'accoupler avec des mâles vierges leur transférant de gros spermatophores riches en nutriments plutôt qu'avec des mâles non-vierges. Puisque la production de spermatophores se révèle également très coûteuse pour les mâles (dépendant de leur expérience sexuelle et de leur nutrition larvaire sur différents cépages, Chapitre III et IV), on peut également s'attendre à voir émerger des stratégies de choix de partenaire de la part des mâles chez cette espèce. Dans une revue parue en 2001, Bonduriansky suggère que 3 conditions sont nécessaires à l'évolution d'un choix de partenaire mâle. Il faut : (i) qu'il existe de la variation dans la qualité des partenaires sexuels, (ii) qu'il existe des coûts à localiser et à obtenir des partenaires et (iii) que l'investissement du mâle dans la reproduction soit important. Ces trois conditions sont parfaitement remplies chez Eudémis puisque la qualité reproductive des femelles (à travers leur fécondité) varie en fonction de leur âge, de leur masse et de leur cépage d'origine (Moreau et al. 2006^{a,b,c}, Moreau et al. 2007). De plus, la qualité des descendants produits par ces femelles (estimée en mesurant la taille des œufs, ce paramètre étant positivement corrélée à la croissance et à la survie des larves) est également affectée par leur nutrition larvaire, leur âge et leur masse corporelle (Torres-Vila & Rodriguez-Molina 2002). Ensuite, chez cette espèce, les mâles payent d'importants coûts physiologiques à chercher des partenaires sexuelles qui produisent des phéromones les attirant à longue distance. Ainsi, les capacités de vol des mâles, directement liées à leur condition corporelle, dépendent de leur cépage d'origine (Chapitre IV.2) et leur habileté à suivre les faisceaux phéromonaux pour trouver des partenaires est modulée par les odeurs des plantes présentes dans l'environnement (Ioriatti et al. 2011). Enfin, l'investissement du mâle dans la production d'éjaculats est important chez cette espèce puisque les mâles ne sont capables de produire qu'un seul spermatophore riche en nutriments (Chapitre IV.3) dont la qualité dépend directement des ressources énergétiques dont ils disposent à l'émergence (Chapitre IV.2). Pour toutes ces raisons, nous avons voulu examiner si les mâles *L. botrana* étaient capables de discriminer entre des femelles provenant de différents cépages, le potentiel reproductif des femelles (fécondité et fertilité) étant grandement influencé par leur cépage d'origine (Moreau et al. 2006^{a,b,c}).

4.1 MATÉRIEL & MÉTHODES

Pour tester l'existence d'un choix de partenaire chez les mâles, nous avons utilisé des femelles dont les larves avaient été récoltées sur différents cépages de vigne (Carignan, Grenache et Mourvèdre) à Perpignan (N 42°44'7.063", E 2°52'56.441") lors de la campagne de terrain en 2013. Ainsi, deux femelles âgées de deux jours et provenant de deux cépages différents (parmi les trois suivants : Carignan, Grenache et Mourvèdre) ont été placées simultanément dans un tube d'accouplement. Un mâle âgé de deux jours et provenant de l'élevage de l'INRA de Bordeaux (souche supposée génétiquement homogène et maintenue dans des conditions standard de laboratoire sur du milieu semi-artificiel) a ensuite été ajouté dans ce même tube et les interactions entre les trois partenaires ont été observées jusqu'à l'accouplement du mâle avec l'une des deux femelles. Afin de différencier les deux femelles lors des tests de choix, nous avons, la veille de l'expérience, réalisé un marquage en retirant les écailles d'une des deux ailes pour les deux femelles. Ce marquage n'affecte pas la probabilité d'accouplement des femelle ($\chi^2 = 0,90$, $p = 0,342$). Après l'accouplement ($n = 71$), la femelle accouplée a été maintenue dans le tube dans lequel elle a pu pondre ses œufs jusqu'à sa mort, nous permettant d'estimer sa fécondité (nombre d'œufs pondus), sa fertilité (nombre d'œufs éclos), et sa longévité adulte.

4.2 RÉSULTATS & DISCUSSION

Les tests de choix révèlent des probabilités d'accouplement différentes pour les mâles en fonction du cépage d'origine des deux femelles qui leur sont proposées (Fig. 24).

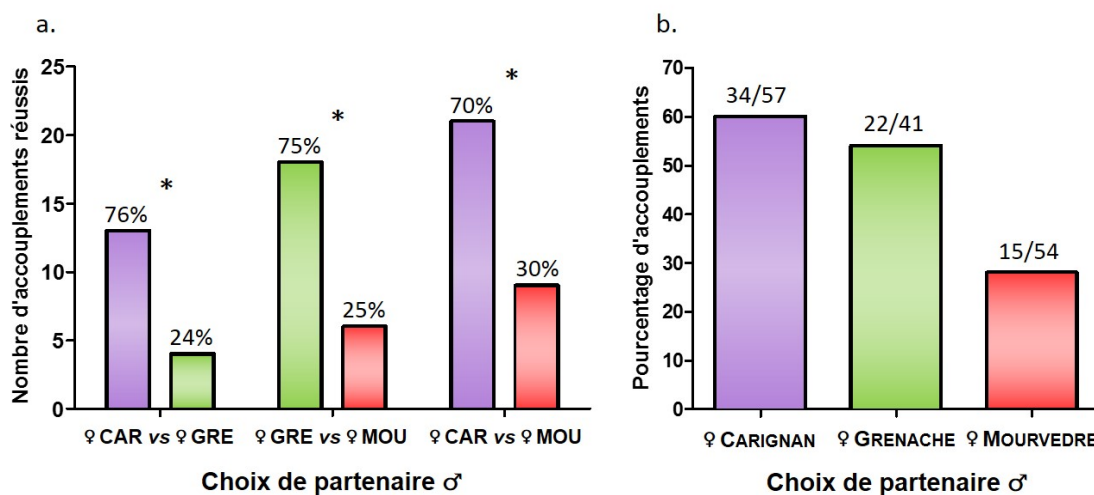


Figure 24 : (a) Nombre d'accouplements réussis entre un mâle contrôle et une femelle provenant d'un cépage donné (Carignan « CAR », Grenache « GRE » et Mourvèdre « MOU ») en proposant à chaque mâle dans un test de choix, deux femelles provenant de deux cépages différents et (b) probabilités globales d'accouplements du mâle avec les femelles provenant des trois cépages. (* : $p < 0,05$ après un test de χ^2).

Ainsi, les probabilités d'accouplements des mâles avec les femelles provenant du Carignan sont plus élevées qu'avec les femelles des deux autres cépages (Fig. 24a, respectivement, en présence d'une femelle Grenache : 13/17 accouplements, $p = 0,049$; en présence d'une femelle Mourvèdre : 21/30 accouplements, $p = 0,043$). De plus, les mâles ne se sont que très peu accouplés avec les femelles du Mourvèdre, dans seulement 27,8% des cas (Fig. 24b). De manière générale, le patron d'appariement populationnel observé découle d'un « choix consistant » des mâles (Fig. 24b). En effet, les probabilités d'accouplements des mâles sont les plus élevées avec les femelles du Carignan, puis avec les femelles du Grenache et enfin avec les femelles du Mourvèdre, ce patron se reflétant dans les tests de choix par une préférence cohérente des mâles pour les femelles provenant de ces trois cépages (Fig. 24a, préférence pour les femelles Carignan > Grenache, Grenache > Mourvèdre et de manière consistante, Carignan > Mourvèdre).

La fécondité des femelles est positivement corrélée à leur masse et est influencée par leur cépage d'origine (Fig. 25, ANCOVA, effet masse : $F_{1,42} = 10,07$, $p = 0,0028$; effet cépage : $F_{2,42} = 10,27$, $p = 0,0002$). Les femelles provenant du Mourvèdre pondent moins d'œufs que celles provenant du Carignan ou du Grenache (respectivement, une réduction de fécondité de 34% et de 50%).

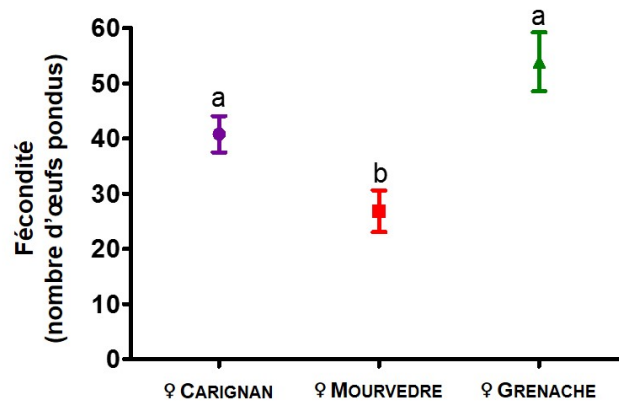


Figure 25 : Fécondité (moyenne $\pm$ erreur type) des femelles en fonction du cépage sur lequel elles ont effectué leur développement larvaire (Carignan, Mourvèdre et Grenache). Les lettres différentes au-dessus des moyennes indiquent des différences significatives de fécondité, $p < 0,05$.

Ce résultat, mis en parallèle avec celui des tests de choix, suggère que les mâles sont capables d'évaluer la qualité de la femelle, s'accouplant préférentiellement avec celles qui ont la plus forte fécondité. Ce « choix » n'est pas basé sur la masse des femelles, les mâles ne s'accouplant pas préférentiellement avec la plus grosse des deux femelles qui leur est présentée ($\chi^2 = 0,507$, $p = 0,476$). Dans cette expérience, nous supposons que la fécondité des femelles dépend principalement de leur cépage d'origine (et de leur masse) en considérant

que les mâles d'élevage transfèrent un spermatophore de qualité équivalente aux différentes femelles avec lesquelles ils s'accouplent. Il est cependant possible que les mâles exercent un choix cryptique en fonction de la condition des femelles, investissant plus d'énergie quand ils s'accouplent avec des femelles de « meilleure qualité ». Par exemple, il a été montré chez la pyrale asiatique du maïs *Ostrinia scapularis* que les mâles transféraient de plus gros et plus riches spermatophores aux jeunes femelles, ces dernières disposant encore de beaucoup de temps et d'énergie pour pondre tous leurs œufs comparées à des femelles plus âgées (Win et al. 2015). Une étude complémentaire est donc nécessaire pour vérifier si le mâle ajuste ou non son investissement dans le spermatophore en fonction du cépage d'origine de la femelle avec lequel il s'accouple. Ces mesures nous permettront de mieux identifier sur quels critères – reflétant la qualité des femelles – les mâles se basent pour choisir leur partenaire. Ces critères peuvent soit refléter directement la fécondité des femelles (à priori ne se basant pas sur la masse seule des femelles) soit refléter d'autres traits, comme par exemple la production de phéromones, coûteuse chez cette espèce (Harari et al. 2011).

Enfin, la fertilité des femelles ne dépend pas de leur cépage d'origine (Tableau 6, GLM avec une distribution quasi binomiale, $p = 0,106$). En effet, la majorité des œufs pondus par les femelles éclosent (entre 93,9 et 98,7%), quel que soit leur cépage d'origine, suggérant que les mâles apportent suffisamment de spermatozoïdes aux femelles pour féconder tous leurs œufs. La longévité des femelles, quant à elle dépend de leur cépage d'origine (régression de Cox : $W = 10,04$, $p = 0,018$), les femelles issues du Carignan étant plus petites (ANOVA, effet du cépage sur la masse des chrysalides : $F_{2,64} = 15,01$, $p < 0,0001$), elles vivent moins longtemps que celles du Mourvèdre et du Grenache (Tableau 6).

Tableau 6 : Différents traits mesurés chez des femelles Eudémis en fonction de leur cépage d'origine. Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

Cépage	Effectif	Masse chrysalide (mg)	Fertilité (% d'œufs éclos)	Longévité (jours)
Carignan	28	5,80 ± 0,14 (a)	98,7 ± 0,5 (a)	7,4 ± 0,2 (a)
Mourvèdre	15	6,96 ± 0,20 (b)	93,9 ± 2,9 (a)	7,8 ± 0,4 (b)
Grenache	22	7,03 ± 0,23 (b)	97,2 ± 1,3 (a)	8,0 ± 0,5 (b)

Ce résultat est transposable à celui observé sur les mâles, à savoir que les mâles du Carignan sont plus petits que ceux des autres cépages et vivent également moins longtemps (Chapitre IV.3) et suggèrent que le cépage de vigne affecte de manière consistante l'aptitude phénotypique des deux sexes chez Eudémis.

5. BILAN GLOBAL DU CHAPITRE IV

Le tableau 7 récapitule les principaux résultats présentés dans le Chapitre IV, concernant l'effet du cépage d'origine des mâles sur une variété de traits mesurés au cours de plusieurs études et reflétant leur qualité intrinsèque et reproductive, à savoir (i) leur condition corporelle, (ii) leur capacité à s'accoupler et à être acceptés par les femelles, (iii) leur qualité reproductive et (iv) leur impact sur le potentiel reproductif de leurs partenaires sexuelles.

Ce tableau révèle de manière unanime que le cépage de vigne joue un rôle primordial sur la qualité des mâles, à travers la quantité de ressources qu'ils peuvent accumuler durant leur développement larvaire. Les mâles émergent donc avec une quantité finie de ressources à investir, qui conditionne largement leur performances reproductives, et en retour, influence le potentiel reproductif des femelles avec lesquelles ils s'accouplent. De plus, les différentes études révèlent que les femelles sont capables de discriminer entre des mâles de différentes qualités et sont plus motivées à s'accoupler avec ceux leur procurant le plus de bénéfices directs. Ainsi, les femelles sont plus enclines à s'accoupler avec les mâles provenant du Grenache et du Carignan – ces mâles produisant des spermatophores riches en protéines et en spermatozoïdes boostant la fécondité et la fertilité des femelles – plutôt qu'avec les mâles provenant du Mourvèdre, qui transfèrent des petits spermatophores de faible qualité. De la même manière, les spermatophores des mâles provenant de la Syrah sont pauvres en nutriments et les femelles s'accouplant avec ces mâles souffrent également d'une fécondité réduite. La qualité du premier spermatophore produit – évaluée à travers la quantité de protéines qu'il contient – peut ainsi être directement reliée au potentiel reproductif des femelles et apparaît comme un déterminant crucial de l'aptitude phénotypique des adultes chez cette espèce monandre à reproduction sur capital.

Le second constat que l'on peut tirer de ce tableau est qu'il n'existe pas de cépage nutritionnellement « meilleur » en tout point que les autres, *i.e.* un cépage sur lequel les mâles obtiendraient suffisamment de ressources pour pouvoir investir dans tous leurs traits simultanément. En fonction de la qualité de leur nutrition larvaire, les mâles sont donc confrontés à des compromis dans l'allocation de leurs ressources entre différents traits. Ainsi, sur certains cépages, les mâles semblent plutôt investir dans leur condition corporelle au détriment de leur reproduction (Syrah) alors que sur d'autres cépages, le compromis inverse est observé (Carignan). Ces différences d'allocation dépendent certainement de la quantité et de la diversité des nutriments récupérés pendant le développement larvaire des mâles.

Tableau 7 : Synthèse des résultats obtenus au cours des trois expériences (Chapitre IV.1, 2 et 3) menées sur des mâles prélevés sur différents cépages en populations naturelles. Les effets de chaque cépage sur les différents traits mesurés sont exprimés relativement les uns par rapport aux autres.

Traits mesurés	Cépages sur lesquels les mâles se sont développés				Sous- chapitre
	Carignan	Grenache	Mourvèdre	Syrah	
« Condition » du mâle					
Masse des mâles	Petits	Gros	Gros	Gros	IV.1, 2, 3
Condition corporelle	Faible	Elevée	Faible	Elevée	IV. 2
Concentration en lipides	Égale	Égale	Égale	Égale	IV. 2
Concentration en protéines	Elevée	Intermédiaire	Elevée	Faible	IV. 2
Concentration en glycogène	Elevée	Faible	Elevée	Faible	IV. 2
Longévité	Courte	Longue	Longue	-	IV. 3
Comportements précopulatoires					
Latence avant l'accouplement	Égale	Égale	Égale	-	IV.1 & 3
Durée de l'accouplement	Longue	Longue	Courte	-	IV.1 & 3
Activité des mâles	Égale	Égale	Égale	-	IV.1 & 3
Motivation des femelles	Elevée	Intermédiaire	Faible	-	IV.1 & 3
Performances reproductives des mâles					
Capacité d'accouplement	Faible	Elevée	Elevée	-	IV. 3
Volume du 1 ^{er} spermatophore	Petits	Gros	Petits	Petits	IV.1, 2, 3
[Protéines] dans spermatophore	Elevé	Intermédiaire	Intermédiaire	Faible	IV. 2
Nb. spermatozoïdes eupyrènes	Elevé	Elevé	Faible	-	IV. 1 & 3
Nb. spermatozoïdes apyrènes	Égal	Égal	Égal	-	IV. 1 & 3
Répercussions sur le potentiel reproductif des femelles					
Latence de ponte du 1 ^{er} œuf	Courte	Intermédiaire	Très courte	Longue	IV. 2
Fécondité des femelles	Elevée	Elevée	Réduite	Réduite	IV. 1, 2, 3
Fertilité des femelles	Elevée	Elevé	Réduite	-	IV. 1 & 3
Longévité des femelles	Égale	Égale	Égale	Égale	IV. 1, 2, 3

Ce tableau reflète bien l'idée selon laquelle la « qualité d'un individu » ne peut être appréhendée qu'en étudiant une large variété de traits reflétant leur condition et leurs performances reproductives, afin de mieux comprendre comment les facteurs intrinsèques et extrinsèques peuvent moduler leur aptitude phénotypique dans la nature. De manière globale, les mâles du Carignan et du Grenache semblent être de meilleurs partenaires sexuels pour les femelles que les mâles provenant du Mourvèdre ou de la Syrah. Cependant, les mâles nourris sur du Grenache et du Carignan sont très différents (en termes de masse, de condition corporelle ou de ressources énergétiques) et n'investissent donc pas de la même manière dans la reproduction (Chapitre IV.2). La nutrition larvaire sur différents cépages contraint donc de manière différentielle les stratégies d'allocation des ressources des individus, les mâles investissant le plus dans la qualité de leur spermatophore étant ceux obtenant le plus de descendants chez cette espèce monandre.

Enfin, le sous-chapitre IV.4 révèle de manière concordante avec les études conduites sur les mâles, que les cépages boostant les performances reproductives des mâles (Carignan et Grenache) sont également ceux augmentant le potentiel reproductif des femelles, les femelles provenant de ces deux cépages ayant une fécondité plus élevée que celles provenant du Mourvèdre. Les cépages étudiés semblent donc affecter de manière similaire la qualité sexuelle des deux partenaires, suggérant que certains nutriments essentiels à la reproduction chez cette espèce sont peut-être absents des cépages sur lesquels les performances reproductives sont amoindries (comme le Mourvèdre). Ainsi, les mâles préfèrent s'accoupler avec les femelles provenant du cépage Carignan et rejettent les femelles provenant du Mourvèdre. De plus, nos résultats indiquent que les femelles préférées par les mâles sont également celles qui ont globalement la meilleure fécondité (*i.e.* les femelles provenant du Grenache), suggérant que les mâles sont également capables de discriminer les femelles en se basant sur des critères reflétant leur qualité.

CHAPITRE V

PATRONS D'APPARIEMENT ENTRE INDIVIDUS
PROVENANT DE DIFFÉRENTS CÉPAGES ET DE
DIFFÉRENTS SITES GÉOGRAPHIQUES

OBJECTIFS & RÉSULTATS PRINCIPAUX DU CHAPITRE

En raison de l'influence du cépage de vigne, à la fois sur les performances reproductives des mâles (Chapitre III et IV) et sur le potentiel reproductif des femelles (Moreau et al. 2006^{a,b,c}, Moreau et al. 2007), qui en plus dépend de leurs partenaires sexuels (Chapitre III et IV), nous avons voulu explorer l'existence de patrons d'appariement en fonction du cépage d'origine des deux partenaires chez *Eudémis*. Les précédentes études abordées au cours de ma thèse ou celles concernant le « compartiment femelle » de ce ravageur (Moreau et al. 2006^{a,b,c}, Moreau et al. 2007) ont caractérisé l'influence du cépage sur les performances reproductives des mâles ou des femelles en utilisant comme partenaires sexuels des individus « contrôle » (provenant d'une souche génétiquement homogène, élevée sur du milieu semi-artificiel) de l'autre sexe. *In natura*, au sein d'un vignoble, les couples peuvent être formés de mâles et de femelles provenant soit du même cépage soit de différents cépages. Puisque le cépage module fortement la qualité reproductrice des deux sexes, on pourrait voir émerger des barrières pré et post-zygotiques entre individus provenant de différents cépages, pouvant conduire à la formation de races d'hôtes chez cette espèce (Fig. 26). En effet, de multiples barrières mécaniques, comportementales, gamétiques et zygotiques peuvent conduire à un isolement reproductif entre partenaires exploitant différentes plantes hôtes (Fig. 26, Drès & Mallet 2002 pour une revue).

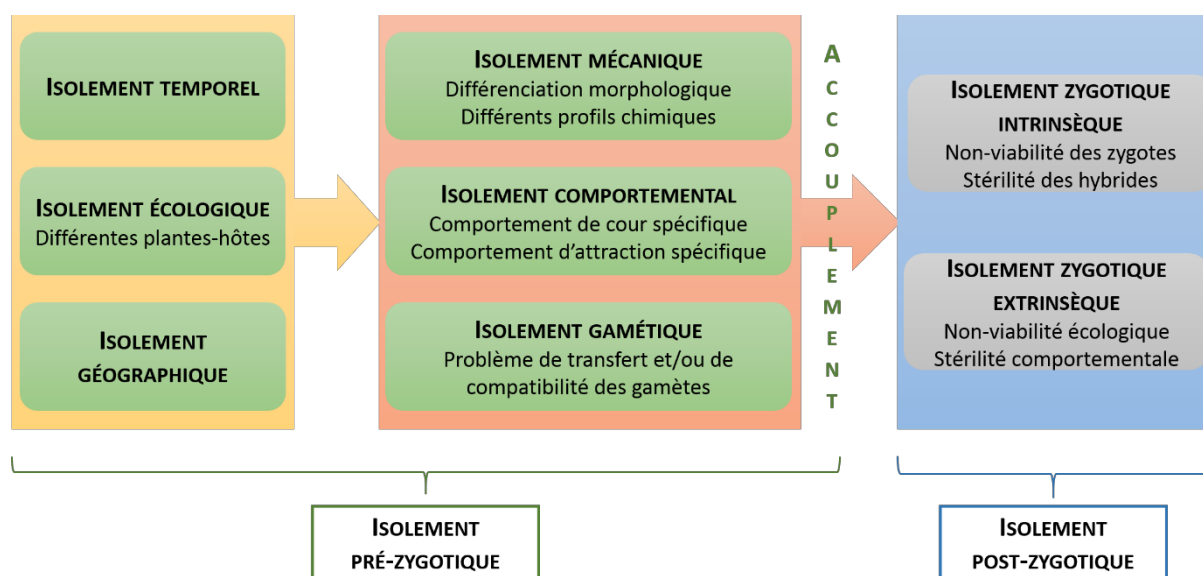


Figure 26 : Différents mécanismes d'isolement pré-zygotiques et post-zygotiques chez les Lépidoptères.

Dans cette dernière étude, nous avons donc examiné l'existence de plusieurs barrières prézygotiques (comportementales et gamétiques) entre mâles et femelles ayant effectué leur développement sur différents cépages de vigne (Carignan, Grenache et Syrah) au sein d'un même vignoble (Perpignan), afin de mettre en évidence l'existence ou non d'un isolement reproductif entre populations sympatriques provenant de différents cépages (séparés de seulement quelques mètres les uns des autres). De plus, nous avons également examiné ces patrons d'appariement en allopatrie, entre individus provenant de différents sites géographiques (séparés de quelques centaines de kilomètres) ayant tous effectué leur développement larvaire sur le même cépage (Grenache), ces croisements servant de contrôle à une plus large échelle géographique.

Des tests de « non-choix » ont été menés pour tester l'existence de patrons d'appariement non aléatoires (« *assortative mating* ») entre partenaires provenant (i) de différents cépages de vigne et (ii) de différents sites géographiques. Tout d'abord, pour tester l'existence d'un « *assortative mating* » entre individus exploitant différents cépages, une femelle vierge de 2 jours provenant d'un cépage donné (Carignan, Grenache ou Syrah) a été présentée à un mâle de 2 jours provenant soit du même cépage soit d'un des deux autres cépages, conduisant au total à 9 croisements possibles, effectués à chaque fois sur 30 couples (soit un total de 270 paires testées). Ensuite, la même méthode a été utilisée pour tester l'existence d'un « *assortative mating* » entre individus provenant de populations allopatriques récoltés dans différents sites géographiques. Une femelle de 2 jours provenant d'un site (Perpignan, Nîmes ou Sènas) a été présentée à un mâle de 2 jours provenant soit du même site, soit d'un des deux autres sites (9 croisements x 30 couples = 270 paires testées).

Nos résultats démontrent un fort isolement reproductif en allopatrie, à large échelle géographique, les partenaires provenant de différentes origines géographiques refusant de s'accoupler entre eux (leur succès reproducteur étant réduit à 41.1% contre 73.3% pour les partenaires provenant du même site géographique). De plus, parmi les accouplements hétérologues, les deux partenaires qui proviennent de deux sites géographiques différents mettent beaucoup plus de temps à s'accoupler que les paires homologues d'individus provenant du même site géographique. Enfin, les accouplements hétérologues produisent moins de descendants que les homologues, indiquant une incompatibilité partielle entre individus provenant de différentes populations allopatriques. Cette barrière mécanique peut tout d'abord correspondre à une incompatibilité physique entre les organes reproducteurs empêchant la fécondation (connu sous l'hypothèse du système « clé-serrure » prouvée chez

plusieurs espèces d'insectes, Hosken & Stockley 2004, Arbuthnott et al. 2010). Il peut également y avoir des problèmes de compatibilité entre les gamètes des partenaires provenant de populations différentes (par exemple au niveau de la correspondance moléculaire de l'enveloppe externe des gamètes, Swanson & Vacquier 2002). Ainsi, nos résultats démontrent un fort isolement reproductif en allopatrie, au niveau de plusieurs barrières pouvant conduire à la formation de races géographiques.

En revanche, à une échelle géographique beaucoup plus fine, au niveau sympatrique, nous n'avons pas mis en évidence d'isolement reproductif aussi fort que celui observé en allopatrie, les probabilités d'accouplement entre individus provenant de différents cépages étant relativement élevées (66,1% vs 72,2% pour les individus provenant du même cépage). Toutefois, les individus provenant de différents cépages mettent 30% de temps en plus à s'accoupler que ceux provenant du même cépage (et notamment ceux du Carignan qui mettent deux fois moins de temps que les combinaisons hétérologues). Cette latence plus longue reflète une certaine réticence des partenaires provenant de différents cépages à s'accoupler. De plus, le record de la plus courte latence avant de s'accoupler est détenu par les mâles et les femelles provenant du Carignan, qui comme on l'a montré au cours de cette thèse, sont les individus de meilleure qualité reproductive (Chapitre IV). Il est possible que la courte latence avant l'accouplement soit directement le reflet d'une plus grande motivation des individus à s'accoupler quand leur partenaire est de bonne qualité. Ainsi, les mâles et les femelles du Carignan pourraient exercer un choix de partenaire mutuel, en se basant sur des indices reflétant la qualité de leur partenaire à travers leur cépage d'origine. Il est également possible que dans la nature, les mâles issus d'un cépage donné reconnaissent et soit plus attirés par les femelles issues du même cépage, si par exemple ces mâles utilisent en plus du faisceau phéromonal, des odeurs provenant de leur plante hôte pour se guider dans les vignobles. Ces résultats, même s'ils ne démontrent pas de formation de races d'hôtes en sympatrie, suggèrent tout de même un degré de sélectivité des partenaires plus ou moins marqué en fonction de leur cépage d'origine.

Pour conclure, cette étude suggère un début d'isolement reproductif entre populations allopatriques qui pourrait conduire à l'évolution d'espèces cryptiques chez *L. botrana*. Il est maintenant nécessaire d'étudier le degré de différenciation génétique entre populations allopatriques à une large échelle géographique afin de mettre en évidence l'existence ou non d'espèces cryptiques chez cette espèce. Ce genre de découvertes pourrait avoir des implications considérables dans les programmes de gestion de ce ravageur en lutte intégrée.

MANUSCRIT 5

MATING PATTERNS OF THE EUROPEAN GRAPEVINE
MOTH (*LOBESIA BOTRANA*) IN SYMPATRIC AND
ALLOPATRIC POPULATIONS

MATING PATTERNS OF THE EUROPEAN GRAPEVINE MOTH (*LOBESIA BOTRANA*) IN SYMPATRIC AND ALLOPATRIC POPULATIONS

Karen MULLER^a, Denis THIERY^{b, c} and Jérôme MOREAU^a

^a Université Bourgogne Franche-Comté, Equipe Ecologie Evolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France.

^b INRA UMR 1065 Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France.

^c Université de bordeaux, INRA UMR 1065, Save, Bordeaux Sciences Agro, Villenave d'Ornon Cedex

ABSTRACT

Adaptation to different ecological environments through divergent selection can result in the evolution of reproductive isolation of populations. Phytophagous insects have been at the heart of investigations of ecological speciation, and it is clear that adaptation to different host plant species can promote host-race formation and insect speciation. However, the evolution of host races has typically been studied at the plant species scale, using sympatric populations of insects that are more or less specialized on particular plant species. Because many crop pest species are adapted to various plant varieties selected from a single plant species, it is of interest to establish whether reproductive barriers could evolve at this much smaller scale, between individuals exploiting different plant varieties, which are likely to be more similar than different plant species. To assess this we evaluated premating and postmating prezygotic barriers to sympatry between individuals of the grapevine moth pest *Lobesia botrana* originated from different cultivars of the same plant species (*Vitis vinifera*), and between allopatric populations originated from different geographical sites. We found weak reproductive isolation in sympatric populations of *L. botrana*, but marked reproductive isolation among allopatric populations. In sympatric populations the only effect was on the latency period prior to mating, which was longer for heterotypic partners that originated from different cultivars than for homotypic partners originated from the same cultivar. For the allopatric populations, reproductive isolation was evident in both premating barriers (lower mating success and longer latency period prior to mating for between-population crosses) and postmating prezygotic barriers (reduced fecundity and fertility for between-population crosses). In summary, we did not find any trend for sympatric host race formation in *L. botrana*, but the occurrence of nonrandom mating patterns between different allopatric populations suggests the beginning of reproductive isolation, which could lead to the evolution of cryptic species of *L. botrana*.

KEY WORDS: allopatric speciation, host race formation, *Lobesia botrana*, mating patterns, reproductive isolation

INTRODUCTION

Understanding the geographical context for speciation is central to evolutionary biology (Coyne & Orr 2004). Speciation is now widely accepted as a continuous process in which genetic variation becomes segregated among populations, but the relative importance of each of the modes of speciation (allopatric vs. sympatric) remains uncertain (Turelli et al. 2001). Nevertheless, the formation of new species can be inextricably linked to adaptation to the ecological environment (Nosil 2012). Specifically, the ecological hypothesis of speciation states that reproductive isolation evolves ultimately as a consequence of divergent natural selection on traits between environments (biotic and abiotic elements of habitats), and can occur in allopatry or sympatry (Schluter 2001, Funk et al. 2002, Rundle & Nosil 2005). For allopatric speciation, whereby new species arise from geographically separated populations of the same ancestral species (Mayr 1963, Coyne 1992, Barraclough & Vogler 2000), both prezygotic barriers (including ecogeographic, temporal, and behavioral isolation) and postzygotic barriers (hybrid inviability and sterility) often evolve following geographical isolation because of divergent selection and/or genetic drift (Ramsey et al. 2003, Rundle & Nosil 2005). In sympatric speciation, the evolution of reproductive isolation occurs under a variety of conditions without geographic barriers (reviewed by Bolnick & Fitzpatrick 2007), and its occurrence in nature has recently been demonstrated in several studies (Malausa et al. 2005, Barluenga et al. 2006, Papadopoulos et al. 2011). The impact of environmental factors on mating traits, and their contributions to speciation, has been widely studied (Maan & Seehausen 2011, Servedio et al. 2011). For sympatric populations, the key mechanism ensuring premating reproductive isolation over time is assortative mating (*i.e.* patterns of nonrandom mating; Jiang et al. 2013), which is therefore a pivotally important component of ecological speciation (Dieckmann & Doebeli 1999, Via 2001, Malausa et al. 2005, Schluter & Conte 2009).

Herbivorous insects have been at the center of investigations of ‘ecological speciation’, from which it is clear that adaptation to different host plants can promote host race formation, and therefore speciation (Funk et al. 2002, Matsubayashi et al. 2010). Indeed, for many herbivorous insects the host plants are the site of most activities, including feeding, development, oviposition, pupation, and sometimes mating (Schoonhoven et al. 2005). Because of the great intimacy between herbivores and their host plants, phytophagous insects are powerful model systems to investigate speciation mechanisms via divergent host plant specialization (Funk 1998, Berlocher & Feder 2002, Drès & Mallet 2002). A central hypothesis in the study of ecological speciation is that host plant specialization in recently diverged taxa is often because

of features that also produce assortative mating. For example in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) the influence of feeding behavior (and especially the behavioral acceptance of a plant as host) on both assortative mating and resource specialization is central to the maintenance of host races of this species (Caillaud & Via 2000). Globally, the occurrence of host races of herbivorous insects has often been used as evidence for the likelihood of sympatric speciation (Drès & Mallet 2002). Most studies on host race formation have involved phytophagous insects feeding on different host plant genera or species, such as the apple maggot (*Rhagoletis pomonella*) feeding on apple (*Malus pumila*) and hawthorn (*Crataegus* spp.) (Bush 1969, Feder 1998, Linn et al. 2012), and the larch budmoth (*Zeiraphera diniana*) feeding on larch (*Larix* spp.) and pine (*Pinus cembra*) (Emelianov et al. 2001, 2003). Because plants of different species or genera differ markedly in their chemical, physical, distributional, and phenological traits (Jaenike 1990), phytophagous insects are often specialized on a limited number of host plants, and divergent ecological specialization can contribute to the buildup of reproductive isolation (Rundle & Nosil 2005). However, some herbivorous insects, particularly crop pest species, more closely exploit host plants in cultivated areas, feeding on different varieties of the same plant species, which are thought to have more similarities than occur between different plant species. Although sympatric speciation has typically been sought among species exploiting very different plant species or genera, no study investigating the occurrence of assortative mating on a much smaller scale, within individuals adapted to different varieties of a single host plant species, have been reported.

We investigated this phenomenon using the European grapevine moth (*Lobesia botrana*), which is one of the most important grapevine pests worldwide. Its adaptation to grapes is considered to be relatively recent, as abundant populations were first noticed in vineyards during the beginning of the 20th century (Balachowsky & Mesnil 1935). One hypothesis, based on the ecological habits and actual geographical distribution of the pest, strongly supports a Mediterranean origin, with progressive extension first towards Central and then Western Europe (Maher & Thiéry 2006). *L. botrana* is now found throughout Europe, north and west Africa, the Middle East, and eastern Russia. It was more recently (2008–2010) introduced into Japan, Argentina, Chile, and the USA (California) (Varela et al. 2010, Gilligan et al. 2011). While cultivars of the same species are likely to be more similar than different species, much evidence is available to support the hypothesis that *L. botrana* can locally adapt to a particular cultivar at small geographic scales. Firstly, as for many other phytophagous insects, *L. botrana* larvae have low mobility (Torres-Vila et al. 1997), and the fate of the offspring is greatly affected by the mother's oviposition preference (Moreau et al. 2008). Indeed, females are able

to disperse within and among vineyards (although the range of this species remains unknown), and during their lifetime to distribute eggs on different plants. To achieve this, the mated females typically oviposit at dusk, laying eggs singly in response to olfactory cues (Gabel & Thiéry 1994, Masante-Roca et al. 2002), physical characteristics of the oviposition site (Maher & Thiéry 2003), and taste stimuli (Maher & Thiéry 2004, Maher et al. 2006). Female choice of oviposition site can also be modulated by natal habitat preference induction (NHPI), with females from larvae raised on grapes having increased preference to lay eggs on the same cultivar on which they had experienced as larvae (Moreau et al. 2008). NHPI, whereby early experience of a particular host increases the probability that the same host is chosen for egg laying following adult dispersal, can result in patterns of host-associated assortative mating that restrict gene flow among populations. Secondly, larval food quality greatly affects male and female reproductive life history traits and reproductive success (Moreau et al. 2007, Muller et al. 2015), and could shape mating patterns in this species.

The aim of our study was to investigate the occurrence of reproductive isolation among sympatric populations derived from different host grape cultivars in the same vineyard, which is a very small spatial scale never previously studied. We also investigated these patterns for allopatric populations derived from different geographical sites, to serve as a control at a much larger scale. To assess the occurrence of both allopatric and sympatric speciation, we evaluated multiple premating (mating success, mating duration, and the latency period prior to mating) and postmating prezygotic (oviposition latency, and fecundity and fertility of mated females) barriers to gene exchange among three different allopatric and sympatric populations of *L. botrana*.

MATERIALS & METHODS

Field sampling

Larvae of *L. botrana* corresponding to the first larval generation of the year were collected in the field in France during May 2014. To test for a cultivar effect on mating patterns in sympatric populations, larvae were sampled from three grape (*Vitis vinifera*) cultivars (Carignan: CAR; Grenache: GRE; and Syrah: SYR) that were located within several meters of each other in the same vineyard (N 42°44'7.063", E 2°52'56.441") in Perpignan (P), France. To test for a geographical effect in allopatric populations, larvae were also sampled from the same cultivar (GRE) from three geographically distinct vineyards including: Perpignan (P) ;

Nîmes (N), which is 200 km east of P (N 43°56'49.781", E 4°39'39.372"); and Sénas (S), which is 290 km east of P and 90 km east of N (N 43°43'54.251", E 5°1'45.621").

For each cultivar and geographical site, the larvae were sampled at the end of the larval cycle (fifth instar) when they were building glomerulae made of silk and flower buds (phenology 17–25; Eichhorn & Lorenz, 1977). *L. botrana* larvae complete their development in a single bunch, and each glomerulus contains only one larva (Torres-Vila 1997). The larvae were reared to adulthood in the laboratory in large polyethylene boxes (60 × 40 cm, height 21 cm) at 22 ± 1 °C, 60 ± 10 % RH, and under ambient photoperiod conditions, and were fed *ad libitum* using grape bunches from the same cultivar and location where they were reared. The larvae were checked daily until pupation, at which time the pupae were gently extracted from glomerulae. The pupae were weighed to the nearest 0.01 mg using a Precisa 262 SMA-FR microbalance, placed individually in glass tubes (70 × 9 mm diameter) stoppered with cotton wool plugs, and stored at 22°C under ambient photoperiod conditions. The pupae were checked each morning, and newly emerged adults were immediately sexed. Males and females were used for the mating experiments.

No-choice mating experiments

No-choice mating trials were conducted to assess assortative mating as a function of cultivar (sympatric populations) or geographical site (allopatric populations). We used no-choice tests because this most closely reflects the natural situation: females are isolated in vineyards, and male moths use sex pheromones to find a conspecific female and make contact with only one potential mate at a given time (Thiéry 2008). This procedure has been successfully used in numerous studies that have investigated the occurrence of assortative mating in sympatric and allopatric speciation (Munoz et al. 2010, Xue et al. 2014). To test for a cultivar effect, males and females reared on the same host cultivar (CAR×CAR, GRE×GRE or SYR×SYR) or on different cultivars (the six reciprocal crosses) were tested (Table 1; n = 30 for each combination). To test for a geographical effect, males and females reared on the same cultivar (GRE) from the same geographical site (P×P, N×N, S×S) or from different geographical sites (the six reciprocal crosses) were tested (Table 1; n = 30 for each combination).

At dusk, a single 2-day-old virgin male originating from each test condition (cultivar or geographical site) was placed into a mating tube (100 × 15 mm diameter) with a single 2-day-old virgin female originating from each test condition (cultivar or geographical site). We observed the pair for up to 4 h, and recorded whether they copulated. Mating was considered

to have been successful if: (i) mating lasted for > 30 min (which is the minimum time required for the spermatophore to be fully transferred in this species; K. Muller, personal observation); and (ii) the female subsequently laid fertile eggs. Females that engaged in mating for > 30 min and laid no eggs during their lifetimes were considered nonfertile, and were discarded from the analysis. The mating success of individuals was evaluated based on: (i) observed matings, including fertile + non-fertile matings; and (ii) fertile matings (observed matings that led to the production of fertile eggs). If the pair in the mating tube had not mated after 4 h, we considered the mating to be a failure. The latency period prior to mating (the time from pairing to copulation) and the duration of mating (the time spent copulating) were recorded only for fertile matings.

Table 1. Summary of the various moth crosses (partners from the same or different cultivars, and partners from the same or different geographical areas) used in the experiment ($n = 30$ per combination). The shaded cells represent homotypic pairs for the cultivar effect, and within-population pairs for the geographical effect.

Cultivar effect (from the same site, Perpignan)			
	♂ Carignan (CAR)	♂ Grenache (GRE)	♂ Syrah (SYR)
♀ Carignan (CAR)	CAR × CAR	GRE × CAR	SYR × CAR
♀ Grenache (GRE)	CAR × GRE	GRE × GRE	SYR × GRE
♀ Syrah (SYR)	CAR × SYR	GRE × SYR	SYR × SYR
Geographical effect (on the same cultivar, Grenache)			
	♂ Perpignan (P)	♂ Nîmes (N)	♂ S��nas (S)
♀ Perpignan (P)	P × P	N × P	S × P
♀ N��mes (N)	P × N	N × N	S × N
♀ S��nas (S)	P × S	N × S	S × S

Female reproductive output

After one successful mating, and to avoid the possibility of confusing premating isolation with postmating prezygotic interactions, we kept the female in her mating tube following copulation, and counted the number of eggs laid by that female to ensure that the mating had been successful and gave rise to fertile progeny. The females were provided with water *ad libitum*, and could oviposit freely on the inside surface of the glass tube until their death. Female survival was checked daily, and after the female died the eggs were incubated under the same conditions. During this period we recorded: (i) the period until the first egg was laid; (ii) fecundity (the mean number of eggs laid per female); (iii) fertility (the proportion of eggs that hatched); and (iv) female longevity.

Statistical analyses

All statistical tests were performed using R Software version 3.2.0 (R Core Team 2015). For each analysis we recorded the full model with insignificant interactions deleted, following the approach of Forstmeier & Schielzeth (2011). The premating and postmating prezygotic barriers to reproductive isolation were assessed by: (1) measuring the effect of cultivar by pooling individuals in homotypic pairs (partners originated from the same cultivar) vs. heterotypic pairs (partners originated from different cultivars), using a geographical control to compare within-population pairs (partners from the same geographical site) vs. between-population pairs (partners from two different geographical sites); and (2) measuring the effect of each of the nine crosses (involving individuals from different cultivars or different sites) at a much finer scale. We analyzed separately the mating success of observed matings (including fertile + nonfertile matings) and fertile matings (only those matings that led to the formation of fertile eggs). All others analyses (the latency period prior to mating, the mating duration, and female reproductive traits) were based only on fertile matings.

For no-choice experiments, which were designed to detect cultivar or geographical effects, we used the program JMating to calculate the index of pair sexual isolation (I_{PSI}) for the allopatric and sympatric populations (Carvajal-Rodriguez & Rolan-Alvarez 2006). I_{PSI} values range from -1 to $+1$, where 0 represents random mating, $+1$ represents complete assortative mating (*i.e.* all matings homotypic) and -1 represents complete disassortative mating (*i.e.* all matings heterotypic). Statistical significance for sexual isolation was determined by bootstrapping 10,000 times in JMating. The mating successes for observed matings (the proportion of male–female pairs that had copulating within 4 h) and for fertile matings (the proportion of mated females that laid fertile eggs) were analyzed using logistic regression with a binomial distribution (success/failure), and significance was assessed using likelihood ratio (LR) tests. A cox regression was applied to assess the effect of male and female origin (cultivar and geographical site) and pupal mass on the latency period prior to mating. The effects of male and female origin on the duration of mating and the female fecundity were analyzed using ANCOVAs (with the pupal mass of males and females as covariates, respectively). A generalized linear model (GLM) having a quasi-binomial error structure and a logit link function was used to analyze the proportion of hatched eggs produced by females mated with males of different origin (Warton and Hui 2011).

RESULTS

Cultivar effect on reproductive isolation

Premating isolation

In total, 270 no-choice experiments ($n = 30$ per combination) were used to evaluate differences in the probability of mating for homotypic and heterotypic crosses between virgin males and females of *L. botrana* from three different cultivars from the same vineyard. Overall, the results provided no evidence of host cultivar-associated sexual isolation (heterotypic vs. homotypic pairs) for both observed matings (fertile + non-fertile matings; $I_{PSI} = 0.005 \pm 0.076$, $p = 0.942$) and fertile matings (only matings that led to the formation of fertile eggs; $I_{PSI} = 0.047 \pm 0.078$, $p = 0.536$). *L. botrana* moths were equally likely to mate if paired with a member of the opposite sex having the same (observed homotypic mating: 74.4%; fertile homotypic mating: 72.2%) or different (observed heterotypic mating: 73.9%; fertile heterotypic mating: 66.1%) host cultivar of origin. The observed mating success of virgin *L. botrana* males and females did not vary based on their cultivar of origin (Table 2; male cultivar of origin: LR = 1.08, $p = 0.582$; female cultivar of origin: LR = 5.044, $p = 0.080$). However, the fertile mating success differed according to the female cultivar of origin (male cultivar of origin: LR = 0.87, $p = 0.647$; female cultivar of origin: LR = 8.08, $p = 0.018$). For example, males from Carignan were more likely to mate with females from Carignan than with females originated from Syrah (76.7% vs. 46.7% of successful matings, respectively). However, the mating success of males from Grenache and Syrah was the same, irrespective of the female origin (Table 2).

Table 2. Percentage of successful observed (fertile + non-fertile matings) and fertile matings (mating that led to the production of fertile eggs) among the nine pairs of partners originated from the three cultivars (CAR: Carignan; GRE: Grenache; SYR: Syrah); $n = 30$ per combination. Grey squares represent homotypic pairs (partners from the same host cultivar). Squares with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

	♂ CAR		♂ GRE		♂ SYR	
	Observed	Fertile	Observed	Fertile	Observed	Fertile
♀ CAR	76.7%	76.7% (a)	73.3%	73.3%	76.7%	73.3%
♀ GRE	76.7%	70.0% (ab)	83.3%	76.7%	83.3%	73.3%
♀ SYR	60.0%	46.7% (b)	73.3%	60.0%	63.3%	63.3%

For fertile matings, the latency period prior to mating was significantly longer for heterotypic pairs (45.1 ± 3.2 min) than homotypic pairs (34.3 ± 3.3 min) (Fig. 1; Cox regression, $\chi^2_{1,184} = 5.76$, $p = 0.016$). Similarly, the latency period prior to mating for the nine cultivar crosses was affected by the cultivar of origin of individuals (Fig. 2; Cox regression, $\chi^2_{1,184} = 18.8$, $p = 0.015$). For example, females from Carignan copulated sooner with males from

Carignan (22.2 ± 2.9 min) than with males from Grenache (53.1 ± 7.9 min) or Syrah (53.2 ± 8.3 min). The time spent mating lasted an average 50–58 min and did not vary among cross types (Tables 3 and 4), for the results combined (homotypic vs. heterotypic effect: $F_{1,179} = 0.07$, $p = 0.288$) or for individual populations pairs (overall model: $F_{4,179} = 0.479$, $p = 0.751$).

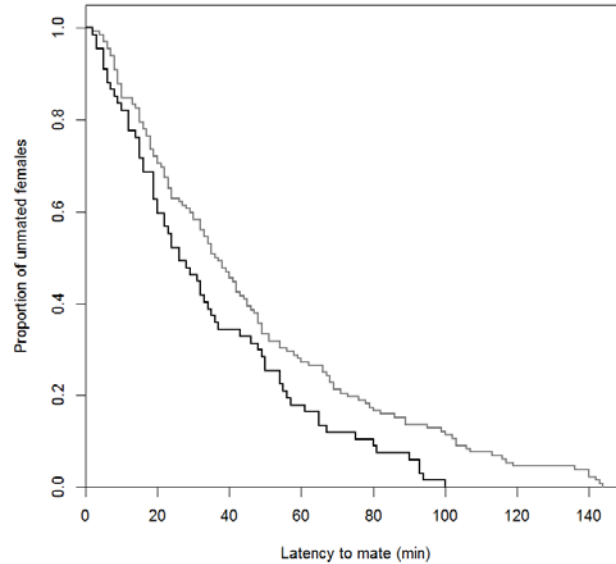


Figure 1. Proportion of unmated females according to the latency period prior to mating (min) in no-choice experiments between virgin males and females of *L. botrana* originated from the same cultivar (homotypic pairs: CAR×CAR, GRE×GRE, SYR×SYR; black line) or from different cultivars (heterotypic pairs: CAR×GRE, CAR×SYR, GRE×CAR, GRE×SYR, SYR×CAR, SYR×GRE; grey line) in the same vineyard. CAR: cv Carignan; GRE: cv Grenache; SYR: cv Syrah.

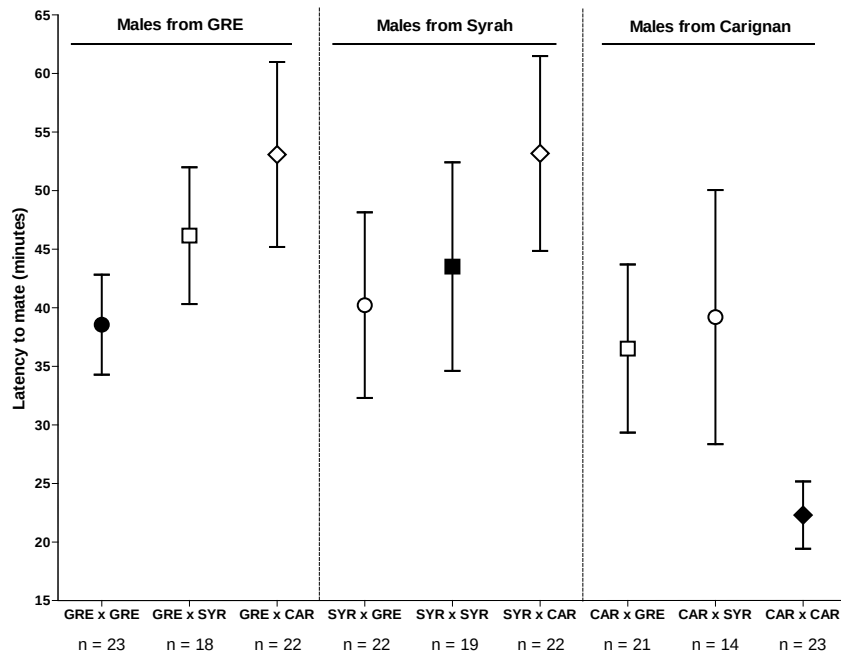


Figure 2. Latency period prior to mating in no-choice experiments between virgin males and females of *L. botrana* originated from three different cultivars. Black symbols represent homotypic pairs (partners from the same cultivar) and white symbols represent heterotypic pairs (partners from different cultivars). Symbols represent female cultivar origin (circles: Grenache; squares: Syrah; diamonds: Carignan).

Postmating prezygotic isolation

Among mated females, the delay prior to the first formation of eggs (*i.e.* the oviposition latency) was not affected by the male or female cultivar of origin or pupal mass (Tables 3 and 4; overall model: $\chi^2_{5,184} = 6.37$, $p = 0.383$), even if the data for homotypic *vs.* heterotypic pairs were combined ($F_{1,184} = 0.10$, $p = 0.752$). Similarly, female fecundity did not differ among cross types, for the results combined (homotypic *vs.* heterotypic effect: $F_{1,180} = 0.45$, $p = 0.505$) or for the individual population pairs (Tables 3 and 4), but the number of eggs laid was positively correlated with female pupal mass (overall model: $F_{6,177} = 15.87$, $p < 0.0001$). The fertility level was high, ranging from 93.0 to 96.5% of hatched eggs, and did not vary among cross types for the result combined (homotypic *vs.* heterotypic effect: $F_{1,180} = 1.27$, $p = 0.521$) or for the individual population pairs (Tables 3 and 4).

Table 3. *Precopulatory (number of fertile matings and mean $\pm$ SEM of mating duration) and postcopulatory prezygotic barriers (mean $\pm$ SEM of oviposition latency, fecundity and fertility) to reproductive isolation for the nine crosses of males and females from the three cultivars (CAR: Carignan; GRE: Grenache; SYR: Syrah) from the same vineyard (P); $n = 30$ for each combination. Shaded rows indicated homotypic pairs (from the same cultivar).*

Cultivar crosses		Precopulatory barriers		Postcopulatory barriers		
♂	♀	Number of fertile matings	Mating duration (min)	Oviposition latency (days)	Fecundity (number of eggs laid)	Fertility (% of eggs hatched)
CAR	CAR	23	56.8 $\pm$ 3.1	2.4 $\pm$ 0.2	60.6 $\pm$ 5.0	94.2 $\pm$ 1.3
CAR	GRE	21	53.6 $\pm$ 2.4	2.5 $\pm$ 0.3	55.7 $\pm$ 4.8	93.4 $\pm$ 1.3
CAR	SYR	14	46.6 $\pm$ 2.6	2.8 $\pm$ 0.3	58.1 $\pm$ 5.2	95.0 $\pm$ 0.9
GRE	CAR	22	53.9 $\pm$ 2.9	3.6 $\pm$ 0.7	62.4 $\pm$ 4.1	94.9 $\pm$ 0.8
GRE	GRE	23	54.6 $\pm$ 3.4	2.7 $\pm$ 0.3	60.5 $\pm$ 4.3	96.5 $\pm$ 0.7
GRE	SYR	18	58.2 $\pm$ 4.6	2.4 $\pm$ 0.2	63.1 $\pm$ 4.9	93.0 $\pm$ 1.6
SYR	CAR	22	57.1 $\pm$ 3.6	2.1 $\pm$ 0.2	61.2 $\pm$ 4.7	95.2 $\pm$ 0.9
SYR	GRE	22	50.5 $\pm$ 2.0	2.4 $\pm$ 0.2	63.4 $\pm$ 4.1	95.3 $\pm$ 1.1
SYR	SYR	19	56.9 $\pm$ 3.6	2.4 $\pm$ 0.2	60.3 $\pm$ 3.4	94.6 $\pm$ 1.6
Homotypic		65	56.1 $\pm$ 1.9	2.5 $\pm$ 0.1	60.4 $\pm$ 2.5	95.2 $\pm$ 0.7
Heterotypic		119	53.6 $\pm$ 1.3	2.6 $\pm$ 0.2	60.8 $\pm$ 1.9	94.5 $\pm$ 0.5

Table 4. Male and female cultivar and pupal mass effects on precopulatory barriers (latency period prior to mating and mating duration) and postcopulatory prezygotic barriers (female oviposition latency, fecundity and fertility).

Source	Precopulatory barriers				Postcopulatory barriers					
	Latency to mate ^a		Mating duration ^b		Oviposition latency ^a		Fecundity ^c		Fertility ^d	
	LR value	P	F value	P	LR value	P	F value	P	LR value	P
♂ × ♀ cultivar	10.33	0.035	7.11	0.130	6.57	0.160	0.52	0.72	2.87	0.579
♂ cultivar	7.76	0.021	0.73	0.696	4.26	0.119	0.14	0.87	2.21	0.331
♂ mass	0.09	0.762	4.52	0.033	0.20	0.648	0.52	0.47	1.07	0.300
♀ cultivar	0.08	0.961	1.49	0.474	0.25	0.884	0.40	0.67	1.70	0.426
♀ mass	1.92	0.166	3.31	0.069	0.97	0.320	92.67	<0.001	2.90	0.088

^a Cox regression ; ^b GLM using a log transformation ; ^c ANCOVA ; ^d GLM using a quasi-binomial error structure

Geographical effect on reproductive isolation

Premating isolation

In total, 270 no-choice experiments (n = 30 per combination) were used to evaluate differences in the probability of mating between virgin males and females of *L. botrana* reared on the same cultivar (GRE) at three different geographical sites (allopatric populations). This was considered in relation to between-population crosses (partners from different geographical sites) and within-population crosses (partners from the same geographical site). Overall, the experiments revealed marked allopatric sexual isolation among the three different populations of moths (observed mating success: $I_{PSI} = 0.172 \pm 0.075$, $p = 0.029$; fertile mating success: $I_{PSI} = 0.288 \pm 0.079$, $p = 0.001$). A greater proportion of insects from a particular geographical site mated with members of the opposite sex from the same site (observed within-population mating: 80%; fertile within-population mating: 73.3%) than with mates from other geographical sites (observed between-population mating: 57.8%; fertile heterotypic mating: 41.1%). Similarly, for the nine geographical crosses the observed mating success of virgin *L. botrana* males and females varied according to their mutual geographical site of origin, with males and females from the same site have greater mating success than males and females having different geographical origins (Table 5; male geographical site × female geographical site: LR = 14.13, $p = 0.007$). This effect was more pronounced for matings that led to the production of fertile eggs (Table 5; male geographical site × female geographical site: LR = 25.76, $p < 0.0001$).

Table 5. Percentage of successful observed (fertile + non-fertile matings) and fertile matings (mating that led to the production of fertile eggs) between the nine pairs of partners from the three geographical sites (Perpignan, Nîmes, and S  nas) on the same cultivar (Grenache); $n = 30$ per combination. Grey squares represent homotypic pairs (partners from the same host cultivar). Values having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

	♂ Perpignan		♂ N��mes		♂ S��nas	
	Observed	Fertile	Observed	Fertile	Observed	Fertile
♀ Perpignan	25 (83.3%) ^a	23 (76.7%) ^a	21 (70.0%) ^a	12 (40.0%) ^b	16 (53.3%) ^b	10 (33.3%) ^b
♀ N��mes	16 (53.3%) ^b	13 (43.3%) ^b	24 (80.0%) ^a	20 (66.7%) ^a	24 (80.0%) ^a	17 (56.7%) ^{ab}
♀ S��nas	13 (43.3%) ^b	11 (36.7%) ^b	14 (46.7%) ^b	11 (36.7%) ^b	23 (76.7%) ^a	23 (76.7%) ^a

For fertile matings, the latency period prior to mating was significantly longer for between-population pairs than within-population pairs (Fig. 3; Cox regression, $\chi^2_{1,139} = 86.74$, $p < 0.0001$). Similarly, for the nine geographical crosses individually the latency period prior to mating was affected by the interaction between the male and female cultivars of origin (Fig. 4; Cox regression, male $\times$ female cultivar of origin interaction, $\chi^2_{4,139} = 97.39$, $p < 0.0001$). Partners from the same geographical site copulated sooner than did partners from different geographical sites. There was no difference in the time spent mating for between-population vs. within-population crosses (population effect: $F_{1,139} = 0.03$, $p = 0.874$). For the nine crosses individually, the duration of mating ranged from 47.5 to 65.5 min, and did not depend on the male or female geographical origin (Tables 6 and 7; overall model: $F_{6,132} = 1.15$; $p = 0.339$).

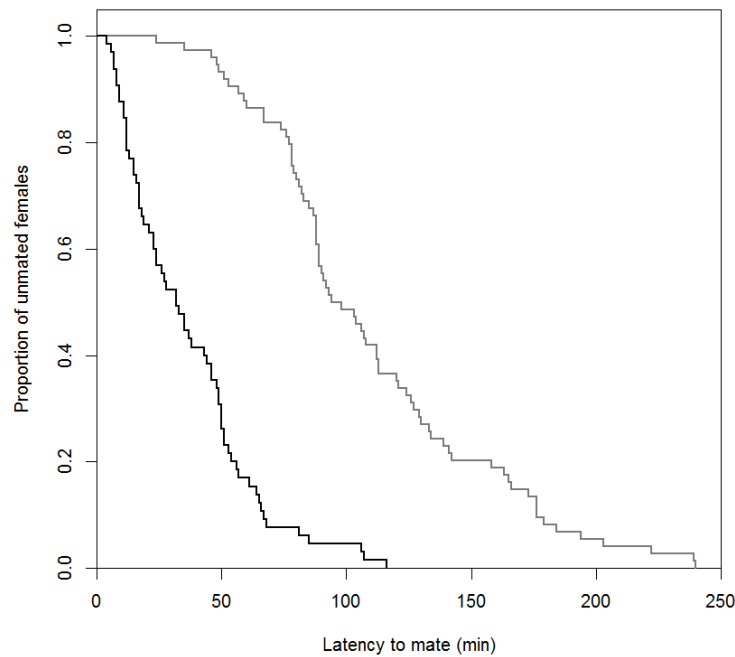


Figure 3. Proportion of unmated females according to the latency period prior to mating (min) between virgin males and females of *L. botrana* originated from the same geographical site (homotypic pairs: $N \times N$, $P \times P$, $S \times S$, black line), or at different geographical sites (heterotypic pairs: $N \times P$, $N \times S$, $P \times N$, $P \times S$, $S \times N$, $S \times P$; grey line) on the same cultivar (GRE). Geographical sites were Perpignan (P), N  mes (N), and S  nas (S).

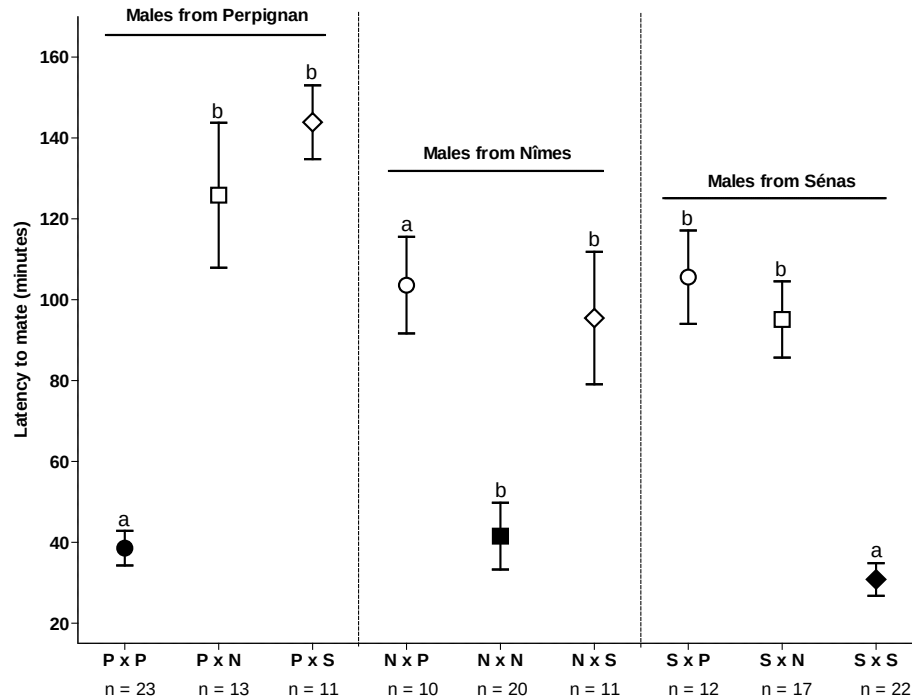


Figure 4. Latency period prior to mating in no-choice experiments between virgin males and females of *L. botrana* originated from different geographical sites (Perpignan: P; Nîmes: N; Sènas: S). Black symbols represent within-population pairs (from the same population) and white symbols represent between-population pairs (from different populations). Symbols represent the female origin (circles: P; squares: N; diamonds: S). Values for mating pairs with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Postmating prezygotic isolation

For the three population pairs combined, the delay prior to the first appearance of eggs (*i.e.* the oviposition latency) was not affected by the cross type (Table 6; between-population vs. within-population effect: $F_{1,139} = 0.76$, $p = 0.384$). However, among mated females in the nine crosses the delay prior to the first appearance of eggs was affected by the female geographical origin but not by the male geographical origin or the male or female pupal mass (Tables 6 and 7; overall model: $\chi^2_{6,139} = 17.33$, $p = 0.008$). Females from N mated with males from P took less time to lay their first eggs than females from P and S (Table 6). In some combinations the fecundity and fertility were reduced for females in between-population vs. within-population crosses. Firstly, among the three population pairs combined the female fecundity was significantly less for between-population (52.1 ± 1.8 eggs) vs. within-population crosses (71.4 ± 2.6 eggs) (overall model: $F_{3,135} = 31.1$, $p < 0.0001$; between-population vs. within-population effect: $F_{1,135} = 42.26$, $p < 0.0001$; female mass effect: $F_{1,135} = 43.17$, $p < 0.0001$). Among mated females in the nine crosses, this effect was detected for two of the three groups of allopatric populations (Fig. 5a; global model: $F_{10,128} = 5.93$, $p < 0.0001$; male site $\times$ female site interaction: $F_{4,128} = 10.04$, $p < 0.0001$), with the within-population pairs from N and S producing more eggs than the between-population pairs.

Table 6. Precopulatory (number of fertile matings and mean $\pm$ SEM of mating duration) and postcopulatory prezygotic (mean $\pm$ SEM of oviposition latency) barriers to reproductive isolation for the nine crosses of males and females from the three geographical sites (Perpignan: P; Nîmes: N; S nas: S). Shaded rows indicate within-population pairs (from the same geographical site). Values having different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Geographical site crosses		Precopulatory barriers		Postcopulatory barriers
♂	♀	Number of fertile matings	Mating duration (min)	Oviposition latency (days)
P	P	23	54.6 $\pm$ 3.5	2.7 $\pm$ 0.3 ^a
P	N	13	53.3 $\pm$ 4.5	1.5 $\pm$ 0.2 ^b
P	S	11	50.2 $\pm$ 3.2	2.2 $\pm$ 0.4 ^a
N	P	10	59.4 $\pm$ 4.8	2.4 $\pm$ 0.4 ^a
N	N	20	57.3 $\pm$ 5.5	2.2 $\pm$ 0.3 ^a
N	S	11	65.5 $\pm$ 5.6	1.9 $\pm$ 0.2 ^a
S	P	12	47.5 $\pm$ 2.1	2.2 $\pm$ 0.2 ^a
S	N	17	55.2 $\pm$ 5.3	1.9 $\pm$ 0.1 ^a
S	S	23	51.5 $\pm$ 2.8	1.7 $\pm$ 0.1 ^a
Within-population		66	54.4 $\pm$ 2.3	2.2 $\pm$ 0.1
Between-population		74	54.9 $\pm$ 1.9	2.0 $\pm$ 0.1

Table 7. Effects of male and female geographical site, and male and female mass on precopulatory (latency period prior to mating and mating duration) and postcopulatory prezygotic (female oviposition latency, fecundity and fertility) barriers.

Source	Precopulatory behaviors				Female reproductive success					
	Latency to mate ^a		Mating duration ^b		Oviposition latency ^a		Fecundity ^c		Fertility ^d	
	LR value	P	F value	P	LR value	P	F value	P	LR value	P
♂ $\times$ ♀ site	96.93	<0.001	0.73	0.570	3.38	0.496	11.05	<0.001	58.68	<0.001
♂ site	0.95	0.622	2.73	0.069	1.54	0.462	5.07	0.008	3.16	0.206
♂ mass	2.04	0.153	1.09	0.299	0.61	0.436	0.01	0.933	0.7	0.392
♀ site	1.69	0.429	0.04	0.957	11.80	0.002	2.02	0.137	0.82	0.665
♀ mass	2.39	0.122	0.01	0.957	2.56	0.109	25.96	<0.001	4.98	0.026

^a Cox regression ; ^b GLM using a log transformation ; ^c ANCOVA ; ^d GLM using a quasi-binomial error structure

Finally, female fertility was less in the between-population pairs ($88.7 \pm 0.8\%$ of hatched eggs) relative to the within-population pairs ($94.9 \pm 0.5\%$ of hatched eggs), for the results combined (between-population vs. within-population effect: $F_{1,135} = 139.59$, $p < 0.0001$) and for individual population pairs (Fig. 5b; interaction site male $\times$ site female: $F_{4,135} = 143.72$, $p < 0.0001$).

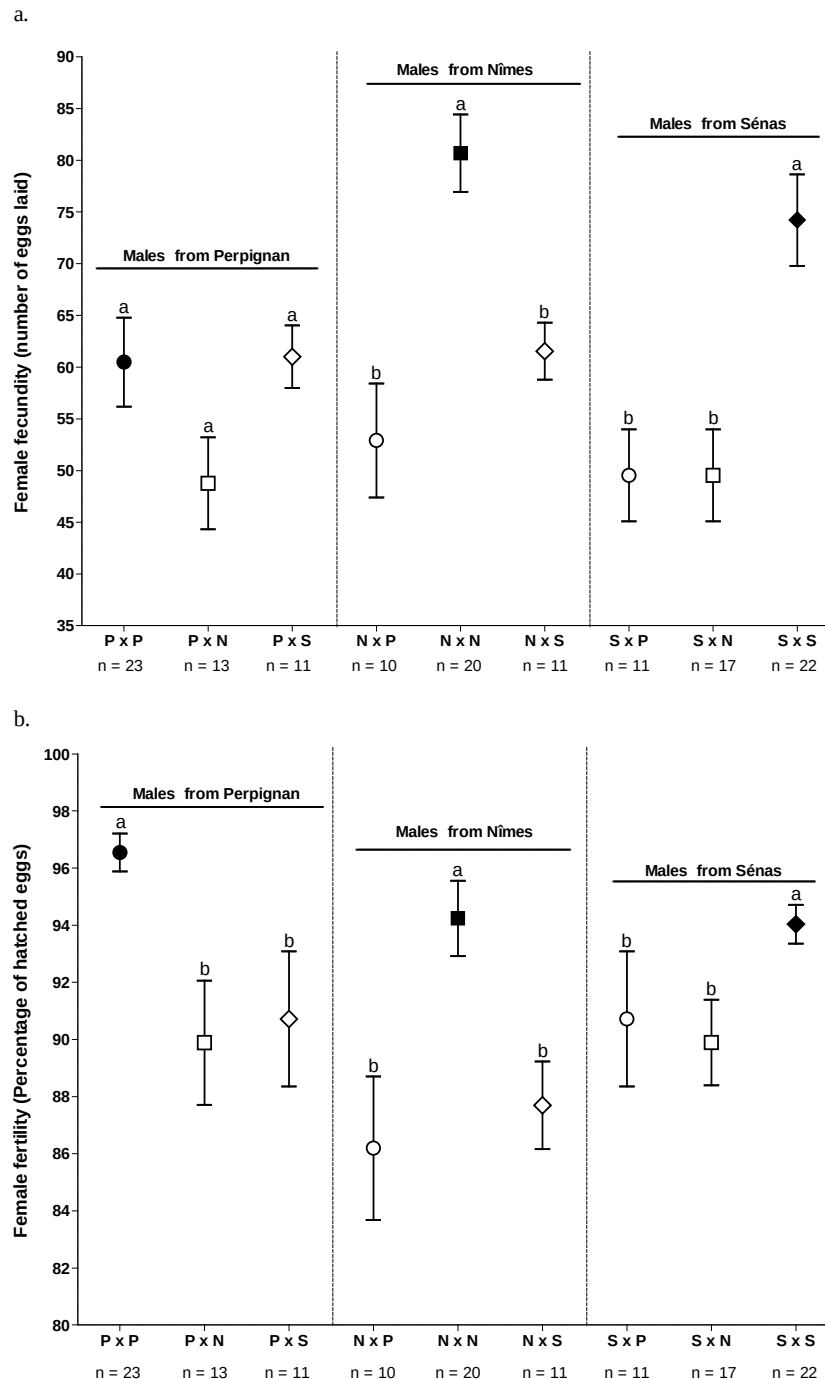


Figure 5. (a) Fecundity (mean $\pm$ SEM of number of eggs laid) and (b) fertility (mean $\pm$ SEM of percentage of eggs hatched) for females mated with males from different geographical sites (Perpignan: P; Nîmes: N; Sènas: S). Black circles represent within-population pairs (from the same population) and white circles represent between-population pairs (from different populations). The number at the bottom of each column represents the sample size. Values for mating pairs with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

DISCUSSION

This study is the first to have assessed the occurrence of reproductive isolation in sympatric and allopatric populations of *L. botrana*, and is also the first to have assessed the effect of the plant cultivar, particularly at a very small geographical scale. Our results provided little evidence for sympatric isolation between moths from the same population originated from different host cultivars. We found no evidence in our experiments for sexual isolation between pairs originated from different cultivars, or for postmating isolation. However, we found that the latency period prior to mating was longer for heterotypic partners originated from different cultivars than for homotypic partners originated from the same cultivar. In contrast to this weak sympatric effect on mating patterns, we detected strong premating and postmating reproductive isolation between *L. botrana* pairs where the partners came from populations in different geographical locations. Premating isolation was evident for both assortative mating (higher mating success for within-population pairs: 73.3% vs. 41.1%) and the latency period prior to mating (much longer for between-population pairs). Moreover, homotypic pairs had more eggs and sired more viable offspring than heterotypic pairs, which indicates partial reproductive incompatibility among individuals from the different populations.

Reproductive isolation in allopatric populations

We detected marked allopatric reproductive isolation between different geographical pairs of populations of *L. botrana*. Reproductive isolation in allopatric populations has been demonstrated in numerous species to be a result of multiple barriers arising from genetic divergence between geographically separated populations (Mendelson et al. 2007, Nosil 2007, Jennings et al. 2014). At the premating level we found reduced copulation success among heterotypic pairs compared with homotypic pairs, which was primarily because of a lack of motivation to mate. Among the potential barriers leading to reproductive isolation in moths, mate selection behavior is one of the most important (Dopman et al. 2010). The difference between allopatric populations in terms of mating probability may be largely because of differences in the probability of initiating courtship and the motivation to mate (*i.e.* the calling position in females), as has been shown for *Drosophila* species (Price & Boake 1995, Jennings et al. 2011) and in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Liu et al. 2014). Indeed, among successful matings between heterotypic partners, the latency period prior to mating was nearly three times longer than for homotypic partners, suggesting a greater aversion of males and/or females to mate heterospecifically. In Lepidoptera, the pheromones produced by

females generally comprise a blend of compounds, major components of which are long-chain derivatives of fatty acids that specifically attract males of the same species, which reduces the chance of heterospecific mating. In some cases the pheromone blend can differ depending on the geographical distribution of a species (Boo 1998, Kawazu et al. 2000). The sex pheromone of *L. botrana*, which has been studied since the 1970s, consists mainly of the compound (7E,9Z)-7,9-dodecadienyl acetate (E7,Z9-12Ac), plus some other minor compounds (Roelofs et al. 1973, El-Sayed et al. 1999, Witzgall et al. 2005). We hypothesize that differences in the ratios and combinations of pheromone minor components in *L. botrana* females from different allopatric populations explain the low success rate of heterotypic partners.

In our study, mating of *L. botrana*, even for > 30 min, did not necessary lead to the production of fertile eggs, especially in heterospecific matings. Non-fertile mating can result from a failure to transfer spermatophores. When moths copulate the male stays attached to the female, even in the absence of successful insemination (Muller, personal observations). Mating success is usually high in butterflies and moths, with most species exceeding 75% (usually 95%) success for mated females (Rhainds 2010). This is much greater than we observed for heterotypic crosses. At the postmating prezygotic level, heterotypic pairs produced significantly fewer progeny than homotypic crosses, and we hypothesize that mating success may be reduced by reproductive cytoplasmic incompatibility in crosses involving different allopatric populations. In our experiment we did not determine at what stage (*e.g.* sperm transfer/storage, cryptic female choice, sperm–egg interaction, embryonic development) the observed hybrid dysfunction occurred, but we speculate on the following explanations. Firstly, the reduced fecundity observed in heterotypic pairs could reflect reduced fertilization rates, with only fertilized eggs being laid (Gregory & Howard 1994). Secondly, it is possible that heterotypic males transfer less sperm than homotypic males to females, and those females reduce their oviposition rates when sperm is limited. Moreover, only a fraction of heterotypic sperm could be stored in female spermathecal, this being inefficient (Price et al. 2001). Thirdly, the sperm of heterotypic males might contain seminal proteins that are unable to stimulate oviposition by females (Herndon & Wolfner 1995), explaining why we found non-fertile matings. Gametic incompatibility, in which sperm is (for instance) physiologically incapable of fertilizing the eggs, has occasionally been reported in Lepidoptera (Dopman et al. 2010). Further laboratory studies are needed on the mechanisms underlying the sexual isolation between allopatric populations in *L. botrana*.

Our results provide reproduction-based evidence supporting the suggestion that the three populations of *L. botrana* studied belong to three reproductively isolated cryptic species. Cryptic species exhibit few if any differences in morphology, but can have very distinct mating signals (e.g. differences in pheromone composition) leading to ambiguous mate recognition and partial sexual isolation. Future studies should investigate the genetic differentiation of *L. botrana* moths derived from different allopatric populations over a wide geographical area, and the sex pheromone composition of females. Our study revealed the potential occurrence of speciation in allopatric populations, but what about sympatric populations, at a local scale?

Reproductive isolation in sympatric populations

Many studies have reported the presence of sympatric host races among phytophagous insects using different host plant species, including the larch budmoth (*Zeiraphera diniana*; Emelianov et al. 2001, 2003), the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*; Malausa et al. 2005), and the ladybird beetle (*Henosepilachna diekei*; Matsubayashi et al. 2013). However, we found no evidence for sympatric host race formation in *L. botrana* species originated from different grape cultivars separated by several meters in the same vineyard. Indeed, the index of sexual isolation between moths from different cultivars was non-significant, suggesting completely random mating occurred between partners from the different cultivars. In our experiment the moth larvae came from several cultivars of only one host plant species (*V. vinifera*) grown in close proximity. Thus, males and females were likely to encounter and recognize potential mates from the various cultivars, because of their geographical and chemical proximity. This is different from the studies cited above, in which host race formation was demonstrated at a much larger scale, using insects that are highly specialized on particular host plants belonging to different species; in this situation the degree of specialization may be greater than for insects exploiting closely related cultivars of host plants.

However, we demonstrated that heterotypic partners had a longer latency period prior to mating than did homotypic partners. This may reflect a greater reluctance of males and/or females to mate heterospecifically than is indicated by the index of sexual isolation (Baur & Baur 1992). These findings may also help explain reproductive isolation in nature, because heterotypic courtships last longer and are more likely to be interrupted. This may reflect ecologically-mediated divergence in mating signals between individuals derived from different cultivars. In our study the random mating pattern could be in part a result of the no-choice experimental design used. Subjects in no-choice tests are unlikely to reject a mating opportunity because the likelihood of other opportunities is unknown, so the risk of

remaining unmated is high. Thus, in the no-choice experimental design individuals may be less likely to exhibit mating preference, and be more likely to mate randomly (Barry & Kokko 2010, Booksmythe et al. 2011). The strength of mating preferences can vary greatly under different experimental designs (Dougherty & Shuker 2014), and several studies have shown that choice experiments lead to higher estimates of sexual isolation than no-choice experiments (Coyne et al. 2005, Jennings et al. 2011). Further studies using choice design may be useful in this moth species for detecting mating preferences based on host plant cultivar, and to assess the occurrence of assortative mating under natural conditions.

At the premating level, our results did not enable detection of the occurrence of ecological speciation at the cultivar scale, but we found evidence for the beginning of premating isolation through the latency period prior to mating, which was longer for heterotypic than homotypic pairs, particularly for individuals from the cultivar Carignan. Moreover, males from Carignan had a higher mating success with females from Carignan than with females from Syrah. It is possible that specialization on certain cultivars (*e.g.* Carignan) may be more advanced than others, and our results suggested that the degree of assortative mating in *L. botrana* species could be mediated by host cultivar. Moreover, we know that females preferred to lay eggs on the same cultivar on which they were reared as larvae (*i.e.* NHPI) (Moreau et al. 2008). However, despite the occurrence of NHPI, some cultivars were intrinsically more attractive than others, suggesting that plant quality *per se* could influence mating patterns and assortative mating in this species.

At the postmating level we found no postmating prezygotic effect, as the fecundity and fertility did not vary according the different pairs of individuals. This suggests that postcopulatory mechanisms in *L. botrana*, including mechanical isolation, gametic incompatibility, and hybrid mortality, are not strongly developed between pairs of individuals from different host cultivars. The absence of postcopulatory isolation is common in sympatry (Elzinga et al. 2014), and prezygotic barriers are usually the most important in the early stages of speciation (Husband & Sabara 2004, Mendelson et al. 2007, Schwander et al. 2008).

In summary, we did not find sympatric host race formation in *L. botrana*, despite a longer period of latency prior to mating in heterotypic matings, which may reflect a greater reluctance of males and/or females to mate. However, we demonstrated the occurrence of non-random mating patterns between different allopatric populations, suggesting the beginning of reproductive isolation, which could lead to the evolution of cryptic species of this pest. Further studies of the genetic differentiation of *L. botrana* derived from different allopatric populations over a wide geographical area are required.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Delbac, J. Oustric, D. Richy and M. Guisset for their valuable experimental assistance. This study was supported by the CNRS and grants from the ANR (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006). We also thank the Conseil Régional of Aquitaine, the Conseil Régional of Bourgogne, the Chambre d'Agriculture des Bouches-du-Rhône, du Gard and des Pyrénées-Orientales. The second author is associated with the Labex Cote research programme.

REFERENCES

- Balachowsky A., Mesnil L.** (1935). *Les insectes nuisibles aux plantes cultivées, leurs mœurs, leur destruction*. Busson, Paris, France
- Barluenga, M., Stölting, K. N., Salzburger, W., Muschick, M., & Meyer, A.** (2006). Sympatric speciation in Nicaraguan Crater Lake cichlid fish. *Nature*, 439, 719-723.
- Barracough, T. G., & Vogler, A. P.** (2000). Detecting the geographical pattern of speciation from species-level phylogenies. *The American Naturalist*, 155, 419-434.
- Barry, K. L., & Kokko, H.** (2010). Male mate choice: why sequential choice can make its evolution difficult. *Animal Behaviour*, 80, 163-169.
- Baur, B., & Baur, A.** (1992). Reduced reproductive compatibility in *Arianta arbustorum* (Gastropoda) from distant populations. *Heredity*, 69, 65-72.
- Berlocher, S. H., & Feder, J. L.** (2002). Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy?. *Annual Review of Entomology*, 47, 773-815.
- Bolnick, D. I., & Fitzpatrick, B. M.** (2007). Sympatric speciation: models and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 459-487.
- Boo, K. S.** (1998). Variation in sex pheromone composition of a few selected lepidopteran species. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 1, 17-23.
- Booksmythe, I., Jennions, M. D., & Backwell, P. R.** (2011). Male fiddler crabs prefer conspecific females during simultaneous, but not sequential, mate choice. *Animal Behaviour*, 81, 775-778.
- Bush, G. L.** (1969). Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera, Tephritidae). *Evolution*, 237-251.
- Caillaud, M. C., & Via, S.** (2000). Specialized feeding behavior influences both ecological specialization and assortative mating in sympatric host races of pea aphids. *The American Naturalist*, 156, 606-621.

- Carvajal-Rodriguez, A., & Rolan-Alvarez, E.** (2006). JMATING: a software for the analysis of sexual selection and sexual isolation effects from mating frequency data. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 40.
- Coyne, J. A.** (1992). Genetics and speciation. *Nature*, 355, 511-515.
- Coyne, J. A., & Orr, H. A.** (2004). *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Coyne, J. A., Elwyn, S., & Rolán-Alvarez, E.** (2005). Impact of experimental design on *Drosophila* sexual isolation studies: direct effects and comparison to field hybridization data. *Evolution*, 59, 2588-2601.
- Dieckmann, U., & Doebeli, M.** (1999). On the origin of species by sympatric speciation. *Nature*, 400, 354-357.
- Dopman, E. B., Robbins, P. S., & Seaman, A.** (2010). Components of reproductive isolation between North American pheromone strains of the European corn borer. *Evolution*, 64, 881-902.
- Dougherty, L. R., & Shuker, D. M.** (2014). The effect of experimental design on the measurement of mate choice: a meta-analysis. *Behavioral Ecology*, 26, 311-319.
- Drès, M., & Mallet, J.** (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, 471-492.
- Eichhorn, K. W., & Lorenz, D. H.** (1977). Phanologische entwicklungsstadien der rebe. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 29, 119-120.
- El-Sayed, A., Gødde, J., Witzgall, P., & Arn, H.** (1999). Characterization of pheromone blend for grapevine moth, *Lobesia botrana* by using flight track recording. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 389-400.
- Elzinga, J. A., Mappes, J., & Kaila, L.** (2014). Pre-and post-mating reproductive barriers drive divergence of five sympatric species of Naryciinae moths (Lepidoptera: Psychidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 112, 584-605.
- Emelianov, I., Drès, M., Baltensweiler, W., & Mallet, J.** (2001). Host-induced assortative mating in host races of the Larch Budmoth. *Evolution*, 55, 2002-2010.
- Emelianov, I., Simpson, F., Narang, P., & Mallet, J.** (2003). Host choice promotes reproductive isolation between host races of the larch budmoth *Zeiraphera diniana*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 208-218.
- Feder, J. L.** (1998). The apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*: Flies in the face of conventional wisdom about speciation. In *Endless forms: species and speciation* (Eds. Howard D & Berlocher SH). Oxford University Press, New York, USA.
- Forstmeier, W., & Schielzeth, H.** (2011). Cryptic multiple hypotheses testing in linear models: overestimated effect sizes and the winner's curse. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65, 47-55.

- Funk, D. J.** (1998). Isolating a role for natural selection in speciation: host adaptation and sexual isolation in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. *Evolution*, 52, 1744-1759.
- Funk, D. J., Filchak, K. E., & Feder, J. L.** (2002). Herbivorous insects: model systems for the comparative study of speciation ecology. In *Genetics of Mate Choice: From Sexual Selection to Sexual Isolation*. Springer, Netherlands.
- Gabel, B., & Thiéry, D.** (1994). Non-host plant odor (*Tanacetum vulgare*; Asteraceae) affects the reproductive behavior of *Lobesia botrana* Den. et Schiff (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Behavior*, 7, 149-157.
- Gilligan, T. M., Epstein, M. E., Passoa, S. C., Powell, J. A., Sage, O. C., & Brown, J. W.** (2011). Discovery of *Lobesia botrana* ([Denis & Schiffermüller]) in California: An Invasive Species New to North America (Lepidoptera: Tortricidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 113, 14-30.
- Gregory, P. G., & Howard, D. J.** (1994). A postinsemination barrier to fertilization isolates two closely related ground crickets. *Evolution*, 48, 705-710.
- Herndon, L. A., & Wolfner, M. F.** (1995). A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 10114-10118.
- Husband, B. C., & Sabara, H. A.** (2004). Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist*, 161, 703-713.
- Jaenike, J.** (1990). Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21, 243-273.
- Jennings, J. H., Mazzi, D., Ritchie, M. G., & Hoikkala, A.** (2011). Sexual and postmating reproductive isolation between allopatric *Drosophila montana* populations suggest speciation potential. *BMC evolutionary biology*, 11, 68.
- Jennings, J. H., Snook, R. R., & Hoikkala, A.** (2014). Reproductive isolation among allopatric *Drosophila montana* populations. *Evolution*, 68, 3095-3108.
- Jiang, Y., Bolnick, D. I., & Kirkpatrick, M.** (2013). Assortative mating in animals. *The American Naturalist*, 181, E125-E138.
- Kawazu, K., Hasegawa, J. I., Honda, H., Ishikawa, Y., Wakamura, S., Sugie, H., Kamiwada, H., Kamimuro, T., Yoshiyasu, Y. & Tatsuki, S.** (2000). Geographical variation in female sex pheromones of the rice leaffolder moth, *Cnaphalocrocis medinalis*: identification of pheromone components in Japan. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 96, 103-109.
- Liu, X.-P., Tu, X.-Y., He, H.-M., Chen, C. and Xue, F.-S.** (2014). Comparison of sexual compatibility in crosses between the southern and northern populations of the cabbage beetle *Colaphellus bowringi*. *Insect Science*, 21, 775-784
- Maan, M. E., & Seehausen, O.** (2011). Ecology, sexual selection and speciation. *Ecology Letters*, 14, 591-602.

- Maher, N., & Thiéry, D.** (2003). Bunch extracts of *Vitis vinifera* at different development stages stimulate or deter oviposition in *Lobesia botrana* females. *IOBC/WPRS Bulletin*, 26, 135-140.
- Maher, N., & Thiéry, D.** (2004). Distribution of chemo-and mechanoreceptors on the tarsi and ovipositor of female European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 110, 135-143.
- Maher, N., & Thiéry, D.** (2006). *Daphne gnidium*, a possible native host plant of the European grapevine moth *Lobesia botrana*, stimulates its oviposition. Is a host shift relevant?. *Chemoecology*, 16, 135-144.
- Maher, N., Thiéry, D., & Städler, E.** (2006). Oviposition by *Lobesia botrana* is stimulated by sugars detected by contact chemoreceptors. *Physiological Entomology*, 31, 14-22.
- Malausa, T., Bethenod, M. T., Bontemps, A., Bourguet, D., Cornuet, J. M., & Ponsard, S.** (2005). Assortative mating in sympatric host races of the European corn borer. *Science*, 308, 258-260.
- Masante-Roca, I., Gadenne, C., & Anton, S.** (2002). Plant odour processing in the antennal lobe of male and female grapevine moths, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Physiology*, 48, 1111-1121.
- Matsubayashi, K. W., Kahono, S., & Katakura, H.** (2013). Divergent host plant preference causes assortative mating between sympatric host races of the ladybird beetle, *Henosepilachna diekei*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 110, 606-614.
- Matsubayashi, K. W., Ohshima, I., & Nosil, P.** (2010). Ecological speciation in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 134, 1-27.
- Mayr, E.** (1963). *Animal species and their evolution*. Belknap Press, Cambridge.
- Mendelson, T. C., Imhoff, V. E., & Venditti, J. J.** (2007). The accumulation of reproductive barriers during speciation: postmating barriers in two behaviorally isolated species of darters (Percidae: Etheostoma). *Evolution*, 61, 2596-2606.
- Moreau, J., Rahme, J., Benrey, B., & Thiéry, D.** (2008). Larval host plant origin modifies the adult oviposition preference of the female European grapevine moth *Lobesia botrana*. *Naturwissenschaften*, 95, 317-324.
- Moreau, J., Thiéry, D., Troussard, J. P., & Benrey, B.** (2007). Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology*, 32, 747-753.
- Muller, K., Thiéry, D., Moret, Y., & Moreau, J.** (2015) Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69, 39-47.
- Munoz, A. G., Salazar, C., Castano, J., Jiggins, C. D., & Linares, M.** (2010). Multiple sources of reproductive isolation in a bimodal butterfly hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology*, 23, 1312-1320.

- Nosil, P.** (2007). Divergent host plant adaptation and reproductive isolation between ecotypes of *Timema cristinae* walking sticks. *The American Naturalist*, 169, 151-162.
- Nosil, P.** (2012). *Ecological speciation*. Oxford University Press, New York, USA
- Papadopoulos, A. S., Baker, W. J., Crayn, D., Butlin, R. K., Kynast, R. G., Hutton, I., & Savolainen, V.** (2011). Speciation with gene flow on Lord Howe Island. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 13188-13193.
- Price, C. S., Kim, C. H., Gronlund, C. J., & Coyne, J. A.** (2001). Cryptic reproductive isolation in the *Drosophila simulans* species complex. *Evolution*, 55, 81-92.
- Price, D. K., & Boake, C. R.** (1995). Behavioral reproductive isolation in *Drosophila silvestris*, *D. heteroneura*, and their F1 hybrids (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Behavior*, 8, 595-616.
- R Core Team** (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ramsey, J., Bradshaw, H. D., & Schamske, D. W.** (2003). Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution*, 57, 1520-1534.
- Rhainds, M.** (2010). Female mating failures in insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 136, 211-226.
- Roelofs, W., Kochansky, J., Carde, R., Arn, H., & Rauscher, S.** (1973). Sex attractant of the grape vine moth, *Lobesia botrana*. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 46, 71-73.
- Rundle, H. D., & Nosil, P.** (2005). Ecological speciation. *Ecology letters*, 8, 336-352
- Schluter, D.** (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 372-380.
- Schluter, D., & Conte, G. L.** (2009). Genetics and ecological speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 9955-9962.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J., & Dicke, M.** (2005). *Insect-plant biology*. Oxford University Press, New York, USA.
- Schwander, T., Suni, S. S., Cahan, S. H., & Keller, L.** (2008). Mechanisms of reproductive isolation between an ant species of hybrid origin and one of its parents. *Evolution*, 62, 1635-1643.
- Servedio, M. R., Doorn, G., Kopp, M., Frame, A. M., & Nosil, P.** (2011). Magic traits in speciation: 'magic' but not rare?. *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 389-397.
- Thiéry, D.** (2008). Les tordeuses nuisibles à la vigne. *Féret Publication, Bordeaux, France*.
- Torres-Vila, L. M., Stockel, J., Roehrich, R., & Rodríguez-Molina, M. C.** (1997). The relation between dispersal and survival of *Lobesia botrana* larvae and their density in vine inflorescences. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 84, 109-114.

- Turelli, M., Barton, N. H., & Coyne, J. A.** (2001). Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 330-343.
- Varela, L. G., Smith, R. J., Cooper, M. L., & Hoenisch, R. W.** (2010). European grapevine moth, *Lobesia botrana*. Napa Valley vineyards. *Practical Winery & Vineyard Journal*.
- Via, S.** (2001). Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 381-390.
- Warton, D. I., & Hui, F. K.** (2011). The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology*, 92, 3-10.
- Witzgall, P., Tasin, M., Buser, H. R., Wegner-Kiß, G., Mancebón, V. S. M., Ioriatti, C., & Francke, W.** (2005). New pheromone components of the grapevine moth *Lobesia botrana*. *Journal of chemical ecology*, 31, 2923-2932.
- Xue, H. J., Li, W. Z., & Yang, X. K.** (2014). Assortative mating between two sympatric closely-related specialists: inferred from molecular phylogenetic analysis and behavioral data. *Scientific reports*, 4, 5436.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence l'importance du rôle du mâle, à travers l'apport de cadeaux nuptiaux aux femelles lors de l'accouplement, dans les stratégies de reproduction des insectes phytophages. En effet, en plus de dépendre intimement des plantes qu'elles exploitent au cours de leur vie (Awmack & Leather 2002), l'aptitude phénotypique des femelles phytophages devrait aussi largement être contrainte par la qualité de leurs partenaires sexuels, qui sont capables de leur procurer de nombreux bénéfices directs et indirects lors de l'accouplement. Dans ce contexte, je me suis intéressée à une espèce de ravageur phytophage de la vigne, l'Eudémis (*L. botrana*) chez laquelle j'ai cherché à identifier les principaux facteurs responsables des variations dans le succès reproducteur des mâles et des femelles, en mettant en lumière l'importance du cépage d'origine des partenaires sexuels. Afin d'avoir une vision intégrative de l'influence des facteurs écologiques sur les stratégies de reproduction chez cette espèce, il était en effet nécessaire de prendre en compte l'influence du cépage de vigne dans les interactions entre les deux partenaires sexuels.

Chez cette espèce à reproduction sur capital, l'effet du cépage de vigne sur l'aptitude phénotypique des femelles a été largement exploré (11 publications depuis 1998), la nutrition larvaire sur des plantes de différentes qualités contraignant fortement la quantité (en nombre de larves viables) et la qualité (meilleure survie et meilleur développement larvaire) des descendants produits par les femelles (Moreau et al. 2006^{a,b,c}, Moreau et al. 2007, Moreau et al. 2008). De plus, une précédente étude a démontré que le potentiel reproductif des femelles dépendait également du cépage d'origine de leur partenaire sexuel, suggérant un impact potentiel des mâles – via leur nutrition larvaire sur différents cépages – sur la fécondité et la fertilité des femelles (Moreau et al. 2007). Au cours de cette thèse, je me suis donc particulièrement focalisée sur le compartiment mâle, trop souvent occulté dans les études s'intéressant aux relations plantes-insectes. J'ai ainsi pu déterminer comment la qualité du mâle, à travers la qualité de son éjaculat, pouvait influencer l'aptitude phénotypique des femelles, en intégrant les pressions de sélection exercées par la plante hôte sur les deux sexes.

La discussion de mes résultats s'articulera en deux volets, le premier fondamental détaillera les différentes pressions de sélection modulant l'aptitude phénotypique des mâles et des femelles et conduisant à l'évolution de stratégies de reproduction et de choix de partenaire chez cette espèce. Le second volet se verra plus appliqué et soulignera l'importance d'intégrer l'effet mâle dans les programmes de lutte contre les espèces nuisibles pour les cultures et plus particulièrement contre ce ravageur de la vigne.

1. RÔLE DU MÂLE CHEZ LES ESPÈCES PHYTOPHAGES

1.1 LE SPERMATOPHORE : UN PAQUET RICHE EN BÉNÉFICES POUR LA FEMELLE

Dans le Chapitre III, nous avons tout d'abord montré que le potentiel reproductif des femelles chez *Eudémis* était directement lié à l'obtention de bénéfices directs à travers de gros spermatophores, les femelles accouplées avec des mâles vierges produisant plus de descendants que celles s'accouplant avec des mâles non-vierges. En effet, l'expérience sexuelle du mâle chez cette espèce est un facteur crucial modulant la taille de son éjaculat, le spermatophore d'un mâle vierge étant cinq fois plus gros que celui d'un mâle déjà accouplé. Ce résultat est cohérent avec le système de reproduction monandre de cette espèce (Torres-Vila et al. 2004), les femelles ne s'accouplant qu'une seule fois au cours de leur vie lorsqu'elles reçoivent un premier spermatophore riche en nutriments de la part de mâles vierges. Ainsi, les mâles vierges qui investissent beaucoup de ressources dans leur premier éjaculat ont une forte certitude de paternité (Bissoondath & Wiklund 1995, Wedell et al. 2002, Vahed 2006), les femelles n'étant ensuite plus motivées à se réaccoupler jusqu'à la fin de leur vie (Chapitre III).

Une des questions évolutives majeures sur les espèces produisant des cadeaux nuptiaux est de savoir si la balance entre les coûts et les bénéfices pour les femelles à recevoir de telles offrandes nutritives est positive, négative ou neutre, un sujet qui est encore aujourd'hui largement discuté (Gwynne et al. 2008, Sakaluk et al. 2006, Vahed 2007). Dans la plupart des systèmes étudiés, il n'y a tout simplement pas assez de données empiriques pour répondre à cette question (Gwynne 2008, Lewis & South 2012), la majorité des expériences ne testant les effets des offrandes nutritives que sur quelques traits d'histoire de vie des femelles. Seules des études intégratives mesurant simultanément les effets des cadeaux nuptiaux sur une large gamme de réponse des femelles (telles que leur fécondité, leur fertilité, leur longévité, leur motivation à se réaccoupler...) peuvent permettre de tirer des conclusions fiables sur l'impact global de ces offrandes nutritives sur l'aptitude phénotypique des femelles. Chez *Eudémis*, il apparaît évident que les spermatophores représentent des bénéfices nutritifs directs importants, en raison de leurs effets positifs sur plusieurs traits reproductifs des femelles (Chapitre III et IV). Dans le Chapitre III, à travers une étude fine de la dynamique de ponte des femelles, nous avons démontré que les femelles ayant reçu de gros spermatophores pondaient plus d'œufs en fin de vie comparativement à des femelles recevant de petits spermatophores. Ces résultats suggèrent que ces dernières sont capables de remobiliser les nutriments présents dans le spermatophore pour augmenter leur fécondité, une supposition cohérente avec les travaux qui, à l'aide de composés radioactifs, ont tracé la destinée des

nutriments depuis le spermatophore jusqu'aux œufs produits par les femelles (Boggs 1997^b, Rooney & Lewis 1999, Wedell & Karlsson 2003). Ainsi nos résultats tendent à montrer, comme chez d'autres espèces à reproduction sur capital (Rooney & Lewis 1999, South & Lewis 2011), que la plupart des nutriments dérivés du spermatophore sont réinvestis dans la production d'œufs (gain en fécondité) mais pas dans la maintenance somatique (pas de gain en longévité). Une étude comparant deux espèces de Coléoptères a notamment révélé que l'allocation des nutriments dérivés du spermatophore dans les différentes fonctions des femelles dépendait des traits d'histoire de vie de ces deux espèces (Rooney & Lewis 1999). Chez la luciole *Photinus ignitus*, une espèce à reproduction sur capital vivant peu de temps, la majorité des nutriments est réinvestie dans la maturation des ovocytes alors que chez la luciole à bordure orange *Ellychnia corrusca*, une espèce s'alimentant à l'état adulte et vivant plus longtemps, une grande proportion des nutriments est réallouée à la maintenance somatique (Rooney & Lewis 1999). Ainsi, les stratégies d'allocation des nutriments procurés par le spermatophore dépendent du contexte écologique et notamment de la stratégie d'alimentation (« *income vs capital breeders* ») et une analyse comparative sur de multiples espèces se situant à différents niveaux du gradient « *income-capital* » nous permettrait de confirmer ces résultats à plus large échelle.

Chez *L. botrana*, l'investissement du mâle dans la production de spermatophores, en plus d'être influencé par son expérience sexuelle, dépend aussi fortement de sa condition, elle-même largement contrainte par sa nutrition larvaire sur différents cépages de vigne (Chapitre IV). Dans le paragraphe suivant, les effets de la nutrition larvaire des mâles sur leurs performances reproductives seront envisagés à travers les contraintes imposées par les différents cépages de vigne sur la condition des mâles, c'est-à-dire leur « *capacité relative à maintenir une fonctionnalité optimale de leur système vital* » (Hill 2011).

1.2 LE SPERMATOPHORE : UN LARGE INVESTISSEMENT CONDITION-DÉPENDANT MODULÉ PAR LE CÉPAGE DE VIGNE

Chez les espèces à reproduction sur capital, les mâles investissent la majeure partie des réserves qu'ils ont accumulées pendant leur développement larvaire dans leur premier accouplement et notamment dans la production de leur premier éjaculat (Boggs 1990, Boggs & Freeman 2005, Jervis et al. 2007). En raison de l'importance du premier accouplement chez *Eudémis*, il était crucial d'identifier les facteurs écologiques influençant la reproduction chez cette espèce monandre, en considérant plus particulièrement l'impact de l'alimentation larvaire sur la quantité de ressources énergétiques des mâles à l'émergence. Ainsi, dans le

Chapitre IV, nous avons démontré que la nutrition larvaire sur différents cépages de vigne modulait la quantité de ressources énergétiques dont disposait les mâles à l'émergence (Chapitre IV.2), affectant ainsi leur condition corporelle (Chapitre IV.2), leur succès reproducteur (à travers la prise en compte de multiples traits, Chapitre IV.1, 2, 3) et engendrant d'importantes conséquences sur le potentiel reproductif des femelles (Chapitre IV.1, 2, 3). Le tableau 8 synthétise les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse. Il révèle à quel point la nutrition larvaire sur différents cépages de vigne influence la qualité des mâles et souligne l'importance de prendre en compte l'effet mâle quand on s'intéresse à l'évolution des populations de phytophages.

Tableau 8 : Synthèse de l'effet du cépage de vigne sur une multitude de traits reflétant la qualité du mâle et ses conséquences sur le potentiel reproductif des femelles chez *Eudémis* (Chapitre IV).

Traits mesurés	Effet du cépage de vigne	Articles concernés
Condition du mâle		
Masse de la chrysalide	Oui	Articles 2 et 4
Masse de l'adulte	Oui	Article 3
Condition corporelle	Oui	Article 3
Réserves énergétiques globales	Oui	Article 3
- Concentration en protéines	Oui	Article 3
- Concentration en lipides	Non	Article 3
- Concentration en glycogène	Oui	Article 3
Longévité des mâles	Oui	Article 4
Comportements précopulatoires		
Latence avant l'accouplement	Non	Article 2
Durée de l'accouplement	Oui	Article 2
Activité des mâles	Non	Article 2
Motivation sexuelle des femelles	Oui	Article 2
Performances reproductives des mâles		
Capacité maximale d'accouplement	Oui	Article 4, via la longévité
Volume du spermatophore	Oui	Articles 2, 3 et 4
Qualité du spermatophore	Oui	Article 3
Quantité de spermatozoïdes eupyrènes	Oui	Articles 2 et 4
Quantité de spermatozoïdes apyrènes	Non	Articles 2 et 4
Répercussions sur la reproduction des femelles		
Latence avec la 1 ^{ère} ponte	Oui	Article 3
Fécondité	Oui	Articles 2, 3 et 4
Fertilité	Oui & Non	Articles 2 et 4
Longévité	Non	Articles 2 et 3

Les trois études présentées dans le Chapitre IV indiquent de manière unanime que le cépage de vigne joue un rôle primordial dans le potentiel reproductif de cette espèce de ravageur phytophage (Tableau 8). Lors des premières expériences menées en populations naturelles en 2013, nous avons démontré que le cépage de vigne influençait les performances reproductives des mâles et leur investissement au cours d'éjaculats successifs (Chapitre IV.1 et IV.3, Tableau 8). Puis, une étude supplémentaire nous a permis de mettre en évidence à une échelle biochimique un peu plus fine, que cet effet du cépage sur les performances sexuelles des mâles était directement lié à la quantité de ressources énergétiques accumulées par ces mâles pendant leur développement larvaire (Chapitre IV. 2). Comme cela a été montré chez plusieurs espèces d'insectes, le succès reproducteur des mâles et leur capacité à obtenir des accouplements dépendent largement de leurs réserves énergétiques (Blay & Yuval 1997, Kehl et al. 2015). Dans notre étude, les mâles disposant des plus grandes réserves énergétiques qui sont fonction de leur cépage d'origine, produisent des spermatophores de meilleure qualité (contenant notamment beaucoup de protéines) que les mâles possédant peu de réserves. Ce résultat est cohérent avec la littérature et a été démontré chez plusieurs espèces de Lépidoptères (Watanabe & Hirota 1999, Ferkau & Fischer 2006, Lewis & Wedell 2007, Blanco et al. 2009) et chez une espèce d'Orthoptère, la sauterelle *Gampsocleis gratiosa* (Jia et al. 2000).

La qualité reproductive des mâles a souvent été approximée en mesurant la masse ou le volume de l'éjaculat produit ou en comptabilisant uniquement le nombre de spermatozoïdes transférés (Kelly & Jennions 2011, South & Lewis 2011). Or, certains auteurs suggèrent que la qualité de l'éjaculat ne se reflète pas nécessairement par sa taille mais plutôt par sa composition (Perry et al. 2013) et nos résultats appuient fortement ces suppositions. En effet, certains mâles produisent de petits spermatophores (*i.e.* les mâles provenant du Carignan) qui sont cependant très riches en protéines. Les femelles s'accouplant avec ces mâles ont une fécondité aussi importante que celles s'accouplant avec des mâles produisant de bien plus gros spermatophores et contenant la même quantité de protéines (*i.e.* les mâles issus du Grenache) (Chapitre IV.1 et IV.2). D'autres études ont également démontré que la taille du spermatophore n'était pas corrélée à sa qualité, souvent évaluée en mesurant son contenu en protéines (Bissondath & Wiklund 1995, Wedell & Ritchie 2004, Wigby et al. 2009). Nos résultats chez *L. botrana* confirment cette relation (Chapitre IV.2) et plus que la quantité, c'est bien la qualité du spermatophore qui explique la majeure partie de la variation observée dans le potentiel reproductif des femelles, les protéines du spermatophore étant des substances connues pour augmenter la fécondité des femelles (Wolfner 2002, Gillot 2003).

Parmi les composés de la plante susceptibles d'influencer la reproduction des insectes phytophages, l'azote, indispensable à la synthèse de protéines et d'acides nucléiques (Sterner & Elser 2002), apparaît comme un nutriment clé de la reproduction des adultes (Karlsson 1994, Boggs 1997^a). En effet, la production d'œufs par les femelles et d'éjaculats par les mâles sont des fonctions énergétiquement coûteuses et requièrent une grande quantité de protéines (Wheeler 1996, Mevi-Schütz & Erhardt 2003). Chez plusieurs espèces de Lépidoptères, il a été démontré que la nutrition larvaire azotée influençait la croissance des chenilles (Morehouse & Rutowski 2010, Cahenzli & Erhardt 2012^b), le potentiel reproductif des femelles via la production d'œufs (O'Brien et al. 2002) et la qualité des mâles en affectant des traits directement responsables de leur succès reproducteur, tels que la coloration des ailes et les cadeaux nuptiaux (Morehouse & Rutowski 2010, Tigreros 2013, Cordés et al. 2014). Chez Eudémis, l'azote disponible durant le développement larvaire semble également jouer un rôle primordial dans la reproduction des adultes puisque leurs performances sexuelles sont largement protéines-dépendantes (Chapitre IV.2). En effet, dans le Chapitre IV.2, les principales différences dans les ressources énergétiques des mâles se situent dans le contenu en protéines, les mâles disposant d'importantes quantités en protéines (*i.e.* les mâles provenant du Carignan) étant ceux qui ont les meilleures performances reproductives (en termes d'investissement dans la qualité du spermatophore et de descendants obtenus).

Cependant, malgré les larges besoins en nourriture azotée des insectes phytophages, les différents tissus des plantes ne contiennent paradoxalement qu'une faible fraction d'azote (entre 3 et 7 % maximum, Mattson et al. 1980, Elser et al. 2000), les cépages de vigne ne faisant pas exception (Stines et al. 2000). L'azote, en plus d'être un composé important pour le développement des phytophages est un élément chimique déterminant dans la qualité du raisin, surveillé de près par les viticulteurs (Osborne 2011). Ainsi, le niveau d'assimilation de l'azote par la vigne peut être influencé par de nombreux facteurs dans le vignoble comme la variété, le porte-greffe, le sol, le climat ou encore la saison (Bell & Henschke 2005). Plusieurs études rapportent que certains cépages comme la Syrah ou le Riesling ont naturellement une teneur faible en azote dans les baies comparés à des cépages comme le Sauvignon Blanc ou le Pinot Noir (Stines et al. 2000, Osborne 2011). Or c'est précisément sur ces cépages (Syrah et Riesling) que les performances reproductives des femelles et des mâles chez *L. botrana* sont les plus faibles (Riesling : Moreau et al. 2006^c, Moreau et al. 2007, Syrah : Chapitre IV.2 et V). Il est donc possible que le faible succès reproducteur des individus sur ces deux cépages soit directement lié à la faible teneur en azote de ces cépages, limitant la capacité des femelles à produire des œufs et celle des mâles à transférer de larges spermatophores.

De plus, d'autres nutriments comme le phosphore peuvent aussi influencer, conjointement avec les effets de l'azote, l'aptitude phénotypique des insectes (Huberty & Denno 2006). Par exemple, une nutrition larvaire supplémentée en phosphore augmente la survie (Ayres et al. 2000), le taux de croissance (Perkins et al. 2004, Apple et al. 2009) ou encore la fécondité (Popp et al. 1989) de certaines espèces d'insectes, modulant ainsi les densités de population (Schade et al. 2003). Par conséquent, plutôt que d'étudier l'effet de tel ou tel nutriment sur l'aptitude phénotypique des insectes, il apparaît nécessaire d'adopter une approche plus globale en considérant l'effet combiné de plusieurs nutriments. Chez Eudémis, nous pourrions ainsi déterminer comment la composition relative des baies en différents nutriments varie d'un cépage à l'autre et si ces différences dans l'environnement nutritif des larves sont bien à l'origine de la variation observée dans le potentiel reproductif des adultes. Par exemple, chez les insectes, le ratio glucides/protéines est un indicateur essentiel de la qualité de nourriture (Waldbauer et al. 1984, Behmer et al. 2002) et pourrait donc jouer un rôle important dans l'allocation des ressources dans les différents traits reproductifs des individus chez Eudémis. À l'instar des récentes études modulant les ratios entre les différents nutriments essentiels au développement et au succès reproducteur des adultes (Tigreros 2013, Cordés et al. 2014), nous pourrions élever des chenilles sur des alimentations à teneurs variables en nutriments essentiels correspondants aux ratios rencontrés dans différents cépages *in natura* et vérifier que les ressources énergétiques et les performances reproductives de ces insectes sont bien modulées par des variations dans la composition de leur nourriture.

En plus des effets sur les performances reproductives des mâles, la nutrition larvaire influence également leur longévité. Cette variation dans la longévité, induite par le cépage d'origine des mâles, se répercute sur leurs opportunités de reproduction en augmentant les probabilités de rencontrer plus de femelles au cours de leur vie (Chapitre IV.3). En effet, dans la nature, les mâles *L. botrana* ne peuvent s'accoupler qu'une seule fois par nuit (leur « *time out* » – *i.e.* le temps de récupération entre deux accouplements pendant lequel les mâles ne peuvent physiologiquement pas se réaccoupler – étant environ de 12 heures, observations personnelles). De plus, vivre plus longtemps peut aussi permettre aux mâles d'augmenter le temps de récupération entre deux accouplements et donc d'investir un peu plus de ressources dans les accouplements successifs (Bissoondath & Wiklund 1996). En effet, plus l'intervalle est long entre deux accouplements et plus les mâles sont capables de reformer de plus gros spermatophores (LaMunyon & Eisner 1994). Ces résultats soulignent qu'en fonction de leurs réserves énergétiques, les mâles peuvent investir soit directement dans la reproduction, en

allouant beaucoup de ressources dans leur spermatophore, soit indirectement en prolongeant leur longévité, augmentant potentiellement leur nombre d'opportunités de reproduction.

D'une manière plus générale, la théorie prédit que des changements dans la quantité et/ou la qualité des ressources devraient conduire à des compromis d'allocation d'énergie entre les différents traits d'histoire de vie des individus (Stearns 1992, Boggs 2009). Le Chapitre IV démontre clairement qu'en fonction de leur cépage d'origine, les adultes disposent à l'émergence de quantités variables de ressources à investir dans leur reproduction. Ainsi, les mâles qui émergent avec de larges réserves énergétiques (les mâles provenant du Grenache) peuvent investir à la fois dans la maintenance somatique (en vivant plus longtemps) et dans la reproduction (en produisant des spermatophores de qualité). En revanche, les mâles qui ne disposent que de peu d'énergie à l'émergence doivent faire face à des compromis d'allocation de ressources entre leurs différentes fonctions, voire même entre différents traits au sein d'une même fonction. Ainsi, les mâles de faible condition (qui se sont développés sur une alimentation larvaire suboptimale), doivent généralement choisir entre investir dans la reproduction présente vs les futures reproductions (Roff 2002, Boggs 2009). Par exemple chez plusieurs espèces de Coléoptères du genre *Onthophagus*, les mâles peuvent allouer de l'énergie soit dans les traits nécessaires à l'attraction du partenaire, soit dans leurs éjaculats en fonction de la disponibilité en certains nutriments (Simmons & Emlen 2006).

L'étude du Chapitre IV.2 démontre indirectement ce compromis entre investissement dans la reproduction « présente vs future », puisque en fonction de leur cépage d'origine, les mâles investissent soit dans la qualité de leur spermatophore, affectant leur nombre de descendants pendant la reproduction présente (*i.e.* mâles provenant du Carignan), soit dans leur condition corporelle, influençant potentiellement leur capacité de vol et donc peut-être leur probabilité de trouver des partenaires pour de futures opportunités d'accouplements (*i.e.* mâles provenant de la Syrah). Enfin, ces deux stratégies d'allocation des ressources, en plus de dépendre de la condition des mâles, devraient également être contraintes par les taux de rencontre entre individus en populations naturelles. En effet, si les probabilités de rencontre entre partenaires potentiels sont très faibles (faible densité et/ou sex-ratio opérationnelle mâle biaisée), les mâles devraient privilégier l'investissement dans la reproduction « présente » une fois une femelle localisée. En revanche, si les taux de rencontre sont élevés (augmentant la probabilité de trouver des femelles), les mâles pourraient investir dans leur maintenance somatique augmentant ainsi leur longévité afin de maximiser le nombre d'opportunités de reproduction « futures ».

Dans notre étude, les mesures de ressources énergétiques et de qualité reproductive des mâles n'ont pas été réalisées sur les mêmes individus, nous permettant seulement d'inférer l'existence de compromis au niveau populationnel (*i.e.* entre populations se nourrissant sur différents cépages) mais pas au niveau individuel (*i.e.* une allocation des ressources modulée en fonction de la condition des individus). De la même manière, plusieurs études rapportent l'existence de compromis à une échelle populationnelle entre différents traits en lien avec la nutrition larvaire des individus, par exemple entre la reproduction et la maintenance somatique (Lee et al. 2008, Maklakov et al. 2008). On peut légitimement se demander si ces différences de répartition des ressources observées à l'échelle populationnelle, existent au niveau individuel. Par exemple, est-ce que les individus qui investissent le plus dans une fonction reproductive (comme la production d'un gros spermatophore) payent un plus fort coût de maintenance somatique (comme une diminution de longévité ou une réduction de la condition corporelle) ? Pour démontrer l'existence de tels compromis à une échelle individuelle, nous pourrions accoupler une première fois les mâles pour obtenir leurs performances sexuelles puis mesurer leurs ressources énergétiques en s'assurant que la perte d'énergie liée au premier accouplement soit similaire entre mâles provenant de différents cépages. Pour cela, il suffirait de comparer le niveau de ressources énergétiques des mâles non-vierges à celui dont disposent les mâles vierges à l'émergence en fonction de leur cépage d'origine (mesuré dans le Chapitre IV. 2).

La reproduction chez *Eudemis* est donc intimement liée à la qualité du cépage sur lequel les larves effectuent leur développement. Ainsi, l'aptitude phénotypique des mâles chez cette espèce dépend directement des ressources accumulées pendant leur développement larvaire, leur qualité reproductive affectant en retour l'aptitude phénotypique des femelles. Puisque les femelles obtiennent des bénéfices directs en s'accouplant avec des partenaires capables de leur offrir des ressources augmentant leur potentiel reproductif, elles devraient préférentiellement s'accoupler avec les mâles de « bonne qualité » leur procurant le plus de ressources nutritives (Kokko et al. 2003, Jones & Ratterman 2009). Les résultats obtenus dans les Chapitres III et IV nous permettent de conclure sur le fait qu'un « bon » mâle en tant que partenaire sexuel chez *Eudemis* est un mâle vierge, capable de produire un spermatophore riche en nutriments à l'aide des ressources qu'il aura accumulé pendant son développement larvaire en se nourrissant de baies de cépages.

1.3 BÉNÉFICES DIRECTS ET CHOIX DE PARTENAIRE

Nous avons montré que la capacité des mâles à procurer des bénéfices nutritifs à travers leur investissement dans le spermatophore était variable en fonction de leur expérience sexuelle (vierge vs non-vierge) (Chapitre III) et de leur condition (directement liée aux ressources énergétiques cumulées pendant leur développement larvaire, Chapitre IV), et avait d'importantes répercussions sur l'aptitude phénotypique des femelles. Ainsi, chez cette espèce, les femelles devraient adopter des stratégies de choix de partenaire afin de maximiser leur potentiel reproductif à travers l'obtention de larges bénéfices directs, en se basant sur l'expression de traits reflétant la qualité des ressources offertes par les mâles. Si l'importance de l'évolution des préférences à travers les bénéfices indirects a reçu énormément d'attention au cours des trente dernières années (Kokko et al. 2003, Kotiaho & Puurtinen 2007, Slatyer et al. 2012), en revanche il n'y a eu que très peu de discussions à propos de l'importance des bénéfices directs et de leur rôle dans l'évolution des stratégies de choix de partenaire (Jones & Ratterman 2009, Wagner 2011). Ce rôle des bénéfices directs a souvent été considéré comme relativement simple et conceptuellement inintéressant comparativement à celui des bénéfices indirects, qui a reçu une attention considérable principalement à travers la théorie des « bons gènes » (Iwasa & Pomiankowski 1999, Kokko et al. 2003, Kokko et al. 2006). Ainsi, la surabondance des études ayant cherché à identifier les mécanismes sous-jacents à l'hypothèse des bons gènes (Iwasa & Pomiankowski 1999, Møller & Alatalo 1999, Charmantier & Sheldon 2006) explique certainement pourquoi le rôle des bénéfices directs dans les choix de partenaire reste aujourd'hui conceptuellement sous-développé, même si de récents modèles commencent à les prendre en compte (Jones & Ratterman 2009, Etienne et al. 2014).

Dans le Chapitre III, nous avons mis en évidence à l'aide de tests de choix, une préférence des femelles pour les mâles vierges (préférés dans 70% des cas) suggérant que ces dernières sont capables de discriminer la qualité du mâle en se basant sur leur expérience sexuelle. Si les femelles peuvent directement évaluer certains bénéfices directs avant l'accouplement (comme la qualité de territoire ou les cadeaux nuptiaux externes), elles ne sont pas capables d'évaluer les bénéfices offerts une fois l'accouplement commencé (par exemple via les spermatophores), ni ceux procurés après l'accouplement (notamment à travers les soins parentaux). Quand elles ne peuvent pas évaluer directement la qualité des bénéfices avant la copulation, les femelles évaluent parfois indirectement ces bénéfices en se basant sur des signaux reflétant la qualité des mâles en tant que partenaires sexuels (Knapp & Kovach 1991, Wagner & Harper 2003). Dans le Chapitre III, être un mâle vierge est gage d'une

bonne qualité (Chapitres III et IV.3) et les femelles devraient donc sélectionner les mâles selon des traits reflétant leur virginité. Une des premières hypothèses est que les mâles vierges sont peut-être de meilleurs compétiteurs et parviennent plus facilement à s'accoupler avec les femelles que les mâles non-vierges. Certaines études démontrent que le niveau d'activité des mâles joue un rôle important dans leur succès d'accouplement (Kotiaho 2002, Scharf et al. 2013). Les mâles non-vierges, ayant déjà investi beaucoup d'énergie dans leur précédente copulation, pourraient être physiquement incapables de produire le même niveau de parade précopulatoire que les mâles vierges plein de vigueur (Janowitz & Fisher 2010). Cependant, chez *Eudemis*, les niveaux d'activité des mâles vierges et non-vierges (s'étant même accouplés plusieurs fois) sont similaires, les mâles non-vierges se révélant aussi actifs que les mâles vierges (Chapitre III et Chapitre IV.3). *A priori*, les femelles ne semblent donc pas se baser sur un critère comportemental pour rejeter les tentatives d'accouplement des mâles non-vierges.

Chez les insectes, le mode principal de communication est chimique (Davie et al. 2010, Wyatt 2014) et les indices chimiosensoriels peuvent être utilisés par les deux sexes pour extraire des informations complexes sur leur partenaire sexuel potentiel (Harris & Moore 2005). En effet la communication sexuelle chimique, en plus d'influencer la probabilité de trouver des partenaires sexuels dans des environnements hétérogènes à faible densité de population, augmente également le succès reproducteur des individus en influençant les choix de partenaire (Maynard-Smith & Harper 2003, Johansson & Jones 2007). Ainsi, il est possible que les mâles non-vierges soient imprégnés de phéromones et d'hydrocarbures cuticulaires provenant de leur première partenaire sexuelle. Ces mâles « parfumés avec des odeurs de femelles » pourraient donc être reconnus et évités par les femelles afin de minimiser les coûts à s'accoupler avec des mâles dont les stocks spermatiques sont diminués. De nombreuses études rapportent, dans l'autre sens, que les mâles sont capables de détecter chimiquement si les femelles se sont déjà accouplées ou non et de les éviter le cas échéant (Thomas 2011 et Ingleby 2015 pour 2 revues). Par exemple il a été encore récemment démontré que les mâles augmentaient leur investissement dans l'éjaculat en présence de femelles « parfumées » avec des hydrocarbures cuticulaires de mâles rivaux, afin d'augmenter leur probabilité de féconder les œufs des femelles dans un contexte de compétition spermatique élevée (Lane et al. 2015). Ainsi, il est tout à fait probable que les femelles chez *L. botrana* soient aussi capables de détecter le statut sexuel du mâle en se basant sur des traces chimiques indiquant qu'ils se sont déjà accouplés. Nous pourrions pour cela imbiber les mâles avec les phéromones sexuelles produites par les femelles et regarder si les femelles évitent de s'accoupler avec ces mâles quand on leur propose simultanément un mâle vierge « parfumé » et un mâle vierge contrôle.

D'autres traits sont susceptibles de signaler honnêtement la qualité des mâles tels que leur condition corporelle, la production de signaux sexuels coûteux (hypothèse du handicap) ou encore la qualité de leur parade nuptiale (Andersson 1994). Si les mâles possédant ces traits apportent des ressources matérielles augmentant l'aptitude phénotypique des femelles, alors les femelles devraient sélectionner ces mâles en se basant spécifiquement sur ces traits. Au cours de cette thèse, nous avons démontré que la « qualité » des mâles dépendait de la quantité de ressources nutritives dont ils disposaient à l'émergence et donc de leur cépage d'origine (Chapitre IV). Dans de nombreuses études, la condition corporelle des mâles est souvent positivement corrélée à leur succès reproducteur, et les femelles se basent sur des indices reflétant une bonne condition des mâles tels que la taille des ornements ou la production de phéromones sexuelles pour choisir leur partenaire sexuel (Cotton et al. 2004, Velando et al. 2006, Nieberding et al. 2012). Chez *Eudémis*, la condition corporelle du mâle (calculée à partir de la régression entre la masse du mâle et la surface de son aile) ne reflète pas nécessairement la quantité de ressources dont il dispose, ni sa capacité à inséminer les femelles avec des spermatophores de haute qualité (Chapitre IV.2). On ne s'attend donc pas à ce que les femelles discriminent les mâles en se basant sur des critères morphologiques chez cette espèce, d'autant plus que ni la taille des mâles ni la surface de leurs ailes ne sont corrélées à leur condition corporelle (Chapitre IV.2). De plus, même si nous avons systématiquement observé une corrélation positive entre la masse du mâle et la taille de son spermatophore, cette relation n'est vraie que pour le premier accouplement des individus, les mâles non-vierges, aussi gros soient-ils, ne pouvant quasiment plus investir de ressources dans leur éjaculat. Enfin, certains mâles très petits possèdent pourtant de larges réserves énergétiques et sont capable de produire des spermatophores riches en nutriments. Pour toutes ces raisons, le critère de taille n'est certainement pas un critère fiable renseignant sur la qualité du mâle chez *Eudémis*. De plus, les femelles ne sont vraisemblablement pas en mesure de se baser sur des critères physiques et morphologiques pour évaluer la qualité de leur partenaire. En effet, cette espèce est nocturne, limitant la capacité des femelles à évaluer visuellement la morphologie et donc la condition corporelle de leur partenaire. Ainsi, il est peu probable chez cette espèce que la femelle puisse extraire des informations sur la qualité reproductive de leur partenaire à partir d'indices morphologiques et physiques.

En revanche, les femelles pourraient utiliser des indices chimiosensoriels de contact pendant la parade pour évaluer la qualité de leur partenaire sexuel (Eisner & Meinwald 1995). En percevant des signaux chimiques directement dans l'air ou en touchant avec leurs antennes la cuticule des mâles, les femelles pourraient ainsi discriminer entre des partenaires

de différentes qualités en se basant sur certains composés chimiques des mâles reflétant leur état nutritionnel, lui-même dépendant de leur cépage d'origine. Par exemple, les phéromones sexuelles étant coûteuses à produire chez la grande majorité des espèces (Foster & Anderson 2015, Umbers et al. 2015), y compris chez Eudémis (Harari et al. 2011), ces signaux sexuels renseignent généralement de manière honnête la qualité des partenaires les émettant, comme leur bonne condition corporelle (Costanzo & Monteiro 2007). Chez les insectes phytophages, les plantes hôtes sont capables d'affecter la production et l'émission de phéromones sexuelles chez les deux sexes (Hughes & Renwick 1977, Landolt & Phillips 1997). En effet, de nombreuses études rapportent que les mâles et les femelles sont capables, pendant leur développement larvaire, de séquestrer des composés actifs et des précurseurs à la synthèse de leurs phéromones issus de leur plante hôte (Nishida 2002, Reddy & Guerrero 2004). En revanche, chez *L. botrana*, la production de phéromones sexuelles n'a été décrite que chez les femelles (Roelofs et al. 1973, El-Sayed et al. 1999, Witzgall et al. 2005) et aucune étude n'a été conduite pour examiner l'existence potentielle de phéromones sexuelles produites par les mâles. Il est possible que des signaux chimiques provenant des mâles et perçus à une courte distance par les femelles puissent être impliqués dans le choix de partenaire chez cette espèce. Par exemple, les mâles *L. botrana* pourraient présenter des différences dans leurs profils cuticulaires en fonction de leur cépage d'origine. En effet, les profils d'hydrocarbures cuticulaires sont connus pour être impliqués dans la reconnaissance de partenaires chez les Diptères (Greenspan & Ferveur 2000, Ferveur 2005), les Coléoptères (Ginzel & Hanks 2003) et très récemment chez les Lépidoptères (Heuskin et al. 2014) et mériteraient aussi d'être étudiés chez Eudémis.

Puisque l'acquisition de ressources est un déterminant important des patrons de variation dans les traits coûteux à produire, le choix de partenaire, nécessitant un fort investissement en temps et en énergie (Houle & Kondrashov 2002), devrait également dépendre de la condition des individus (Cotton et al. 2006). En effet, évaluer la qualité de son partenaire (à travers de multiples mécanismes, visuels, olfactifs et/ou tactiles) impose des coûts importants (consommant du temps et de l'énergie) (Milinski & Bakker 1992, Wong & Jennions 2003) et la condition intrinsèque des femelles devrait influencer leur degré de sélectivité envers leurs potentiels partenaires sexuels (Wong & Jennions 2003). De nombreuses études ont ainsi manipulé la qualité de la nourriture pour détecter l'existence de relations entre condition et expression des préférences reproductives chez les femelles (Brown 1997, Hingle et al. 2001^a, Hunt et al. 2005). D'autres travaux ont apporté des preuves corrélatives d'associations généralement positives entre les préférences des femelles et des

indices reflétant leur condition, comme par exemple le ratio taille/masse corporelle (Hingle et al. 2001^b, Beeler et al. 2002). De manière générale, ces études révèlent que les femelles en meilleures conditions exercent des préférences plus fortes mais leur degré de sélectivité dépend principalement de leur système de reproduction. Chez les espèces chez lesquelles les femelles reçoivent des offrandes nutritives de la part des mâles, ces dernières tendent à devenir sexuellement plus sélectives quand la qualité de leur alimentation est réduite (Brown 1997, Cratsley & Lewis 2003, Hunt et al. 2005). Puisque la qualité intrinsèque des femelles chez *Eudémis* (évaluée à travers leur fécondité) dépend de leur nutrition larvaire et donc du cépage sur lequel elles ont effectué leur développement (Moreau et al. 2006^{a,b,c}, Moreau et al. 2007), ces dernières pourraient se montrer plus ou moins sélectives envers leurs partenaires sexuels en fonction de la qualité de leur cépage d'origine. Ainsi, une femelle issue d'une plante de mauvaise qualité pourrait compenser le manque de nutriments obtenus pendant son développement larvaire par une augmentation de l'acquisition de ressources à l'état adulte, par exemple à travers l'obtention d'un ou plusieurs spermatophores riches en protéines. En revanche, une femelle issue d'une plante de bonne qualité, disposant d'assez de ressources à l'émergence pour pondre beaucoup d'œufs, devrait se montrer moins sélective. Pour ces femelles, recevoir un gros spermatophore ne devrait donc pas représenter de bénéfices aussi importants que ceux obtenus par une femelle de « faible qualité ». Ainsi, nous pourrions dans un premier temps, examiner si des femelles de faible condition (sous-nourries pendant leur développement larvaire ou provenant de cépages de faible qualité) tirent plus de bénéfices directs à recevoir de gros vs de petits spermatophores comparées à des femelles de bonne condition (nourries *ad libitum* ou provenant de cépages hautement nutritifs) et disposant donc de plus de ressources à investir dans la production de leur œufs. Dans un second temps, nous pourrions évaluer si le degré de sélectivité des femelles varie en fonction de leur cépage d'origine, en proposant à des femelles provenant de cépages de haute et de faibles qualités nutritives (par exemple, respectivement Grenache vs Mourvèdre [Chapitre IV.4], ou Riesling vs Gewurztraminer, [Moreau et al. 2007]), le choix entre un mâle vierge et un mâle non-vierge ou entre un gros et un petit mâle d'élevage (la taille du 1^{er} spermatophore du mâle étant positivement corrélée à sa masse, Chapitre III). Ces expériences nous permettraient d'évaluer si le choix de partenaire chez *Eudémis* est modulé par la qualité intrinsèque du sexe qui choisit, en l'occurrence ici par la condition des femelles.

Toutes les études menées au cours de ma thèse ont été réalisées au laboratoire et même si l'existence d'un certain degré de sélectivité des femelles a été démontré en fonction de la qualité de leur partenaire sexuel (par exemple un mâle vierge vs non-vierge), il est possible

qu'en populations naturelles, les femelles n'expriment que très peu voire pas du tout de préférences. En effet, dans la nature, les bénéfices directs relatifs à l'accouplement peuvent être contrebalancés par de nombreux coûts liés au choix de partenaire (tels que la compétition entre conspécifiques, le risque de prédation...) pouvant expliquer pourquoi l'intensité du choix varie fortement entre et au sein même des espèces (Jennions & Petrie 1997, Bleu et al. 2012). De plus, même dans les systèmes où les coûts précédemment cités n'existent pas, le degré de sélectivité des individus est tout de même associé à un coût inéluctable, celui associé au temps de recherche de partenaires (Etienne et al. 2014). En effet, plus le degré de sélectivité d'un individu est élevé, et moins il accepte de partenaires sexuels, augmentant drastiquement le temps qu'il consacre à chercher et trouver des partenaires (Barry & Kokko 2010, Bleu et al. 2012, Etienne et al. 2014). Un modèle récent démontre que le degré de sélectivité peut être simplement prédit par la proportion de temps consacrée à la recherche de partenaires (Etienne et al. 2014). Ainsi, chez *L. botrana*, les taux de rencontre entre partenaires dans un vignoble sont variables (dépendant de la densité locale) et les femelles sont limitées dans leur comportement d'appel des mâles, la production de phéromones imposant un coût reproductif important (Harari et al. 2011). Les femelles Eudémis, qui vivent peu de temps (moins d'une semaine), ne devraient donc pas se montrer sélectives si les taux de rencontre en populations naturelles sont faibles. En effet, le coût de rejet d'un partenaire potentiel peut s'avérer très élevé, les femelles risquant de ne pas avoir d'autres opportunités de reproduction au cours de leur vie. En revanche, si la densité locale en individus est élevée (augmentant les probabilités de rencontre entre individus), les femelles devraient se montrer plus sélectives. Ainsi, il faudrait évaluer empiriquement le temps consacré à la recherche de partenaires, par exemple en mesurant les taux de rencontre *in natura*, les taux de survie et la période de « *time out* » des mâles et des femelles (les individus récemment accouplés étant indisponibles à l'accouplement pendant une certaine période), afin de pouvoir inférer ou non l'existence de choix de partenaire chez les femelles de cette espèce de ravageur *in natura*.

Tout ce qui vient d'être énoncé ci-dessus concernant le choix de partenaire des femelles est transposable dans l'évolution des stratégies de choix de partenaire chez les mâles. En effet, les trois conditions requises à l'existence de choix de partenaires chez les mâles (Bonduriansky 2001, Edward & Chapman 2011) sont réunies chez Eudémis, à savoir (i) qu'il existe de la variation dans la qualité des partenaires sexuels, la fécondité des femelles dépendant de nombreux facteurs dont la qualité de leur nutrition larvaire (Moreau et al. 2006^{a,b,c}, Moreau et al. 2007), (ii) qu'il existe des coûts physiologiques à localiser et à obtenir des partenaires (l'énergie allouée à la recherche de partenaires n'étant plus disponible pour

d'autres fonctions), les mâles cherchant activement les femelles en suivant les faisceaux phéromonaux, (iii) que l'investissement du mâle dans la reproduction soit coûteux, la production de spermatophores étant condition-dépendante, hautement consommatrice en ressources et les mâles n'étant capables de transférer qu'un seul spermatophore riche en nutriments (Muller et al. 2015^b et Chapitre III). En accord avec toutes ces prédictions, une expérience nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un choix de la part des mâles en fonction du cépage d'origine des femelles (Chapitre IV.4). Ainsi, les mâles préfèrent s'accoupler avec les femelles provenant du cépage Carignan et rejettent les femelles provenant du Mourvèdre. Le résultat de cette expérience de choix « côté mâle » peut être rapproché avec ceux que nous avons mis en évidence chez les femelles. En effet, (i) les femelles de laboratoire sont moins motivées à s'accoupler avec les mâles du Mourvèdre qui sont de faible qualité spermatique (Chapitre IV.1, 2 et 3) et (ii) les mâles de laboratoire évitent de s'accoupler avec les femelles du Mourvèdre qui ont une fécondité plus faible (Chapitre IV.4). Le cépage semble donc affecter de manière similaire la qualité sexuelle des deux partenaires, les mâles et les femelles émergeant du Mourvèdre étant de faible qualité alors que ceux émergeant du Carignan ont tous deux de bonnes performances reproductives (Chapitre IV.2 et IV.4). De plus, nos résultats indiquent que les femelles préférées par les mâles sont également celles qui ont globalement la meilleure fécondité (*i.e.* les femelles provenant du Grenache), suggérant que les mâles sont également capables de discriminer les femelles en se basant sur des critères reflétant leur qualité. Les mâles choisissent ainsi de s'accoupler avec les femelles ayant le potentiel reproductif le plus élevé ou investissent plus de ressources quand ils s'accouplent avec des femelles de bonne qualité, obtenant ainsi beaucoup de descendants avec ces femelles.

Les différents cépages de vigne étudiés au cours de cette thèse semblent donc affecter de manière similaire la qualité sexuelle des deux partenaires, suggérant que certains nutriments essentiels à la reproduction chez cette espèce sont peut-être absents des cépages sur lesquels les performances reproductives sont amoindries (comme le Mourvèdre). Il est également possible que certains cépages contiennent de grandes quantités de métabolites secondaires (par exemple des tannins, Hegarty et al. 1991) qui peuvent avoir une action toxique affectant négativement le développement des larves et donc la qualité des adultes à l'émergence. Une étude plus fine de la composition chimique de chaque cépage pourrait ainsi permettre de discriminer les différents composés métaboliques nocifs ou indispensables au développement des larves et à la reproduction des deux partenaires chez *Eudémis*. Ainsi le cépage de vigne apparaît comme une pierre angulaire du succès reproducteur des deux sexes

chez Eudémis et devrait largement moduler les stratégies de choix de partenaire entre mâles et femelles provenant du même ou de différents cépages en populations naturelles.

1.4 STRATÉGIES DE REPRODUCTION ET ISOLEMENT REPRODUCTIF

Étant donnée l'influence capitale du cépage de vigne, à la fois sur les performances reproductives des femelles (Moreau et al. 2006^{a,b,c}, Moreau et al. 2007) et sur celles des mâles (Chapitre III et IV), nous avons voulu dans une dernière expérience (Chapitre V), examiner l'existence de patrons d'appariements modulés par le cépage de vigne chez cette espèce. En effet, l'évolution de l'exploitation (plus ou moins étroite) des plantes hôtes par les insectes peut conduire à la formation de races d'hôtes et à la spéciation sympatrique (Drès & Mallet 2002 pour une revue).

Nos résultats révèlent des probabilités d'accouplements égales entre mâles et femelles issus de différents cépages au sein d'un même vignoble, suggérant qu'il n'y a pas d'isolement reproductif marqué en sympatrie (Chapitre V). Il existe tout de même des variations dans les temps mis par les deux partenaires avant de s'accoupler en fonction de leur cépage d'origine. En effet, les individus provenant de cépages différents mettent beaucoup plus de temps à s'accoupler que ceux provenant du même cépage, ce patron étant plus ou moins marqué selon le cépage considéré. La latence minimale observée concerne les mâles provenant du Carignan qui mettent en moyenne 20 min à s'accoupler avec des femelles du Carignan contre 40 min quand les femelles proviennent des deux autres cépages. Or les mâles qui proviennent du Carignan présentent une qualité reproductive élevée (transférant des spermatophores riches en protéines aux femelles, Chapitre IV.2) et les femelles issues du Carignan ont également un potentiel reproductif élevé (Chapitre IV.4). La courte latence observée entre les mâles et les femelles provenant de ce cépage pourrait donc également s'expliquer par un intérêt réciproque pour les deux partenaires à s'accoupler ensemble. En revanche, les femelles provenant de la Syrah ne s'accouplent pas plus vite avec les mâles de la Syrah (qui sont de faible qualité reproductive, Chapitre IV.2) qu'avec les mâles provenant des autres cépages. Ainsi, la qualité des mâles et des femelles, en fonction de leur cépage d'origine semble moduler leur motivation sexuelle à s'accoupler chez cette espèce. Pour vérifier ces suppositions, nous pourrions réaliser des tests de choix de partenaire, en présentant simultanément à un mâle d'un cépage donné, deux femelles provenant du même et d'un autre cépage et faire l'expérience réciproque en présentant à une femelle, deux mâles, un provenant du même cépage qu'elle et l'autre non.

Si l'isolement reproductif est très peu marqué en sympatrie, nous avons, en revanche, démontré un fort isolement reproductif en allopatrie, entre des partenaires provenant de vignobles séparés de quelques centaines de kilomètres et pourtant issus du même cépage. Plusieurs barrières participent à cet isolement reproductif, les partenaires provenant de différentes populations allopatriques ayant un succès d'accouplement plus faible, mettant plus de temps à s'accoupler, générant plus d'accouplements stériles et produisant moins de descendants que les partenaires provenant de la même population au sein d'un même site géographique.

Tout d'abord, le fort isolement prézygotique entre les différentes populations allopatriques suggère une non-reconnaissance partielle des partenaires sexuels en amont de la copulation à travers la présence de barrières chimiques et comportementales. Dans le cadre d'une spéciation chimio-sensorielle, l'isolement reproducteur résulte souvent d'une divergence phéromonale (Smadja & Butlin 2009, Wicker-Thomas 2011), démontrée chez les Lépidoptères (*Ostrinia nubilalis*, Thomas et al. 2003, Pelozuelo et al. 2004), les Diptères (*Drosophila melanogaster*, Ferveur 2005) et les Coléoptères (Symonds & Elgar 2004). Il est possible que l'isolement prézygotique observé entre les trois populations allopatriques d'Eudémis soit la conséquence d'une différenciation dans la composition du bouquet phéromonal produit par les femelles. Il est aussi possible que cet isolement sexuel soit causé par une divergence dans les profils cuticulaires des deux partenaires comme cela a été récemment démontré chez deux espèces sœurs de Coléoptères *Pyrrhalta maculicollis* et *P. aenescens* (Zhang et al. 2014). Ainsi, les individus provenant de différentes populations sont réticents à s'accoupler et les couples hétérologues mettent beaucoup plus de temps avant de parvenir à s'accoupler que les couples homologues. Cette diminution du succès d'accouplement peut être causée soit par un refus du mâle, de la femelle ou des deux partenaires à copuler. En effet, il est soit possible que les mâles ne soient plus attirés par les phéromones produites par les femelles et/ou que les femelles en présence de mâles provenant d'une autre population soient moins motivées à s'accoupler. Des analyses des comportements précopulatoires spécifiques des mâles et des femelles nous permettraient de trancher entre ces différentes hypothèses. Des études complémentaires sur les réponses des individus en présence de stimuli chimiques provenant de partenaires homologues ou hétérologues sont aussi à creuser pour expliquer si cet isolement sexuel est bien lié à une absence de reconnaissance chimique entre les deux partenaires.

Au niveau post-accouplement, les partenaires provenant de populations différentes obtiennent moins de descendants que ceux provenant de la même population (Chapitre V), suggérant une réduction de la viabilité des zygotes issus de croisements hétérologues. Des études sont nécessaires pour déterminer les mécanismes sous-jacents à cet isolement reproductif (transfert des spermatozoïdes, interaction spermatozoïdes/œufs, développement des embryons). Nos résultats – qui démontrent les prémisses d'un isolement post-accouplement par une réduction de la viabilité de la descendance – suggèrent que les populations que l'on considère actuellement comme appartenant à une seule et même espèce sont peut-être déjà génétiquement différenciées, formant plusieurs espèces cryptiques. À ce jour, aucune étude génétique n'a encore été menée chez *L. botrana*, certainement en raison du faible nombre de marqueurs microsatellites développés chez cette espèce (7 marqueurs supposés polymorphiques développés par Amsellem et collaborateurs en 2003 mais dont seulement 4 ont été amplifiés avec succès). Cependant, une vingtaine de marqueurs microsatellites viennent tout récemment d'être développés (Reineke et al. 2015) et des études visant à caractériser génétiquement les différentes populations françaises voire européennes de ce ravageur de vigne sont donc maintenant tout à fait réalisables.

1.5 INTÉGRATION DU 3^{ÈME} NIVEAU TROPHIQUE – COMPROMIS REPRODUCTION/IMMUNITÉ

Ce projet de thèse a été entièrement envisagé à travers une vision bitrophique, considérant les interactions existantes entre les insectes phytophages et leurs plantes hôtes en occultant le 3^{ème} niveau trophique, à savoir les ennemis naturels (prédateurs, parasites et parasitoïdes). Or, les ennemis naturels peuvent influencer les systèmes de reproduction et les choix de partenaire des insectes soit directement en affectant par exemple les signaux sexuels (Demuth et al. 2012), soit indirectement à travers les pressions de sélection exercées sur le système immunitaire (Adamo 2012). Plusieurs études ont démontré chez *Eudémis* que les parasitoïdes exerçaient de fortes pressions de sélection dans les vignobles (Moreau et al. 2010, Vogelweith et al. 2013) et que la réponse immunitaire des chenilles était coûteuse à produire, et dépendait intimement du cépage d'origine des individus (Vogelweith et al. 2013). Dans le Chapitre IV de cette thèse, nos résultats suggèrent que les mâles, disposant d'une quantité finie et variable de ressources en lien avec leur cépage d'origine, devraient faire face à des compromis dans la répartition de leurs ressources entre différentes fonctions essentielles. À travers l'hypothèse du handicap d'immunocompétence, le compromis entre immunité et effort reproductif est l'un des plus étudié chez les insectes (Zuk & Stoehr 2002, French et al. 2009). Ce compromis mériterait d'être exploré chez *Eudémis*, afin d'avoir une vision plus

globale de l'influence des différents facteurs écologiques sur l'aptitude phénotypique de ce ravageur de la vigne, dans le cadre plus large des relations tritrophiques. Par exemple, chez plusieurs espèces de criquets, les mâles ayant subi un challenge immunitaire produisent de plus petits spermatophores (Kerr et al. 2010) et leur viabilité spermatique est réduite quand ils sont sous-alimentés par rapport à des mâles nourris *ad libitum* (Simmons 2011). Chez Eudémis, il a été montré qu'en fonction des vignobles, les pressions exercées par les parasitoïdes larvaires étaient grandement variables (Moreau et al. 2010, Vogelweith et al. 2013). De plus, le cépage de vigne influence le système immunitaire des chenilles affectant leur capacité de résistance aux parasitoïdes (Vogelweith et al. 2013). Il est donc possible qu'en fonction du cépage et des pressions locales exercées par les parasitoïdes, certaines populations de *L. botrana* soient moins sujettes au parasitisme et investissent moins dans leur immunité, au profit d'un plus fort investissement dans leurs performances reproductives. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait mesurer, sur les mêmes individus récoltés sur différents cépages et dans différents vignobles à taux de parasitisme variables, les paramètres immunitaires des chenilles (tels que la concentration en hémocytes, l'activité du système phénoloxydase et l'activité antimicrobienne) et les performances sexuelles des adultes (qualité du spermatophore et spermatozoïdes produits par les mâles et potentiel reproductif des femelles).

1.6 BILAN SUR L'ASPECT FONDAMENTAL DE CETTE THÈSE

Notre étude soutient clairement que les variations écologiques (notamment l'exploitation de différentes plantes hôtes) participent à l'évolution des stratégies de reproduction chez les insectes phytophages en modulant les interactions entre les partenaires sexuels. Nous avons démontré que le budget énergétique des mâles dépendait grandement de la qualité de leur nutrition larvaire sur différents cépages de vigne (Chapitre IV), limitant ainsi leur investissement dans la reproduction et affectant grandement le potentiel reproductif des femelles. Si les effets du cépage de vigne sont très importants sur le potentiel reproductif des adultes quand ils sont étudiés indépendamment chez les mâles (Chapitre IV.1, IV.2 et IV.3) et les femelles (Chapitre IV.4, Moreau et al. 2006^{a,b,c}), les patrons de variation sont beaucoup moins clairs quand ils sont évalués conjointement sur les deux partenaires provenant du même ou de différents cépages (Chapitre V). Ainsi, identifier les facteurs écologiques modulant les interactions entre les partenaires sexuels chez les espèces menaçant les cultures, en intégrant notamment les ressources apportées par les mâles aux femelles, est primordial dans notre compréhension de l'évolution de leur dynamique populationnelle et se révèle crucial pour mettre en place des programmes de gestion de ces ravageurs.

2. IMPORTANCE DU MÂLE DANS LES PROGRAMMES DE LUTTE CONTRE LES RAVAGEURS, UN EXEMPLE : L'EUDÉMIS

L'un des défis actuels est de réussir à transposer les résultats des études empiriques fondamentales sur les insectes à problèmes économiques à l'adoption de mesures appliquées pour parvenir à contrôler ces populations de ravageur, toujours dans une philosophie de lutte intégrée, à travers l'utilisation de stratégies de biocontrôle.

Les vers de la grappe (Eudémis, *L. botrana* et Cochylys, *Eupocillia ambiguella*) font partie des premiers ravageurs contre lesquels une lutte raisonnée à travers l'utilisation d'un arsenal de méthodes biologiques a été développée dès la fin du XIX^{ème} siècle (Galet 1982). Parmi ces méthodes, la lutte biologique (Ifoulis & Savopoulou-Soultani 2004) et la confusion sexuelle (Kast 2001, Thiéry & Delbac 2011) ont reçu de plus en plus d'attention au cours des dernières décennies, mais leur succès s'est révélé variable (Hommay et al. 2002, Carlos et al. 2008, Thiéry 2011). Le manque de réussite provient certainement du fait que ces programmes ont été appliqués de manière similaire dans les vignobles sans tenir suffisamment compte des pressions de sélection locales exercées sur les populations de ravageurs.

Toute méthode de lutte, qu'elle soit basée sur des outils théoriques (via des simulations mathématiques permettant de modéliser les processus de dynamique de populations de ravageurs) ou sur des outils pratiques (via l'utilisation de méthodes de biocontrôle) requiert des connaissances approfondies de l'écologie et de la reproduction des ravageurs d'intérêt (Ferguson et al. 2005, Pérez-Staples et al. 2012). Malgré les nombreuses études menées en écologie chimique, en physiologie, et en comportement pour améliorer l'efficacité de gestion des populations de vers de la grappe (Thiéry 2008, Ioriatti et al. 2011), ces derniers (et particulièrement Eudémis) continuent à proliférer dans les vignobles, suggérant que les méthodes de lutte ne sont toujours pas optimisées pour gérer efficacement ces ravageurs.

Le tableau 9 résume les principales méthodes de contrôle employées contre Eudémis dans une philosophie de lutte intégrée. Les différents facteurs écologiques susceptibles d'affecter la réussite de ces programmes sont également détaillés ainsi que les travaux ayant identifié l'importance de ces facteurs au cours des vingt dernières années. Je discuterai ici de l'importance de considérer l'effet du mâle dans ces études qui cherchent à optimiser les programmes de gestion par un approfondissement des connaissances écologiques de l'espèce de ravageur d'intérêt.

Tableau 9 : Connaissances écologiques nécessaires à la mise en place des différentes méthodes de luttres contre l'Eudémis, tirées des principales études visant à améliorer la réussite de ces programmes.

Méthodes de lutte	Connaissances écologiques	Références
Épandage d'insecticides chimiques & biologiques (<i>B. thuringiensis</i>)	Distribution spatiale Capacité de dispersion Cycle de développement	Ifoulis & Savopoulou-Soultani 2006 Moravie et al. 2006 Torres-Vila et al. 1997 ^a
Confusion sexuelle (phéromones synthétiques)	Densité en individus Capacité de vol des ♂ Détection des phéromones par ♂ et ♀ Dynamique de reproduction des ♀	Ioriatti et al. 2011 Harari et al. 2015 Torres-Vila et al. 2002 ^b Vassiliou et al. 2009
Technique de l'insecte stérile (stérilité héritée)	Capacité à localiser et acquérir les ♀ Qualité reproductive du ♂	Saour 2014 Steinitz 2014
Lutte biologique (Parasitoïdes d'œufs et parasitoïdes de larves)	Taille des œufs (P. œufs) Cépage du ravageur (P. œufs + larves) Système immunitaire (P. larves)	Moreau et al. 2009 Moreau et al. 2010 Vogelweith et al. 2013

2.1 INCLURE LE COMPARTIMENT MÂLE DANS LES MODÈLES THÉORIQUES

Bien que l'utilisation courante d'insecticides chimiques soit extrêmement dangereuse dans les écosystèmes sensibles (Yadav 2010), le contrôle des vers de la grappe passe encore par un épandage de pesticides chimiques à large spectre d'action dans beaucoup de vignobles (Irigaray et al. 2009, Ioriatti 2011). Les insecticides sont appliqués selon un seuil de tolérance économique, correspondant à des niveaux d'infestation critiques, qui dépendent de la génération et de la susceptibilité du cépage (Ioriatti et al. 2011). Le taux d'infestation dans une parcelle est déterminé par comptage du nombre de glomérules occupés par une chenille pour 100 grappes observées aléatoirement dans plusieurs rangs de vigne. Par exemple, en première génération, un traitement par pesticides est systématiquement effectué si le seuil de tolérance économique dépasse 80% (*i.e.* si au moins 80 glomérules sont trouvés pour 100 inflorescences observées). Afin de développer des programmes d'échantillonnages efficaces permettant d'évaluer le niveau d'infestation des grappes (et d'ajuster le seuil d'intervention), une connaissance précise de la distribution spatiale des populations d'Eudémis est donc indispensable (Ifoulis & Savopoulou-Soultani 2006).

De plus, qu'il s'agisse d'insecticides chimiques classiques ou d'autres composés alternatifs (tels que les insecticides neurotoxiques, les inhibiteurs de synthèse de chitine ou encore les insecticides d'origine microbienne), tous doivent être appliqués dans les stades les plus vulnérables du ravageur, souvent dans les premiers stades larvaires (Zalucki et al. 2002, Ioriatti et al. 2011). Par exemple, la méthode consistant à utiliser la bactérie entomopathogène

Bacillus thuringiensis (Bt) n'est efficace que si cette dernière est répandue à l'éclosion des larves car elle n'agit que si elle est ingérée par les jeunes chenilles. En effet, le Bt est présent sous la forme d'une protoxine enfermée dans un cristal qui ne devient active qu'une fois ingérée par les chenilles, attaquant leur paroi intestinale et provoquant leur mort par septicémie. Il est donc déterminant que les jeunes chenilles ingèrent le Bt dès leur sortie de l'œuf avant toute pénétration dans les baies de raisin. Pour cela, il apparaît essentiel de pouvoir prédire précisément, à l'aide de simulations mathématiques, le cycle de développement des vers de la grappe pour déterminer à quel moment l'utilisation du traitement sera la plus efficace (Moravie et al. 2006). La plupart des modèles ont mis en évidence l'existence d'une grande variabilité dans le cycle de vie chez Eudémis, sans pour autant prendre en compte les paramètres clés (comme la plante hôte ou le succès reproducteur des individus) pouvant expliquer cette variabilité (Moravie et al. 2006, Sharon et al. 2009). Par exemple, chez les vers de la grappe, la phénologie (*i.e.* la distribution des temps d'émergence des individus) varie selon les sites et les années (Del Tio et al. 2001, Milonas et al. 2001) et dépend des cépages de vigne considérés (Thiéry et al. 2014). Les modèles essayant de prédire l'évolution des populations d'une année sur l'autre n'incluent jamais l'effet potentiel du cépage dans la dynamique d'émergence des individus, rendant difficilement prédictible l'évolution des populations au fil des générations (Moravie et al. 2006). D'autre part, les études qui cherchent à modéliser la dynamique de ponte des femelles ne tiennent pas non plus compte de l'impact potentiel de la qualité de leurs partenaires sexuel. En effet, une thèse entière s'est attachée à modéliser les dynamiques de population chez Eudémis en estimant les taux d'émergence, de ponte et d'éclosion des œufs, sans jamais considérer le compartiment mâle dans les différentes simulations (Picart 2009). Or les expériences menées au cours de ma thèse démontrent que le potentiel reproductif des femelles et donc les taux de ponte et d'éclosion des œufs dépendent largement de la qualité des mâles avec lesquels ces femelles s'accouplent. En effet, deux femelles génétiquement homogènes et élevées dans les mêmes conditions peuvent présenter des fécondités variant de 50 à 150 œufs en fonction de la qualité de leur partenaire (Chapitre IV.3). Ce facteur de variation majeur devrait systématiquement être pris en compte dans les modèles en plus des facteurs endogènes classiquement considérées (comme par exemple le comportement de ponte des femelles). Ainsi, il apparaît important d'inclure l'effet de la plante hôte et le rôle potentiel des mâles dans la reproduction dans ce genre de modèles afin d'avoir une représentation plus réaliste de l'évolution de la dynamique de populations chez ce ravageur de la vigne.

2.2 INCLURE LE COMPARTIMENT MÂLE DANS LES ÉTUDES EMPIRIQUES

2.2.1 Confusion sexuelle

La confusion sexuelle est une technique utilisant des phéromones de synthèse afin de perturber l'orientation des mâles dans leur recherche de partenaires et constitue un outil vital pour la gestion des ravageurs dans une variété d'écosystèmes contrôlés (Witzgall et al. 2010). L'utilisation de cette technique chez Eudémis comme chez de nombreuses autres espèces présente parfois des échecs inexplicables (Carde & Minks 1995, Mori & Evenden 2012). Une des raisons invoquées pour expliquer ces échecs concerne un manque de connaissances des mécanismes affectant le comportement des mâles dans leur recherche de partenaires (Ioriatti et al. 2011). En effet, la plupart des mécanismes responsables de la perturbation de la communication entre les partenaires sexuels sont directement liés aux effets des phéromones de synthèse sur la réponse des mâles (Miller et al. 2006^{a,b}, mais voir Kuhns et al. 2012, Harari et al. 2014 pour des effets sur les comportements des femelles). À ce jour, une seule formule de phéromone de synthèse est commercialisée contre Eudémis utilisant comme substance active l'E7, E/Z9-dodecadienyl acétate (Schmitz et al. 1995). Or, au cours du Chapitre V, nous avons évoqué la possibilité d'une divergence phéromonale entre populations allopatriques présentant un fort isolement reproductif à courte échelle (quelques centaines de km). On peut donc s'attendre à observer une plus grande divergence à plus large échelle et à l'émergence d'espèces cryptiques, par exemple entre les populations françaises, italiennes et israéliennes. Il est possible qu'entre ces populations, la composition du bouquet phéromonal des femelles ait pu varier, notamment au niveau des composés minoritaires et que parallèlement, les réponses des mâles à cette phéromone aient pu évoluer (comme cela a par exemple été démontré chez la légionnaire d'automne *Spodoptera frugiperda*, Groot et al. 2008, Unbehend et al. 2014). Si cette divergence est avérée chez Eudémis, l'efficacité de la phéromone de synthèse pourrait être variable selon les régions viticoles, attirant plus ou moins efficacement les mâles. Plusieurs études rapportent en effet des preuves d'une possible évolution de résistance aux phéromones sous confusion sexuelle (Haynes & Baker 1988, Evenden & Haynes 2001). De plus, puisque la nutrition larvaire des mâles influence potentiellement leur capacité à localiser et à acquérir des partenaires sexuelles (Chapitre IV.2), l'efficacité des programmes de confusion sexuelle est certainement dépendante de la « qualité » des mâles et de la densité locale en individus, variables entre différents vignobles. Ainsi, l'usage de la confusion sexuelle devrait être optimisé en fonction des régions viticoles et des cépages cultivés qui altèrent fortement la qualité des partenaires et donc leur capacité de reproduction.

Cette technique, en plus d'empêcher l'accouplement de l'espèce ciblée, peut également retarder la reproduction entre les partenaires sexuels affectant leur aptitude phénotypique et par conséquent la dynamique populationnelle des générations suivantes (Miller et al. 2006, Wenninger & Averill 2006). En effet, les femelles disposent d'un temps limité pour se reproduire et pondre leurs œufs et une récente méta-analyse a démontré qu'un retard d'accouplement des femelles avait un impact négatif important sur leur potentiel reproductif, les femelles âgées pondant moins d'œufs (Mori & Evenden 2012). Chez Eudémis, les femelles ont besoin d'au moins 5 jours pour pondre tout leur stock d'œufs (Moreau et al. 2015), et un retard dans la reproduction chez cette espèce devrait également résulter en une fécondité plus faible des femelles, ces dernières vivant environ une semaine *in natura*. Un retard d'accouplement chez les mâles pourrait également influencer leur investissement dans la reproduction. En effet, deux récentes études sur deux espèces de Lépidoptères rapportent que les performances spermatiques des mâles déclinent avec l'âge, les mâles trop âgés n'étant plus capables de produire de gros spermatophores riches en spermatozoïdes (Walker & Allen 2011) et les femelles s'accouplant avec de vieux mâles souffrant d'une réduction de fertilité (Kawazu et al. 2014). Chez Eudémis, les effets négatifs d'un retard d'accouplement ont été identifiés pour les femelles (Torres-Vila et al. 2002^b) et pourraient également affecter les mâles, ces derniers disposant d'une quantité variable de ressources à investir dans la reproduction (Chapitre IV). En raison de l'importance de la qualité du spermatophore dans le potentiel reproductif des femelles chez Eudémis (Chapitre III et IV), nos résultats invitent les études sur la confusion sexuelle à prendre en compte les effets des retards d'accouplement sur les performances des femelles mais également sur celles des mâles chez cette espèce.

2.2.2 Lutte autocide et stérilité héritée

Très récemment, des études se sont penchées sur une autre forme de lutte pour contrôler les populations d'Eudémis, la lutte autocide qui a recours à des lâchers d'insectes stériles (Saour 2014, Steinitz et al. 2014). Nous avons évoqué ce moyen de lutte en introduction, les programmes employant des lâchers d'insecte stériles étant couramment employés contre certaines espèces de Diptères comme la lucilie bouchère *Cochliomyia hominivorax* (Vargas-Téran et al. 2005) ou la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* (Enkerlin 2005). Chez les Lépidoptères, cette forme de lutte a reçu moins de succès notamment parce qu'une haute dose de radiation est nécessaire pour rendre les mâles complètement stériles. Cette haute dose de radiation présente cependant des problèmes puisque elle diminue l'aptitude phénotypique des mâles stériles en réduisant leur capacité à

gagner la compétition face aux mâles sauvages et donc limitant leur accès aux femelles (Steinitz 2014). Cependant, les femelles sont plus sensibles aux radiations que les mâles, ce qui permet d'ajuster le niveau de radiation afin d'obtenir des femelles complètement stériles et des mâles partiellement stériles. Cette technique est appelée technique de la stérilité héritée (TIS – SH) puisque les croisements entre femelles contrôles et mâles irradiés résultent généralement dans une production réduite de descendants, qui sont hautement stérile et majoritairement des mâles (Carpenter et al. 2005). Chez les Lépidoptères, les programmes de lutte autocide employant la stérilité héritée ont montré des résultats prometteurs chez plusieurs espèces d'intérêt économique telles que le carpocapse du pommier *Cydia pomonella* (Bloem et al. 2007) ou encore la pyrale du cactus *Cactoblastis cactorum* (Hight et al. 2005).

Plusieurs doses de radiations ont été testées sur *L. botrana*, les auteurs suggérant une dose optimale de 150 rayons gammas afin de rendre les femelles complètement stériles et les mâles partiellement (Saour 2014). Cette même étude suggère de relâcher les deux sexes sur le terrain, ce qui mérite à mon avis des études préliminaires avant d'effectuer de tels lâchers. En effet, il est important de vérifier que les mâles stériles, s'ils sont relâchés simultanément avec des femelles stériles, ne vont pas préférentiellement s'accoupler avec ces dernières plutôt qu'avec les femelles sauvages dans l'environnement. En effet, il a déjà été montré qu'un lâcher des deux sexes ne parvenait pas à réduire les populations sauvages chez la mouche de l'olivier *Batrocera oleae*, les mâles stériles ne s'accouplant qu'avec des femelles stériles (Hendrichs et al. 2002). On peut imaginer que les adultes chez *L. botrana* adoptent ces mêmes patrons d'appariement, les insectes stériles élevés sur du milieu artificiel en laboratoire, étant génétiquement et chimiquement plus proches que des individus sauvages issus de différents cépages de vigne. En effet, les probabilités d'accouplements entre mâles et femelles de laboratoire avoisinent les 100% et sont donc plus élevées que les succès reproducteurs des individus sauvages (données personnelles et Chapitre V). Nous pourrions facilement vérifier ces suppositions par l'utilisation de tests de choix, en proposant simultanément à un individu sauvage un partenaire stérile ou non et en examinant sa préférence et sa motivation à s'accoupler (comme dans les études menées dans les Chapitre III et IV.4). Nous pourrions également une fois l'accouplement terminé (avec un mâle stérile ou non), quantifier la motivation des femelles à se réaccoupler (latence et intensité des comportements d'appels, comme mesuré dans le Chapitre III). De plus, le Chapitre V démontre que les patrons d'appariement dépendent de l'origine géographique des individus, les populations éloignées de quelques centaines de kilomètres présentant un début d'isolement reproductif. Avant de lancer de tels programmes de lutte, il apparaît donc indispensable de vérifier que les individus

mâles relâchés soient capables de localiser et de s'accoupler avec les femelles dans différentes régions viticoles.

L'étude de Steinitz et al. 2014 se veut démonstrative de la faisabilité du contrôle de *L. botrana* par la méthode de la TIS-SH. En effet, leur étude a prouvé que l'irradiation des chrysalides deux jours avant l'émergence n'affectait ni les taux d'émergence, ni la capacité de vol, ni la réponse des mâles à la phéromone sexuelle des femelles, ni leur succès d'accouplement dans des tests de non-choix. Cependant, ces résultats sont loin d'être suffisants pour garantir qu'un tel programme puisse fonctionner *in natura*, et ce pour une multitude de raisons. Tout d'abord, le fait que les mâles soient capables de se diriger vers les femelles en suivant le faisceau phéromonal ne garantit pas que les femelles soient enclines à s'accoupler avec ces mâles irradiés. En effet, nous avons mis en évidence au cours de cette thèse un choix motivé des femelles en fonction de la qualité des mâles, par exemple une préférence pour des mâles vierges et un fort taux de rejection pour les mâles non-vierges dont le stock en spermatozoïdes est drastiquement réduit (Chapitre III, article 1). Il est donc nécessaire de s'assurer que des mâles vierges irradiés et sauvages aient le même succès d'accouplement avec des femelles sauvages non pas en les présentant individuellement aux femelles mais simultanément. De plus, le Chapitre III de ma thèse a démontré que les mâles non-vierges, qui possèdent moins de spermatozoïdes féconds et non-féconds induisent une période réfractaire plus courte des femelles, ces dernières étant plus rapidement et plus intensément motivées à se réaccoupler. Si l'accouplement avec un mâle irradié induit une courte période réfractaire des femelles et qu'elles se réaccouplent avec un mâle sauvage, l'efficacité du programme de lutte en sera amoindrie.

Pour terminer, l'efficacité des programmes de lâchers d'insectes stériles dépend de plusieurs paramètres physiologiques des mâles, à savoir qu'il faut (i) que les mâles atteignent rapidement la maturité sexuelle, (ii) qu'ils gagnent la compétition face à leurs rivaux, (iii) qu'ils s'accouplent avec les femelles sauvages et (iv) qu'ils survivent assez longtemps pour maintenir une pression continue sur les populations sauvages (Pereira et al. 2011). La présente thèse révèle que la nutrition larvaire des mâles joue un rôle décisif dans leur performances sexuelles (Chapitre IV.1, IV.2 et IV.3, articles 2, 3 et 4) et la qualité des mâles pourrait donc être optimisée en utilisant une alimentation artificielle par exemple riche en protéines, en vue de lancer des programmes de lutte autocide chez cette espèce. Ainsi si nous arrivions à produire et à relâcher en première génération des mâles qui soient à la fois compétitifs, capables de produire de gros spermatophores (car disposant de beaucoup de réserves

énergétiques) mais incapables de transférer beaucoup de spermatozoïdes (en les irradiants à faible dose), nous pourrions réduire les densités de populations *in natura* et limiter l'impact des ravageurs sur les baies de raisin en seconde et troisième génération. En effet, une fois relâchés, ces mâles devraient parvenir à s'accoupler avec les femelles. De plus, le transfert d'un gros spermatophore devrait limiter la motivation des femelles à se réaccoupler, et le peu de spermatozoïdes fécondants transférés devrait réduire leur fécondité et augmenter la stérilité de leurs descendants à la génération suivante.

2.2.3 Lutte biologique et utilisation conjointe de plusieurs méthodes

La lutte biologique, dernière méthode abordée dans ce Chapitre, qui repose principalement sur le lâcher de parasitoïdes des œufs des Tordeuses de la vigne (en général des Trichogrammes), n'a été que peu utilisée et a connu une efficacité très variable au cours des vingt dernières années (Barnay 1999, Hommay et al. 2002, Thiéry. 2011). Une multitude de facteurs peuvent être à l'origine des échecs observés par le passé, le succès parasitaire des Trichogrammes dépendant de nombreux facteurs abiotiques (humidité, photopériode, température...) et biotiques (taille des œufs du ravageur, cépage d'origine du ravageur) (Moreau et al. 2009, Vogelweith et al. 2013). Récemment, il a été montré qu'en fonction des vignobles, le parasitisme larvaire des chenilles pouvait également grandement varier (Moreau et al. 2010) et que la capacité de résistance des chenilles aux parasitoïdes reposait principalement sur leur système immunitaire, lui-même différant selon le cépage exploité par les chenilles (Vogelweith et al. 2011, Vogelweith et al. 2013). Or, nous avons précédemment discuté de l'importance d'étudier l'existence des compromis d'allocation dans les différents traits d'histoire de vie des individus (notamment entre reproduction et immunité) en fonction de leur cépage d'origine, afin de mieux appréhender les dynamiques de population de ce ravageur. Ainsi, si sur certains cépages, les individus investissent beaucoup de leurs ressources dans la reproduction au détriment de leur immunité larvaire, il sera donc intéressant de lâcher des parasitoïdes sur ces chenilles immunodéprimées afin de réduire les populations larvaires. À l'inverse, l'utilisation de tels agents biologiques dans des vignobles dans lesquels les cépages boostent l'immunité des chenilles devrait être délaissée au profit d'autres méthodes visant plutôt à interférer avec la reproduction des adultes (comme la confusion sexuelle ou le lâcher d'insectes stériles). En effet, il est possible que les individus ayant largement investi pendant leur développement larvaire dans leurs fonctions immunitaires, émergent avec peu de ressources disponibles pour leur reproduction. Sous confusion sexuelle, les mâles de faible condition disposeront certainement de peu de temps

pour localiser les femelles, surtout si des phéromones synthétiques sont placées dans les vignes. De plus, l'utilisation de la TIS-SH chez cette espèce pourrait être efficace dans des parcelles dans lesquelles les mâles sauvages sont de faible qualité reproductive, ces derniers risquant de perdre la compétition face à des mâles stériles qui disposent de beaucoup de réserves énergétiques à investir dans la reproduction. Ainsi, en fonction des régions viticoles et des cépages cultivés, certaines méthodes de lutte devraient être privilégiées, ciblant préférentiellement, les œufs, les larves ou les adultes chez *Eudémis*. De plus, l'utilisation parcimonieuse de ces méthodes devrait également dépendre de la génération, les individus qui s'alimentent en 3^{ème} génération sur des baies de raisin gorgées de nutriments disposant de plus de ressources nutritives que ceux de 1^{ère} génération se développant sur des inflorescences de vigne.

3. CONCLUSION

Dans le cadre des interactions plantes-insectes, les différentes études réalisées au cours de ma thèse attestent de l'importance de considérer l'effet mâle quand on cherche à comprendre l'évolution des populations de ravageur. En effet, nous avons mis en évidence, chez une espèce phytophage monandre à reproduction sur capital, l'influence de la qualité des mâles (dépendante de leur nutrition larvaire et de leur expérience sexuelle) sur le potentiel reproductif des femelles et sur les choix de partenaire. Ainsi, identifier les facteurs écologiques modulant les interactions entre les partenaires sexuels chez les espèces menaçant les cultures, est crucial pour optimiser les programmes de gestion de ces ravageurs. Cette thèse donne une compréhension de fond des liens complexes existant entre les plantes et les insectes les exploitants, et l'accumulation de connaissances de ce type pourra permettre de guider les pratiques de gestion ou tout au moins de suggérer les futures recherches à conduire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrol DP & Shankar U** (2012). History, overview and principles of ecologically based pest management. *Integrated Pest Management: Principles and Practice*. ABI Publishing, Wallingford, UK.
- Adamo SA** (2012). The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. *Hormones and Behavior*, **62**:324-330.
- Albo MJ, Winther G, Tuni C, Toft S & Bilde T** (2011). Worthless donations: male deception and female counter play in a nuptial gift-giving spider. *BMC Evolutionary Biology*, **11**:329.
- Amitin EG & Pitnick S** (2007). Influence of developmental environment on male-and female-mediated sperm precedence in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**:381-391.
- Amsellem L, Risterucci AM & Benrey B** (2003). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). *Molecular Ecology Notes*, **3**:117-119.
- Andersson M & Simmons LW** (2006). Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**:296-302.
- Andersson M** (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Anfora G, Tasin M, Bäckman AC, Cristofaro A, Witzgall P & Ioriatti C** (2005). Attractiveness of year-old polyethylene Isonet sex pheromone dispensers for *Lobesia botrana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **117**:201-207.
- Apple JL, Wink M, Wills SE & Bishop JG** (2009). Successional change in phosphorus stoichiometry explains the inverse relationship between herbivory and lupin density on Mount St. Helens. *PLoS One*, **4**:e7807.
- Arbuthnott D, Elliot MG, McPeck MA & Crespi BJ** (2010). Divergent patterns of diversification in courtship and genitalic characters of *Timema* walking-sticks. *Journal of evolutionary biology*, **23**:1399-1411.
- Arnqvist G & Nilsson T** (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, **60**:145-164.
- Arnqvist G & Rowe L** (2005). *Sexual conflict*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD & Wolfner MF** (2011). Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annual Review of Entomology*, **56**:21-40.
- Awmack CS & Leather SR** (2002). Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of entomology*, **47**:817-844.

- Ayres MP, Wilkens RT, Ruel JJ, Lombardero MJ & Vallery E** (2000). Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology*, **81**:2198-2210.
- Baker RH, Ashwell RI, Richards TA, Fowler K, Chapman T & Pomiankowski A** (2001). Effects of multiple mating and male eye span on female reproductive output in the stalk-eyed fly, *Cyrtodiopsis dalmanni*. *Behavioral Ecology*, **12**:732-739.
- Balachowsky A & Mesnil L** (1935). *Les insectes nuisibles aux plantes cultivées: leurs mœurs, leur destruction*. Busson, Paris, France.
- Barnay O, Pizzol J, Gertz C, Kienlen JC, Hommay G & Lapchin L** (1999). Host density-dependence of discovery and exploitation rates of egg patches of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) and *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) by the parasitoid *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Economic Entomology*, **92**:1311-1320.
- Barnes AI & Partridge L** (2003). Costing reproduction. *Animal Behaviour*, **66**:199-204.
- Barrett EL, Hunt J, Moore AJ & Moore PJ** (2009). Separate and combined effects of nutrition during juvenile and sexual development on female life-history trajectories: the thrifty phenotype in a cockroach. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **276**:3257-3264.
- Barry KL & Kokko H** (2010). Male mate choice: why sequential choice can make its evolution difficult. *Animal Behaviour*, **80**:163-169.
- Bateman AJ** (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, **2**:349-368.
- Beeler AE, Rauter CM & Moore AJ** (2002). Mate discrimination by females in the burying beetle *Nicrophorus orbicollis*: the influence of male size on attractiveness to females. *Ecological Entomology*, **27**:1-6.
- Behmer ST, Simpson SJ & Raubenheimer D** (2002). Herbivore foraging in chemically heterogeneous environments: nutrients and secondary metabolites. *Ecology*, **83**:2489-2501.
- Bell SJ & Henschke PA** (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**:242-295.
- Berger D, Olofsson M, Gotthard K, Wiklund C & Friberg M** (2012). Ecological constraints on female fitness in a phytophagous insect. *The American Naturalist*, **180**:464-480.
- Bissoondath CJ & Wiklund C** (1995). Protein content of spermatophores in relation to monandry/polyandry in butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **37**:365-371.
- Bissoondath CJ & Wiklund C** (1996). Effect of male mating history and body size on ejaculate size and quality in two polyandrous butterflies, *Pieris napi* and *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Functional Ecology*, **10**:457-464.

- Blanco CA, Rojas MG, Groot AT, Morales-Ramos J & Abel CA** (2009). Size and chemical composition of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) spermatophores. *Annals of the Entomological Society of America*, **102**:629-637.
- Blay S & Yuval B** (1997). Nutritional correlates of reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Animal Behaviour*, **54**:59-66.
- Bleu J, Bessa-Gomes C & Laloi D** (2012). Evolution of female choosiness and mating frequency: effects of mating cost, density and sex ratio. *Animal Behaviour*, **83**:131-136.
- Bloem S, Carpenter J, McCluskey A, Fugger R, Arthur S & Wood S** (2007). Suppression of the Codling Moth *Cydia pomonella* in British Columbia, Canada Using an Area-Wide Integrated Approach with an SIT Components. In *Area-Wide Control of Insect Pests* (Eds. Vreysen MJB, Robinson AS & Hendrichs). Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Boggs CL** (1990). A general model of the role of male-donated nutrients in female insects' reproduction. *The American Naturalist*, **136**:598-617.
- Boggs CL** (1995). Male nuptial gifts: phenotypic consequences and evolutionary implications. In *Insect reproduction* (Eds. Leather SR & Hardie J), CRC Press, New York, USA.
- Boggs CL** (1997a). Reproductive allocation from reserves and income in butterfly species with differing adult diets. *Ecology*, **78**:181-191.
- Boggs CL** (1997b). Dynamics of reproductive allocation from juvenile and adult feeding: radiotracer studies. *Ecology*, **78**:192-202.
- Boggs CL** (2009). Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology*, **23**:27-37.
- Boggs CL & Freeman KD** (2005). Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia*, **144**:353-361.
- Bonduriansky R** (2001). The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews*, **76**:305-339.
- Bonduriansky R** (2007). The evolution of condition-dependent sexual dimorphism. *The American Naturalist*, **169**:9-19.
- Bowers J, Boursiquot JM, This P, Chu K, Johansson H & Meredith C** (1999). Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. *Science*, **285**:1562-1565.
- Boyer S, Zhang H & Lempérière G** (2012). A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bulletin of Entomological Research*, **102**:213-229.
- Brewer MJ & Goodell PB** (2012). Approaches and incentives to implement integrated pest management that addresses regional and environmental issues. *Annual Review of Entomology*, **57**:41-59.
- Brown WD** (1997). Female remating and the intensity of female choice in black-horned tree crickets, *Oecanthus nigricornis*. *Behavioral Ecology*, **8**:66-74.

- Buser HR, Rauscher S & Arn H** (1974). Notizen: Sex Pheromone of *Lobesia botrana*: (E, Z)-7,9-Dodecadienyl Acetate in the Female Grape Vine Moth. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **29**:781-783.
- Cahenzli F & Erhardt A** (2012a). Enhancing offspring quality or quantity? Different ways for using nectar amino acids in female butterflies. *Oecologia*, **169**:1005-1014.
- Cahenzli F & Erhardt A** (2012b). Nectar sugars enhance fitness in male *Coenonympha pamphilus* butterflies by increasing longevity or realized reproduction. *Oikos*, **121**:1417-1423.
- Cahenzli F & Erhardt A** (2013). Nectar amino acids enhance reproduction in male butterflies. *Oecologia*, **171**:197-205.
- Calas D, Thiéry D & Marion-Poll F** (2006). 20-Hydroxyecdysone deters oviposition and larval feeding in the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Journal of Chemical Ecology*, **32**:2443-2454.
- Calkins CO & Parker AG** (2005). Sterile insect quality. In *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* (Eds. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS). Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Calvo D & Molina JM** (2005). Fecundity–body size relationship and other reproductive aspects of *Streblote panda* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **98**:191-196.
- Cameron E, Day T & Rowe L** (2003). Sexual conflict and indirect benefits. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**:1055-1060.
- Carde RT & Minks AK** (1995). Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. *Annual Review of Entomology*, **40**:559-585.
- Carlos C, Alves F & Torres L** (2008). Eight years of practical experience with mating disruption to control grape berry moth, *Lobesia botrana*, in Porto Wine Region. *IOBC/WPRS Bulletin*. **39**:336-340
- Carpenter JE, Bloem S & Marec F** (2005). Inherited sterility in insects. In *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* (Eds. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS). Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Caswell H & Weeks DE** (1986). Two-sex models: chaos, extinction, and other dynamic consequences of sex. *The American Naturalist*, **128**:707-735.
- Caswell H** (2001). Matrix Population Models. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Cerritos R, Wegier A & Alavez V** (2012). Toward the Development of Novel Long-Term Pest Control Strategies Based on Insect Ecological and Evolutionary Dynamics. In *Integrated pest management and pest control—current and future tactics* (Eds. Larramendy ML & Soloneski S). InTech.
- Charmantier A & Sheldon BC** (2006). Testing genetic models of mate choice evolution in the wild. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**:417-419.

- Cladera JL, Vera MT, Calcagno G, Vilardi JC & McInnis DO** (2002). Mating competitiveness of Cast-191, a promising genetic sexing strain of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **95**:133-138.
- Cook PA & Gage MJ** (1995). Effects of risks of sperm competition on the numbers of eupyrene and apyrene sperm ejaculated by the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **36**:261-268.
- Cook PA & Wedell N** (1996). Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy for maximizing fertilization success? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **263**:1047-1051.
- Cook PA & Wedell N** (1999). Non-fertile sperm delay female remating. *Nature*, **397**:486-486.
- Cordes N, Albrecht F, Engqvist L, Schmoll T, Baier M, Mueller C & Reinhold K** (2015). Larval food composition affects courtship song and sperm expenditure in a lekking moth. *Ecological Entomology*, **40**:34-41.
- Costanzo K & Monteiro A** (2007). The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **274**:845-851.
- Cotton S, Fowler K & Pomiankowski A** (2004). Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis? *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **271**:771-783.
- Cotton S, Small J & Pomiankowski A** (2006). Sexual selection and condition-dependent mate preferences. *Current Biology*, **16**:R755-R765.
- Cratsley CK & Lewis SM** (2003). Female preference for male courtship flashes in *Photinus ignitus* fireflies. *Behavioral Ecology*, **14**:135-140.
- Davie LC, Jones TM & Elgar MA** (2010). The role of chemical communication in sexual selection: hair-pencil displays in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Animal Behaviour*, **79**:391-399.
- De Bruyn L, Scheirs J & Verhagen R** (2002). Nutrient stress, host plant quality and herbivore performance of a leaf-mining fly on grass. *Oecologia*, **130**:594-599.
- Del Tío R, Martínez JL, Ocete R & Ocete ME** (2001). Study of the relationship between sex pheromone trap catches of *Lobesia botrana* (Den. & Schiff.)(Lep., Tortricidae) and the accumulation of degree-days in Sherry vineyards (SW of Spain). *Journal of Applied Entomology*, **125**:9-14.
- Delisle J & Bouchard A** (1995). Male larval nutrition in *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae): an important factor in reproductive success. *Oecologia*, **104**:508-517.
- Delisle J & Hardy M** (1997). Male larval nutrition influences the reproductive success of both sexes of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Functional Ecology*, **11**:451-463.

- Demuth JP, Naidu A & Mydlarz LD** (2012). Sex, war, and disease: the role of parasite infection on weapon development and mating success in a horned beetle (*Gnatocerus cornutus*). *PloS One*, **7**:e28690-e28690.
- Desneux N, Decourtaye A & Delpuech JM** (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, **52**:81-106.
- Dewsbury DA** (1982). Ejaculate cost and male choice. *The American Naturalist*, **119**:601-610.
- Dhaliwal GS, Jindal V & Dhawan AK** (2010). Insect pest problems and crop losses: changing trends. *Indian Journal of Ecology*, **37**:1-7.
- Drès M & Mallet J** (2002). Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **357**:471-492.
- Dyck VA, Hendrichs J, & Robinson AS** (2005). *Sterile insect technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Edward DA & Chapman T** (2011). The evolution and significance of male mate choice. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**:647-654.
- Ehler LE** (2006). Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest Management Science*, **62**:787-789.
- Eichhorn KW & Lorenz DH** (1977). Phänologische entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, **29**:119-120.
- Eisner T & Meinwald J** (1995). The chemistry of sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**:50-55.
- Eisner T & Meinwald J** (2003). Alkaloid-derived pheromones and sexual selection in Lepidoptera. *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology* (Eds. Blomquist GJ & Prestwich GD). Academic Press, Orlando, USA.
- El-Sayed A, Gödde J, Witzgall P & Arn, H** (1999). Characterization of pheromone blend for grapevine moth, *Lobesia botrana* by using flight track recording. *Journal of Chemical Ecology*, **25**:389-400.
- Elser JJ, Fagan WF, Denno RF, Dobberfuhl DR, Folarin A, Huberty A, Interlandi S, Kilham SS, McCauley E, Schulz KL, Siemann EH & Sterner RW** (2000). Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature*, **408**:578-580.
- Engen S, Lande R & Saether BE** (2003). Demographic stochasticity and Allee effects in populations with two sexes. *Ecology*, **84**:2378-2386.
- Enkerlin WR** (2005). Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* (Eds. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS). Springer, Dordrecht, Netherlands.

- Etienne L, Rousset F, Godelle B & Courtiol A.** (2014). How choosy should I be? The relative searching time predicts evolution of choosiness under direct sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **281**:20140190.
- Evenden ML & Haynes KF** (2001). Potential for the evolution of resistance to pheromone-based mating disruption tested using two pheromone strains of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **100**:131-134.
- Ferguson HM, John B, Ng'habi K & Knols, BG** (2005). Redressing the sex imbalance in knowledge of vector biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**:202-209.
- Ferkau C & Fischer K** (2006). Costs of reproduction in male *Bicyclus anynana* and *Pieris napi* butterflies: effects of mating history and food limitation. *Ethology*, **112**:1117-1127.
- Ferveur JF** (2005). Cuticular hydrocarbons: their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behavior genetics*, **35**:279-295.
- Fischer K & Fiedler K** (2001). Effects of adult feeding and temperature regime on fecundity and longevity in the butterfly *Lycaena hippothoe* (Lycaenidae). *Journal-Lepidopterists Society*, **54**:91-95.
- Foray V, Pelisson PF, Bel-Venner MC, Desouhant E, Venner S, Giron D & Rey B** (2012). A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: the van Handel's method (1985) revisited. *Physiological Entomology*, **37**:295-302.
- Foster SP & Ayers RH** (1996). Multiple mating and its effects in the lightbrown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker). *Journal of Insect Physiology*, **42**:657-667.
- Foster SP & Anderson KG** (2015). Sex pheromones in mate assessment: analysis of nutrient cost of sex pheromone production by females of the moth *Heliothis virescens*. *The Journal of Experimental Biology*, **218**:1252-1258.
- Fox CW, Stillwell RC, Wallin WG & Hitchcock LJ** (2006). Temperature and host species affect nuptial gift size in a seed-feeding beetle. *Functional Ecology*, **20**:1003-1011.
- French SS, Moore MC & Demas GE** (2009). Ecological immunology: the organism in context. *Integrative and Comparative Biology*, **49**:246-253.
- Friberg M, Posledovich D & Wiklund C** (2015). Decoupling of female host plant preference and offspring performance in relative specialist and generalist butterflies. *Oecologia*, **178**:1181-1192.
- Fricke C, Adler MI, Brooks RC & Bonduriansky R** (2015). The complexity of male reproductive success: effects of nutrition, morphology, and experience. *Behavioral Ecology*, **26**:617-624.
- Friedländer M, Seth RK & Reynolds SE** (2005). Eupyrene and apyrene sperm: dichotomous spermatogenesis in Lepidoptera. *Advances in Insect Physiology*, **32**:206-308.
- Galet P** (1982). *Les maladies et les parasites de la vigne. Tome II: Les parasites animaux*. Imprimerie du Paysan du midi, Montpellier, France.

- Geiger F, Bengtsson J, Berendse F, Weisser WW, Emmerson M, Morales MB, Onate JJ, Eggers S, Pärt T, Bommarco R, Bengtsson L, Clement LW, Weisser WW, Olszewski A, Ceryngier P, Hawro V, Inchausti P, Fischer C, Flohre A, Thies C & Tscharntke T** (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, **11**:97-105.
- Gerber LR, Gonzalez-Suarez M, Hernandez-Camacho CJ, Young JK & Sabo JL** (2010). The cost of male aggression and polygyny in California sea lions (*Zalophus californianus*). *PloS One*, **5**:e12230-e12230.
- Gilligan TM, Epstein ME, Passoa SC, Powell JA, Sage OC & Brown JW** (2011). Discovery of *Lobesia botrana* [Denis & Schiffermüller] in California: An Invasive Species New to North America (Lepidoptera: Tortricidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **113**:14-30.
- Gillott C** (2003). Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*, **48**:163-184.
- Ginzel MD & Hanks LM** (2003). Contact pheromones as mate recognition cues of four species of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Insect Behavior*, **16**:181-187.
- Greenspan RJ & Ferveur JF** (2000). Courtship in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, **34**:205-232.
- Grether GF** (2010). The evolution of mate preferences, sensory biases, and indicator traits. *Advances in the Study of Behavior*, **41**:35-76.
- Gripenberg S, Mayhew PJ, Parnell M & Roslin T** (2010). A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. *Ecology Letters*, **13**:383-393.
- Groot AT, Marr M, Schöfl G, Lorenz S, Svatos A & Heckel DG** (2008). Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers in Zoology*, **5**:20.
- Gwynne DT & Simmons LW** (1990). Experimental reversal of courtship roles in an insect. *Nature*, **346**:172-174.
- Gwynne DT** (2008). Sexual conflict over nuptial gifts in insects. *Annual Review of Entomology*, **53**:83-101.
- Hallenbeck WH & Cunningham-Burns KM** (1995). Pesticides and human health. University of Illinois, Springer-Verlag, Chicago, USA.
- Harari AR, Zahavi T & Thiéry D** (2011). Fitness cost of pheromone production in signaling female moths. *Evolution*, **65**:1572-1582.
- Harari AR, Zahavi T & Steinitz H** (2015). Female detection of the synthetic sex pheromone contributes to the efficacy of mating disruption of the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Pest Management Science*, **71**:316-322.

- Harris WE & Moore PJ** (2005). Sperm competition and male ejaculate investment in *Nauphoeta cinerea*: effects of social environment during development. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**:474-480.
- Harshman LG & Zera AJ** (2007). The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**:80-86.
- Haynes KF & Baker TC** (1988). Potential for evolution of resistance to pheromones: Worldwide and local variation in chemical communication system of pink bollworm moth, *Pectinophora gossypiella*. *Journal of Chemical Ecology*, **14**:1547-1560.
- Hegarty MP, Hegarty EE & Gentry AH** (1991). Secondary compounds in vines with an emphasis on those with defensive functions. In *The biology of vines* (Eds. Putz F & Mooney HA). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hendrichs J, Robinson AS, Cayol JP & Enkerlin W** (2002). Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. *Florida Entomologist*, **85**:1-13.
- Heuskin S, Vanderplanck M, Bacquet P, Holveck MJ, Kaltenpoth M, Engl T, Pels C, Taverne C, Lognay G & Nieberding CM** (2014). The composition of cuticular compounds indicates body parts, sex and age in the model butterfly *Bicyclus anynana* (Lepidoptera). *Frontiers in Ecology and Evolution*, **2**:37.
- Hight SD, Carpenter JE, Bloem S & Bloem KA** (2005). Developing a sterile insect release program for *Cactoblastis cactorum* (Berg) (Lepidoptera: Pyralidae): effective overflooding ratios and release-recapture field studies. *Environmental Entomology*, **34**:850-856.
- Hill GE** (2011). Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecology Letters*, **14**:625-634.
- Hingle A, Fowler K & Pomiankowski A** (2001a). The effect of transient food stress on female mate preference in the stalk-eyed fly *Cyrtodiopsis dalmanni*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **268**:1239-1244.
- Hingle A, Fowler K & Pomiankowski A** (2001b). Size-dependent mate preference in the stalk-eyed fly *Cyrtodiopsis dalmanni*. *Animal Behaviour*, **61**:589-595.
- Hommay G, Gertz C, Kienlen JC, Pizzol J & Chavigny P** (2002). Comparison between the control efficacy of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and two *Trichogramma cacoeciae* Marchal strains against grapevine moth (*Lobesia botrana* Den. & Schiff.), depending on their release density. *Biocontrol Science and Technology*, **12**:569-581.
- Honěk A** (1993). Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos*, **66**:483-492.
- Hosken DJ & Stockley P** (2004). Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**:87-93.

- Houle D & Kondrashov AS** (2002). Coevolution of costly mate choice and condition-dependent display of good genes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **269**:97-104.
- Howell PI & Knols BG** (2009). Male mating biology. *Malaria Journal*, **8**:S8.
- Huberty AF & Denno RF** (2006). Consequences of nitrogen and phosphorus limitation for the performance of two planthoppers with divergent life-history strategies. *Oecologia*, **149**:444-455.
- Hughes PR & Renwick JAA** (1977). Hormonal and host factors stimulating pheromone synthesis in female western pine beetles, *Dendroctonus brevicomis*. *Physiological Entomology*, **2**:289-292.
- Hunt J, Brooks R & Jennions MD** (2005). Female mate choice as a condition-dependent life-history trait. *The American Naturalist*, **166**:79-92.
- Ifoulis AA & Savopoulou-Soultani M** (2004). Biological control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae by using different formulations of *Bacillus thuringiensis* in 11 vine cultivars under field conditions. *Journal of Economic Entomology*, **97**:340-343.
- Ifoulis AA & Savopoulou-Soultani M** (2006). Use of geostatistical analysis to characterize the spatial distribution of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae in northern Greece. *Environmental Entomology*, **35**:497-506.
- Ingleby FC** (2015). Insect cuticular hydrocarbons as dynamic traits in sexual communication. *Insects*, **6**:732-742.
- Ioriatti C, Anfora G, Tasin M, De Cristofaro Witzgall A & Lucchi P** (2011). Chemical ecology and management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, **104**:1125-1137.
- Irigaray FJ, Moeno-Grijalba F, Marco V & Perez-Moreno I** (2010). Acute and reproductive effects of Align®, an insecticide containing azadirachtin, on the grape berry moth, *Lobesia botrana*. *Journal of Insect Science*, **10**:1-11.
- Iwasa Y & Pomiankowski A** (1999). Good parent and good genes models of handicap evolution. *Journal of Theoretical Biology*, **200**:97-109.
- Janowitz SA & Fischer K** (2010). Costing reproduction: effects of mating opportunity on mating success in male *Bicyclus anynana* butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **64**:1999-2006.
- Jennions MD & Petrie M** (1997). Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biological Reviews*, **72**:283-327.
- Jennions MD & Petrie M** (2000). Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **75**:21-64.
- Jervis MA, Boggs CL & Ferns, PN** (2005). Egg maturation strategy and its associated trade-offs: a synthesis focusing on Lepidoptera. *Ecological Entomology*, **30**:359-375.

- Jervis MA, Boggs CL & Ferns PN** (2007). Egg maturation strategy and survival trade-offs in holometabolous insects: a comparative approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, **90**:293-302.
- Jia Z, Jiang ZH & Sakaluk SK** (2000). Nutritional condition influences investment by male katydids in nuptial food gifts. *Ecological Entomology*, **25**:115-118.
- Johansson BG & Jones TM** (2007). The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews*, **82**:265-289.
- Johnson LK & Hubbell SP** (1984). Male choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **15**:183-188.
- Jones AG & Ratterman NL** (2009). Mate choice and sexual selection: what have we learned since Darwin? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**:10001-10008.
- Jones TM** (2001). A potential cost of monandry in the lekking sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Insect Behavior*, **14**:385-399.
- Karlsson PS** (1994). The significance of internal nutrient cycling in branches for growth and reproduction of *Rhododendron lapponicum*. *Oikos*, **70**:191-200.
- Kast WK** (2001). Twelve years of practical experience using mating disruption against *Eupoecilia ambiguella* and *Lobesia botrana* in vineyards of the Wuerttemberg region, Germany. *IOBC/WPRS Bulletin*, **24**:71-74.
- Kawazu K, Shintani Y & Tatsuki S** (2014). Effect of increased male and female age at mating on the reproductive performance of *Cnaphalocrocis medinalis* (Crambidae: Lepidoptera). *Journal of Economic Entomology*, **107**:1434-1439.
- Kehl T, Beaulieu M, Kehl A & Fischer K** (2015). Old male sex: large ejaculate, many sperm, but few offspring. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **69**:1543-1552.
- Kelly CD & Jennions MD** (2011). Sexual selection and sperm quantity: meta-analyses of strategic ejaculation. *Biological Reviews*, **86**:863-884.
- Kerr AM, Gershman SN & Sakaluk SK** (2010). Experimentally induced spermatophore production and immune responses reveal a trade-off in crickets. *Behavioral Ecology*, **21**:647-654.
- Klassen W & Curtis CF** (2005). History of the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* (Eds. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS). Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Knapp RA & Kovach JT** (1991). Courtship as an honest indicator of male parental quality in the bicolor damselfish, *Stegastes partitus*. *Behavioral Ecology*, **2**:295-300.
- Kogan M** (1998). Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annual Review of Entomology*, **43**:243-270.
- Kokko H, Brooks R, Jennions MD & Morley J** (2003). The evolution of mate choice and mating biases. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **270**:653-664.

- Kokko H, Jennions MD & Brooks R** (2006). Unifying and testing models of sexual selection. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **37**:43-66.
- Koricheva J, Klapwijk MJ & Björkman C** (2012). Life history traits and host plant use in defoliators and bark beetles: implications for population dynamics. In *Insect Outbreaks Revisited* (Eds. Barbosa P, Letourneau DK & Agrawal AA). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Kotiaho JS** (2002). Sexual selection and condition dependence of courtship display in three species of horned dung beetles. *Behavioral Ecology*, **13**:791-799.
- Kotiaho JS & Puurtinen M** (2007). Mate choice for indirect genetic benefits: scrutiny of the current paradigm. *Functional Ecology*, **21**:638-644.
- Kotiaho JS & Simmons LW** (2003). Longevity cost of reproduction for males but no longevity cost of mating or courtship for females in the male-dimorphic dung beetle *Onthophagus binodis*. *Journal of Insect Physiology*, **49**:817-822.
- Kraaijeveld K, Katsoyannos BI, Stavrinos M, Kouloussis NA & Chapman T** (2005). Remating in wild females of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Animal Behaviour*, **69**:771-776.
- Kuhns EH, Pelz-Stelinski K & Stelinski LL** (2012). Reduced mating success of female tortricid moths following intense pheromone auto-exposure varies with sophistication of mating system. *Journal of Chemical Ecology*, **38**:168-175.
- LaMunyon CW & Eisner T** (1994). Spermatophore size as determinant of paternity in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**:7081-7084.
- Landolt PJ & Phillips TW** (1997). Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, **42**:371-391.
- Lane SM, Solino JH, Mitchell C, Blount JD, Okada K, Hunt J & House CM** (2015). Rival male chemical cues evoke changes in male pre- and post-copulatory investment in a flour beetle. *Behavioral Ecology*, **26**:1021-1029.
- Larsdotter-Mellström H, Eriksson K, Janz N, Nylin S & Carlsson MA** (2015). Male butterflies use an anti-aphrodisiac pheromone to tailor ejaculates. *Functional Ecology*. In press.
- Lederhouse RC, Ayres MP & Scriber JM** (1990). Adult nutrition affects male virility in *Papilio glaucus* L. *Functional Ecology*, **6**:743-751.
- Lee KP, Simpson SJ, Clissold FJ, Brooks R, Ballard JWO, Taylor PW, Soran N & Raubenheimer D** (2008). Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**:2498-2503.
- Lehmann GU & Lehmann AW** (2009). Condition-dependent spermatophore size is correlated with male's age in a bushcricket (Orthoptera: Phaneropteridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **96**:354-360.

- Leskinen M, Markkula I, Koistinen J, Pylkkö P, Ooperi S, Siljamo P, Ojanen H, Raiskio S & Tiilikkala K** (2011). Pest insect immigration warning by an atmospheric dispersion model, weather radars and traps. *Journal of Applied Entomology*, **135**:55-67.
- Lessells CM & Boag PT** (1987). Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *The Auk*, **104**:116-121.
- Lewis SM & South A** (2012). The evolution of animal nuptial gifts. *Advances in the Study of Behavior*, **44**:53-97.
- Lewis SM, South A, Burns R & Al-Wathiqui N** (2011). Nuptial gifts. *Current Biology*, **21**:R644-R645.
- Lewis SM, Vahed K, Koene JM, Engqvist L, Bussière LF, Perry JC, Gwynne D, Lehmann GUC** (2014). Emerging issues in the evolution of animal nuptial gifts. *Biology Letters*, **10**:20140336.
- Lewis Z & Wedell N** (2007). Effect of adult feeding on male mating behaviour in the butterfly, *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Behavior*, **20**:201-213.
- Liimatainen J, Hoikkala A & Shelly T** (1997). Courtship behavior in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) comparison of wild and mass-reared males. *Annals of the Entomological Society of America*, **90**:836-843.
- Lindström J, & Kokko H** (1998). Sexual reproduction and population dynamics: the role of polygyny and demographic sex differences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **265**:483-488.
- Loubère LA** (2014). *The wine revolution in France: the twentieth century*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Maher N & Thiéry D** (2004a). A bioassay to evaluate the activity of chemical stimuli from grape berries on the oviposition of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, **94**:27-33.
- Maher N & Thiéry D** (2004b). Distribution of chemo-and mechanoreceptors on the tarsi and ovipositor of female European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **110**:135-143.
- Maher N, Thiéry D & Städler E** (2006). Oviposition by *Lobesia botrana* is stimulated by sugars detected by contact chemoreceptors. *Physiological Entomology*, **31**:14-22.
- Maklakov AA, Simpson SJ, Zajitschek F, Hall MD, Dessmann J, Clissold F, Raubenheimer D, Bonduriansky R & Brooks, RC** (2008). Sex-specific fitness effects of nutrient intake on reproduction and lifespan. *Current Biology*, **18**:1062-1066.
- Maor M, Kamensky B, Shloush S & Yuval B** (2004). Effects of post-teneral diet on foraging success of sterile male Mediterranean fruit flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **110**:225-230.

- Marcotte M, Delisle J & McNeil JN** (2003). Pheromonostasis is not directly associated with post-mating sperm dynamics in *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana* females. *Journal of Insect Physiology*, **49**:81-90.
- Mattson Jr WJ** (1980). Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**:119-161.
- Maynard-Smith J & Harper D** (2003). *Animal signals*. Oxford University Press, UK.
- McGovern PE** (2003). *Ancient wine: the search for the origins of viniculture*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- McNeil JN & Delisle J** (1989). Are host plants important in pheromone-mediated mating systems of Lepidoptera? *Experientia*, **45**:236-240.
- Mellström HL & Wiklund C** (2009). Males use sex pheromone assessment to tailor ejaculates to risk of sperm competition in a butterfly. *Behavioral Ecology*, **20**:1147-1151.
- Metcalf NB & Monaghan P** (2001). Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology & Evolution*, **16**:254-260.
- Mevi-Schütz J & Erhardt A** (2003). Larval nutrition affects female nectar amino acid preference in the map butterfly (*Araschnia levana*). *Ecology*, **84**:2788-2794.
- Mevi-Schütz J & Erhardt A** (2005). Amino acids in nectar enhance butterfly fecundity: a long-awaited link. *The American Naturalist*, **165**:411-419.
- Milinski M & Bakker TC** (1992). Costs influence sequential mate choice in sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **250**:229-233.
- Miller JR, Gut LJ, De Lame FM, & Stelinski LL** (2006). Differentiation of Competitive vs. Non-competitive Mechanisms Mediating Disruption of Moth Sexual Communication by Point Sources of Sex Pheromone (Part I): Theory1. *Journal of Chemical Ecology*, **32**:2089-2114.
- Miller TE & Inouye BD** (2011). Confronting two-sex demographic models with data. *Ecology*, **92**:2141-2151.
- Milonas PG, Farrell SL & Andow DA** (2011). Experienced males have higher mating success than virgin males despite fitness costs to females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**:1249-1256.
- Milonas PG, Savopoulou-Soultani M & Stavridis DG** (2001). Day-degree models for predicting the generation time and flight activity of local populations of *Lobesia botrana* (Den. & Schiff.) (Lep., Tortricidae) in Greece. *Journal of Applied Entomology*, **125**:515-518.
- Molleman F** (2010). Puddling: from natural history to understanding how it affects fitness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **134**:107-113.

- Molleman F, Zwaan BJ & Brakefield PM** (2004). The effect of male sodium diet and mating history on female reproduction in the puddling squinting bush brown *Bicyclus anynana* (Lepidoptera). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **56**:404-411.
- Møller AP & Jennions M** (2001). How important are direct fitness benefits of sexual selection? *Naturwissenschaften*, **88**:401-415.
- Møller AP & Alatalo RV** (1999). Good-genes effects in sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **266**:85-91.
- Moravie MA, Davison AC, Pasquier D & Charmillot PJ** (2006). Bayesian forecasting of grape moth emergence. *Ecological Modelling*, **197**:478-489.
- Morbey YE & Ydenberg RC** (2001). Protandrous arrival timing to breeding areas: a review. *Ecology Letters*, **4**:663-673
- Moreau J & Thiéry D** (2013). Qualité de la plante hôte et succès reproducteur. In *Interactions insectes-plantes* (Eds. Sauvion N, Calatayud PA, Thiéry D & Marion-Poll F). IRD, Quae, France.
- Moreau J, Arruego X, Benrey B & Thiéry D** (2006a). Differences in nutritional quality of parts of *Vitis vinifera* berries affect fitness of the European grapevine moth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **119**:93-99.
- Moreau J, Benrey B & Thiéry D** (2006b). Assessing larval food quality for phytophagous insects: are the facts as simple as they appear?. *Functional Ecology*, **20**:592-600.
- Moreau J, Benrey B & Thiéry D** (2006c). Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, **96**:205-212.
- Moreau J, Monceau K & Thiéry D** (2015). Larval food influences temporal oviposition and egg quality traits in females of *Lobesia botrana*. *Journal of Pest Science*. In press.
- Moreau J, Rahme J, Benrey B & Thiéry D** (2008). Larval host plant origin modifies the adult oviposition preference of the female European grapevine moth *Lobesia botrana*. *Naturwissenschaften*, **95**:317-324.
- Moreau J, Richard A, Benrey B & Thiéry D** (2009). Host plant cultivar of the grapevine moth *Lobesia botrana* affects the life history traits of an egg parasitoid. *Biological Control*, **50**:117-122.
- Moreau J, Thiéry D, Troussard JP & Benrey B** (2007). Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology*, **32**:747-753.
- Moreau J, Villemant C, Benrey B, & Thiéry D.** (2010). Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae): the influence of region and cultivar. *Biological Control*, **54**:300-306.

- Morehouse NI & Rutowski RL** (2010). Developmental responses to variable diet composition in a butterfly: the role of nitrogen, carbohydrates and genotype. *Oikos*, **119**:636-645.
- Mori BA & Evenden ML** (2012). When mating disruption does not disrupt mating: fitness consequences of delayed mating in moths. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **146**:50-65.
- Muller K, Vogelweith F, Thiéry D, Moret Y & Moreau J** (2015a). Immune benefits from alternative host plants could maintain polyphagy in a phytophagous insect. *Oecologia*, **177**:467-475.
- Muller K, Thiéry D, Moret Y & Moreau J** (2015b). Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **69**:39-47.
- Naranjo SE & Ellsworth PC** (2009). Fifty years of the integrated control concept: moving the model and implementation forward in Arizona. *Pest Management Science*, **65**:1267-1286.
- Nieberding CM, Fischer K, Saastamoinen M, Allen CE, Wallin EA, Hedenström E & Brakefield, PM** (2012). Cracking the olfactory code of a butterfly: the scent of ageing. *Ecology Letters*, **15**:415-424.
- Niihara S & Watanabe M** (2009). Effects of saline intake until the second mating on the ejaculates and sperm number of male swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* Linnaeus. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, **53**:91-96.
- Nishida R** (2002). Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, **47**:57-92.
- Nishida R, Shelly TE, Whittier TS & Kaneshiro KY** (2000). α -Copaene, a potential rendezvous cue for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*? *Journal of Chemical Ecology*, **26**:87-100.
- Nylin S** (2001). Life history perspectives on pest insects: What's the use? *Austral Ecology*, **26**:507-517.
- Oberhauser KS** (1989). Effects of spermatophores on male and female monarch butterfly reproductive success. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **25**:237-246.
- O'Brien DM, Fogel ML & Boggs CL** (2002). Renewable and nonrenewable resources: amino acid turnover and allocation to reproduction in Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**:4413-4418.
- Oerke EC** (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, **144**:31-43.
- Osborne J** (2011). Harvest Prep - Grapes, Nutrients, and Yeast. In *Viticulture & Enology Technical Newsletter* (Ed. Skinkis P), Oregon, USA.

- Paukku S & Kotiaho JS** (2005). Cost of reproduction in *Callosobruchus maculatus*: effects of mating on male longevity and the effect of male mating status on female longevity. *Journal of Insect Physiology*, **51**:1220-1226.
- Pélozuelo L, Malosse C, Genestier G, Guenego H & Frérot B** (2004). Host-plant specialization in pheromone strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in France. *Journal of Chemical Ecology*, **30**:335-352.
- Pereira R, Yuval B, Liedo P, Teal PEA, Shelly TE, McInnis DO & Hendrichs J** (2013). Improving sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. *Journal of Applied Entomology*, **137**:178-190.
- Pérez-Staples D, Shelly TE & Yuval B** (2012). Female mating failure and the failure of 'mating' in sterile insect programs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **146**:66-78.
- Perkins MC, Woods HA, Harrison JF, & Elser JJ** (2004). Dietary phosphorus affects the growth of larval *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **55**:153-168.
- Perry JC & Rowe L** (2010). Condition-dependent ejaculate size and composition in a ladybird beetle. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **277**:3639-3648.
- Perry JC, Sirot L & Wigby S** (2013). The seminal symphony: how to compose an ejaculate. *Trends in Ecology & Evolution*, **28**:414-422.
- Picart D** (2009). *Modélisation et estimation des paramètres liés au succès reproducteur d'un ravageur de la vigne (Lobesia botrana DEN. & SCHIFF.)* (PhD Thesis, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, France).
- Popp MP, Wilkinson RC, Jokela EJ, Harding RB & Phillips TW** (1989). Effects of slash pine phloem nutrition on the reproductive performance of *Ips calligraphus* (Coleoptera: Scolytidae). *Environmental Entomology*, **18**:795-799.
- Raina AK, Kingan TG & Mattoo AK** (1992). Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth. *Science*, **255**:592-594.
- Rankin DJ & Kokko H** (2007). Do males matter? The role of males in population dynamics. *Oikos*, **116**:335-348.
- Reddy GV & Guerrero A** (2004). Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science*, **9**:253-261.
- Reineke A, Assaf HA, Kulanek D, Mori N, Pozzebon A & Duso C** (2015). A novel set of microsatellite markers for the European Grapevine Moth *Lobesia botrana* isolated using next-generation sequencing and their utility for genetic characterization of populations from Europe and the Middle East. *Bulletin of Entomological Research*, **105**:498-416.
- Rhainds M** (2015). Size-dependent realized fecundity in two lepidopteran capital breeders. *Environmental Entomology*, **44**:1193-1200.

- Ritchie MG, Sunter D & Hockham LR** (1998). Behavioral components of sex role reversal in the tettigoniid bushcricket *Ephippiger ephippiger*. *Journal of Insect Behavior*, **11**:481-491.
- Roelofs W, Kochansky J, Cardé R, Arn H & Rauscher S** (1973). Sex attractant of the grape vine moth, *Lobesia botrana*. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, **46**:71-73.
- Roff DA** (2002). *Life history evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, USA
- Rooney J & Lewis SM** (1999). Differential allocation of male-derived nutrients in two lampyrid beetles with contrasting life-history characteristics. *Behavioral Ecology*, **10**:97-104.
- Roush R & Tabashnik BE** (1990). *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall, London, UK.
- Rowe L & Houle D** (1996). The lek paradox and the capture of genetic variance by condition dependent traits. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **263**:1415-1421.
- Royer L & McNeil JN** (1993). Male investment in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): impact on female longevity and reproductive performance. *Functional Ecology*, **7**:209-215.
- Sahara K & Takemura Y** (2003). Application of artificial insemination technique to eupyrene and/or apyrene sperm in *Bombyx mori*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, **297**:196-200.
- Sakaluk SK, Avery RL & Weddle CB** (2006). Cryptic Sexual Conflict in Gift-Giving Insects: Chasing the Chase-Away. *The American Naturalist*, **167**:94-104.
- Saour G** (2014). Sterile insect technique and F1 sterility in the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Journal of Insect Science*, **14**:1-10.
- Savopoulou-Soultani M, Nikolaou N & Milonas PG** (1999). Influence of maturity stage of grape berries on the development of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Journal of Economic Entomology*, **92**:551-556.
- Schade JD, Kyle M, Hobbie SE, Fagan WF & Elser JJ** (2003). Stoichiometric tracking of soil nutrients by a desert insect herbivore. *Ecology Letters*, **6**:96-101.
- Scharf I, Peter F & Martin OY** (2013). Reproductive trade-offs and direct costs for males in arthropods. *Evolutionary Biology*, **40**:169-184.
- Schmitz V, Roehrich R & Stockel J** (1995). Disruption mechanisms of pheromone communication in the European grape moth *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lep., Tortricidae) II. Influence of the population density and the distance between insects for males to detect the females in atmosphere impregnated by pheromone. *Journal of Applied Entomology*, **119**:303-308.

- Schneider JM, Lucass C, Brandler W & Fromhage L** (2011). Spider males adjust mate choice but not sperm allocation to cues of a rival. *Ethology*, **117**:970-978.
- Schwartz M & Rodhain F** (2008). *Des microbes et des hommes, qui va l'emporter?* Odile Jacob, Paris, France.
- Sharon R, Zahavi T, Soroker V & Harari AR** (2009). The effect of grape vine cultivars on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) population levels. *Journal of Pest Science*, **82**:187-193.
- Shelly TE & McInnis DO** (2001). Exposure to ginger root oil enhances mating success of irradiated, mass-reared males of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, **94**:1413-1418.
- Shelly TE, McInnis DO, Pahio E & Edu J** (2004). Aromatherapy in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): sterile males exposed to ginger root oil in prerelease storage boxes display increased mating competitiveness in field-cage trials. *Journal of Economic Entomology*, **97**:846-853.
- Shelly TE, McInnis DO, Rodd C, Edu J, & Pahio E** (2007). Sterile insect technique and Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): assessing the utility of aromatherapy in a Hawaiian coffee field. *Journal of economic entomology*, **100**:273-282.
- Silberglied RE, Shepherd JG & Dickinson JL** (1984). Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *The American Naturalist*, **123**:255-265.
- Simmons LW & Emlen DJ** (2006). Evolutionary trade-off between weapons and testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**:16346-16351.
- Simmons LW & Parker GA** (1989). Nuptial feeding in insects: mating effort versus paternal investment. *Ethology*, **81**:332-343.
- Simmons LW** (2001). *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Simmons LW** (2011). Resource allocation trade-off between sperm quality and immunity in the field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. *Behavioral Ecology*, **23**:168-173.
- Simmons LW, Teale RJ, Maier M, Standish RJ, Bailey WJ & Withers PC** (1992). Some costs of reproduction for male bushcrickets, *Requena verticalis* (Orthoptera: Tettigoniidae) allocating resources to mate attraction and nuptial feeding. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **31**:57-62.
- Slatyer RA, Mautz BS, Backwell PR & Jennions MD** (2012). Estimating genetic benefits of polyandry from experimental studies: a meta-analysis. *Biological Reviews*, **87**:1-33.
- Smadja C & Butlin RK** (2009). On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity*, **102**:77-97.
- Smedley SR & Eisner T** (1996). Sodium: a male moth's gift to its offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**:809-813.

- South A & Lewis SM** (2011). The influence of male ejaculate quantity on female fitness: a meta-analysis. *Biological Reviews*, **86**:299-309.
- Stearns SC** (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Steinitz H, Sadeh A, Kliot A & Harari A** (2014). Effects of radiation on inherited sterility in the European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Pest Management Science*, **71**:24-31.
- Stern VM, Smith RF, Van den Bosch R & Hagen KS** (1959). The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. The integrated control concept. *Hilgardia*, **29**:81-101.
- Sterner RW & Elser JJ** (2002). *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Stines AP, Grubb J, Gockowiak H, Henschke PA, Høj PB & Heeswijck RV** (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **6**:150-158.
- Swanson WJ & Vacquier VD** (2002). Reproductive protein evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**:161-179.
- Symonds MR & Elgar MA** (2004). Species overlap, speciation and the evolution of aggregation pheromones in bark beetles. *Ecology Letters*, **7**:202-212.
- Taylor PW, Kaspi R, Mossinson S & Yuval B** (2001). Age-dependent insemination success of sterile Mediterranean fruit flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **98**:27-33.
- Thacker JRM** (2002). *An introduction to arthropod pest control*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Thiéry D & Delbac L** (2011). Pheromones et confusion sexuelle en vignoble. *Union Girondine des vins de Bordeaux*, **1076**:38-43.
- Thiéry D & Moreau J** (2005). Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, **143**:548-557.
- Thiéry D** (2005). *Vers de la grappe. Les connaître pour s'en protéger*. Vigne & vin publications internationales, Bordeaux, France.
- Thiéry D** (2008). *Les tordeuses nuisibles à la vigne*. Féret Publication, Bordeaux, France.
- Thiéry D** (2011). Gaps in knowledge for modern integrated protection in viticulture: lessons from controlling grape berry moths. *IOBC/WPRS Bulletin*, **67**:305-311.
- Thiéry D, Monceau K & Moreau J** (2014). Different emergence phenology of European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae) on six varieties of grapes. *Bulletin of Entomological Research*, **104**:277-287.
- Thomas MB** (1999). Ecological approaches and the development of "truly integrated" pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**:5944-5951.

- Thomas ML** (2011). Detection of female mating status using chemical signals and cues. *Biological Reviews*, **86**:1-13.
- Thomas Y, Bethenod MT, Pélozuelo L, Frérot B & Bourguet D** (2003). Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European Corn Borer, *Ostrinia Nubilalis* Hubner I. Sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Evolution*, **57**:261-273.
- Tigreros N** (2013). Linking nutrition and sexual selection across life stages in a model butterfly system. *Functional Ecology*, **27**:145-154.
- Tilman D, Balzer C, Hill J & Befort BL** (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**:20260-20264.
- Torres-Vila LM & Jennions MD** (2005). Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **57**:318-326.
- Torres-Vila LM & Rodríguez-Molina MC** (2002). Egg size variation and its relationship with larval performance in the Lepidoptera: the case of the European grapevine moth *Lobesia botrana*. *Oikos*, **99**:272-283.
- Torres-Vila LM, Gragera J, Rodríguez-Molina MC & Stockel J** (2002a). Heritable variation for female remating in *Lobesia botrana*, a usually monandrous moth. *Animal Behaviour*, **64**:899-907.
- Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC & Stockel J** (2002b). Delayed mating reduces reproductive output of female European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, **92**:241-249.
- Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC, McMinn M & Rodríguez-Molina A** (2004). Larval food source promotes cyclic seasonal variation in polyandry in the moth *Lobesia botrana*. *Behavioral Ecology*, **16**:114-122.
- Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC, Roehrich R & Stockel J** (1999). Vine phenological stage during larval feeding affects male and female reproductive output of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, **89**:549-556.
- Torres-Vila LM, Stockel J & Rodríguez-Molina MC** (1997a). Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Physiological Entomology*, **22**:387-393.
- Torres-Vila LM, Stockel J, Roehrich R & Rodríguez-Molina MC** (1997a). The relation between dispersal and survival of *Lobesia botrana* larvae and their density in vine inflorescences. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **84**:109-114.
- Trivers R** (1972). Parental investment and sexual selection. In *Sexual Selection & the Descent of Man* (Ed. Campbell B). Aldine, Chicago, USA.

- Umbers KD, Symonds MR & Kokko H** (2015). The mathematics of female pheromone signaling: strategies for aging virgins. *The American Naturalist*, **185**:417-432.
- Unbehend M, Hänniger S, Vásquez GM, Juárez ML, Reisig D, McNeil JN, Meagher RL, Jenkins DA, Heckel DG & Groot AT** (2014). Geographic variation in sexual attraction of *Spodoptera frugiperda* corn-and rice-strain males to pheromone lures. *PloS One*, **9**:e89255.
- Vahed K & Gilbert FS** (1996). Differences across taxa in nuptial gift size correlate with differences in sperm number and ejaculate volume in bushcrickets (Orthoptera: Tettigoniidae). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **263**:1257-1265.
- Vahed K** (1998). The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. *Biological Reviews*, **73**:43-78.
- Vahed K** (2006). Larger ejaculate volumes are associated with a lower degree of polyandry across bushcricket taxa. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **273**:2387-2394.
- Vahed K** (2007). All that glisters is not gold: sensory bias, sexual conflict and nuptial feeding in insects and spiders. *Ethology*, **113**:105-127.
- Van Driesche R, Hoddle M & Center T** (2009). *Control of pests and weeds by natural enemies: an introduction to biological control*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Van Handel E** (1985a). Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **1**:302-304.
- Van Handel E** (1985b). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **1**:299-301.
- Varela, LG, Smith, RJ, Cooper, ML & Hoenisch, RW** (2010). European grapevine moth, *Lobesia botrana*. Napa Valley vineyards. *Practical Winery & Vineyard Journal*.
- Vargas-Terán M, Hofmann HC & Tweddle NE** (2005). Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* (Eds. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS). Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Vassiliou VA** (2009). Control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) in vineyards in Cyprus using the mating disruption technique. *Crop Protection*, **28**:145-150.
- Velando A, Beamonte-Barrientos R & Torres R** (2006). Pigment-based skin colour in the blue-footed booby: an honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia*, **149**:535-542.
- Velde LV, Damiens D & Van Dyck H** (2011). Spermatophore and sperm allocation in males of the monandrous butterfly *Pararge aegeria*: the female's perspective. *Ethology*, **117**:645-654.

- Virkki N** (1969). Sperm bundles and phylogenesis. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, **101**:13-27.
- Vogelweith F, Dourneau M, Thiéry D, Moret Y & Moreau J** (2013). Geographical variation in parasitism shapes larval immune function in a phytophagous insect. *Naturwissenschaften*, **100**:1149-1161.
- Vogelweith F, Thiéry D, Quaglietti B, Moret Y & Moreau J** (2011). Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecology*, **25**:1241-1247.
- Vreysen MJ, Hendrichs J & Enkerlin WR** (2006). The sterile insect technique as a component of sustainable area-wide integrated pest management of selected horticultural insect pests. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, **14**:107-131.
- Vreysen MJ, Robinson AS & Hendrichs J** (2007). *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Wagner WE & Harper CJ** (2003). Female life span and fertility are increased by the ejaculates of preferred males. *Evolution*, **57**:2054-2066.
- Wagner WE** (2011). Direct benefits and the evolution of female mating preferences: conceptual problems, potential solutions, and a field cricket. *Advances in the Study of Behavior*, **43**:273-319.
- Waldbauer GP, Cohen RW & Friedman S** (1984). Self-selection of an optimal nutrient mix from defined diets by larvae of the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie). *Physiological Zoology*, **57**:590-597.
- Walker PW & Allen GR** (2011). Delayed mating and reproduction in the autumn gum moth *Mnesampela privata*. *Agricultural and Forest Entomology*, **13**:341-347.
- Walter GH** (2005). *Insect pest management and ecological research*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Ward SA** (1991). Reproduction and host selection by aphids: the importance of 'rendezvous' hosts. In *Reproductive behaviour in insects* (Eds. Bailey WJ & Ridsdill-Smith J). Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Watanabe M & Hachisuka A** (2005). Dynamics of eupyrene and apyrene sperm storage in ovipositing females of the swallowtail butterfly *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae). *Entomological Science*, **8**:65-71.
- Watanabe M & Hirota M** (1999). Effects of sucrose intake on spermatophore mass produced by male swallowtail butterfly *Papilio Xuthus* L. *Zoological Science*, **16**:55-61.
- Watanabe M & Kamikubo M** (2005). Effects of saline intake on spermatophore and sperm ejaculation in the male swallowtail butterfly *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae). *Entomological Science*, **8**:161-166.

- Watanabe M & Sasaki N** (2010). Pattern of sperm storage and migration in the reproductive tract of the swallowtail butterfly *Papilio xuthus*: cryptic female choice after second mating. *Physiological Entomology*, **35**:328-333.
- Way MJ & Van Emden HF** (2000). Integrated pest management in practice—pathways towards successful application. *Crop Protection*, **19**:81-103.
- Wedell N & Cook PA** (1999). Butterflies tailor their ejaculate in response to sperm competition risk and intensity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **266**:1033-1039.
- Wedell N & Karlsson B** (2003). Paternal investment directly affects female reproductive effort in an insect. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **270**:2065-2071.
- Wedell N & Ritchie MG** (2004). Male age, mating status and nuptial gift quality in a bushcricket. *Animal Behaviour*, **67**:1059-1065.
- Wedell N, Gage MJ & Parker GA** (2002). Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**:313-320.
- Wenninger EJ & Averill AL** (2006). Effects of delayed mating on reproductive output of female oriental beetle *Anomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Agricultural and Forest Entomology*, **8**:221-231.
- West SA & Cunningham JP** (2002). A general model for host plant selection in phytophagous insects. *Journal of Theoretical Biology*, **214**:499-513.
- Wheeler D** (1996). The role of nourishment in oogenesis. *Annual Review of Entomology*, **41**:407-431.
- Wicker-Thomas C** (2011). Evolution of insect pheromones and their role in reproductive isolation and speciation. *Annales De La Société Entomologique De France*, **47**:55-62.
- Wigby S, Sirot LK, Linklater JR, Buehner N, Calboli FC, Bretman A, Wolfner MR & Chapman T** (2009). Seminal fluid protein allocation and male reproductive success. *Current Biology*, **19**:751-757.
- Win AT, Kojima W & Ishikawa Y** (2015). Female Condition-dependent Allocation of Nuptial Gifts by Males in the Moth *Ostrinia scapularis* (Lepidoptera: Crambidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **108**:229-234.
- Witzgall P, Kirsch P & Cork A** (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology*, **36**:80-100.
- Witzgall P, Tasin M, Buser HR, Wegner-Kiß G, Mancebón VSM, Ioriatti C, Bäckman A-C, Bengton L, Lehman L & Francke W** (2005). New pheromone components of the grapevine moth *Lobesia botrana*. *Journal of chemical ecology*, **31**:2923-2932.
- Wolfner MF** (2002). The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, **88**:85-93.

- Wong BB & Jennions MD** (2003). Costs influence male mate choice in a freshwater fish. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **270**:S36-S38.
- Wyatt TD** (2014) *Pheromones and Animal Behaviour: Chemical Signals and Signature Mixes*. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Xu J & Wang Q** (2014). Ejaculate economics: an experimental test in a moth. *Biology letters*, **10**:20131031.
- Yadav SK** (2010). Pesticide applications-threat to ecosystems. *Journal of Human Ecology*, **32**:37-45.
- Yuval B, Kaspi R, Field SA, Blay S & Taylor P** (2002). Effects of post-teneral nutrition on reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, **85**:165-170.
- Yuval B, Maor M, Levy K, Kaspi R, Taylor P & Shelly T** (2007). Breakfast of champions or kiss of death? Survival and sexual performance of protein-fed, sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, **90**:115-122.
- Zalucki MP, Clarke AR & Malcolm SB** (2002). Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, **47**:361-393.
- Zhang B, Xue HJ, Song KQ, Liu J, Li WZ, Nie RE & Yang XK** (2014). Male mate recognition via cuticular hydrocarbons facilitates sexual isolation between sympatric leaf beetle sister species. *Journal of Insect Physiology*, **70**:15-21.
- Zuk M & Stoehr AM** (2002). Immune defense and host life history. *The American Naturalist*, **160**:S9-S22.

ANNEXES

MANUSCRIT 6

IMMUNE BENEFITS FROM ALTERNATIVE HOST PLANTS COULD MAINTAIN POLYPHAGY IN A PHYTOPHAGOUS INSECT

Avant de commencer à étudier l'influence du cépage de vigne sur le potentiel reproductif des adultes chez Eudémis, j'avais précédemment réalisé mon stage de Master 2 sur cette même espèce mais en m'intéressant à l'effet de la plante hôte sur les performances immunitaires des chenilles. Les résultats de ces travaux ont été valorisés dans une publication parue dans la revue *Oecologia*. Cette étude n'a pas été intégrée au corps de ce manuscrit car, même si elle concerne la même espèce, la problématique posée était trop éloignée de celles abordées au cours de ma thèse. En effet, il s'agissait d'examiner si le maintien de la polyphagie chez Eudémis – qui est capable d'exploiter une trentaine de plantes hôtes en plus des différents cépages de vignes – pouvait s'expliquer par des avantages en termes d'immunité pendant le développement larvaire. Nous avons démontré, au cours de cette étude, que les chenilles élevées sur des plantes hôtes alternatives avaient une meilleure survie, une meilleure croissance et des niveaux de défenses immunitaires plus importants que les chenilles élevées sur des cépages de vigne. Ces résultats, qui suggèrent de forts bénéfices pour les chenilles à s'alimenter de plantes hôtes alternatives, pourraient favoriser le maintien d'une large exploitation de plantes hôtes chez cette espèce, notamment dans un contexte d'interactions tritrophiques, sous les pressions exercées par les parasitoïdes.

Je vous propose de retrouver l'intégralité de cette étude dans cette annexe.

Immune benefits from alternative host plants could maintain polyphagy in a phytophagous insect

Karen Muller · Fanny Vogelweith · Denis Thiéry · Yannick Moret · Jérôme Moreau

Received: 12 September 2014 / Accepted: 16 September 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The tritrophic interactions hypothesis, integrating bottom-up (plant-herbivore) and top-down (herbivore-natural enemies) effects, predicts that specialist herbivores should outcompete generalists. However, some phytophagous insects have generalist diets, suggesting that maintenance of a diverse diet may confer certain fitness advantages that outweigh diet specialization. In field conditions, the European grapevine moth, *Lobesia botrana*, feeds on diverse locally rare alternative host plants (AHPs) although grapevines are a highly abundant and predictable food source. The laboratory studies presented here show that survival, growth, and constitutive levels of immune defences (concentration of haemocytes and phenoloxidase

activity) of *L. botrana* larvae were significantly enhanced when they were fed AHPs rather than grape. These results indicated a strong positive effect of AHPs on life history traits and immune defences of *L. botrana*. Such positive effects of AHPs should be advantageous to the moth under heavy selective pressure by natural enemies and, as a consequence, favour the maintenance of a broad diet preference in this species. We therefore believe that our results account for the role of immunity in the maintenance of polyphagy in phytophagous insects.

Keywords Diet breadth · Herbivory · Immunocompetence · *Lobesia botrana* · Polyphagy

Communicated by Caroline Müller.

K. Muller (✉) · F. Vogelweith · Y. Moret · J. Moreau
Equipe Ecologie Evolutive, Université de Bourgogne, UMR
CNRS 6282 Biogéosciences, 6 Boulevard Gabriel,
21000 Dijon, France
e-mail: karen.muller@u-bourgogne.fr

F. Vogelweith
e-mail: fanny.vogelweith@gmail.com

Y. Moret
e-mail: yannick.moret@u-bourgogne.fr

J. Moreau
e-mail: jerome.moreau@u-bourgogne.fr

F. Vogelweith · D. Thiéry
Institut des Science de la Vigne et du Vin, INRA UMR
1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, Ave E. Bourleaux,
33883 Villenave d'Ornon Cedex, France
e-mail: thiery@bordeaux.inra.fr

D. Thiéry
Université de Bordeaux, INRA UMR 1065, Save, Bordeaux
Sciences Agro, Ave E. Bourleaux, 33883 Villenave d'Ornon
Cedex, France

Introduction

Most phytophagous insects are specialists, in that they feed on a single host plant species (Schoonhoven et al. 2005). While ecological conditions promoting the evolution of such a widespread specialization are still not fully understood (Singer et al. 2004; Smilanich et al. 2009; Mooney et al. 2012), it is generally assumed that specialist phytophagous insects should have a selective advantage compared to generalist ones (Mooney et al. 2012). Studies on the evolution of diet breadth of insect herbivores (monophagy vs. polyphagy) initially had a bitrophic perspective, in that they only considered the interaction of host plants and phytophagous insects (Ehrlich and Raven 1964). From this perspective, specialization can be driven by several factors such as habitat predictability (Wiklund 1974), host-finding capability (Futuyma and Moreno 1988), and physiological constraints due to host plant chemistry (Ehrlich and Raven 1964). Thus, consideration of the bitrophic insect-plant relationship leads to the prediction that herbivore diet

breadth will be wider when host plants are rare and less predictable, and narrower when host plants are abundant and seasonally stable (Logarzo et al. 2011).

However, this narrow bitrophic view has been criticized (Bernays and Graham 1988; Singer and Stireman 2005). It is now well established that phytophagous insects are under pressure from host plants and natural enemies, such as predators, parasitoids, and pathogens. Thus, the ability to escape from or defend against these organisms must also be considered in order to completely understand the evolution of insect diet breadth (Singer et al. 2004; Mason et al. 2011; Forister et al. 2012). Mooney et al. (2012) recently proposed the integrative tritrophic interactions hypothesis which consolidates and integrates bottom-up (plant-herbivore) and top-down (predators-herbivores) effects and explains the coexistence of specialist and generalist herbivores. They showed that specialists outperform generalists under diverse combinations of natural enemies and host-plant-quality effects. The tritrophic view has led to the enemy free space hypothesis (Jeffries and Lawton 1984), which states that specialists are better adapted than generalists when using their host plants for protection against natural enemies (Bernays and Graham 1988). Numerous mechanisms may contribute to the reduced predation vulnerability, including superior use of 'biochemical crypsis' (De Moraes and Mescher 2004), superior ability to sequester defensive secondary metabolites (Vencl et al. 2005) or superior insect immune defence.

Insect immune defence, which relies on constitutive and inducible mechanisms involving cellular and humoral components, is thought to be associated with fitness because it protects against a large range of parasites (Schmid-Hempel 2003; Diamond and Kingsolver 2011). Haemocytes are immune cells that circulate in the haemolymph and are recruited during phagocytosis of microbes and encapsulation of eukaryotic parasites such as nematodes and parasitoid eggs. They are certainly the most important functional elements involved in the recognition and encapsulation of pathogens (Lavine and Strand 2002). This latter process often involves melanization of the foreign object through activation of the prophenoloxidase (PPO) cascade, a widespread general response to parasite invasion (Cerenius and Söderhäll 2004). Indeed, the melanin synthesis is catalysed by the phenoloxidase (PO) enzyme, which is produced from its inactive precursor, the PPO stored in the haemolymph and haemocytes. Both of these components of constitutive immune defences (haemocytes and PO cascade activity) are of primary importance to combat larval parasitoids (Eslin and Prevost 1996; Kacsoh and Schlenke 2012), which are a major source of mortality in holometabolous phytophagous insects (Hawkins et al. 1997). The induced response is an additional line of defence that mainly consists of production of a variety of antimicrobial peptides

(Iwanaga and Lee 2005) usually within a few hours of infection; the resulting antibacterial activity of the haemolymph can last for several days (Haine et al. 2008).

Many phytophagous species evolve towards monophagy due to an optimization of the use of their host plants. Polyphagy will be maintained by natural selection when rare host plants offer fitness advantages relative to abundant hosts, so as to offset selection for specialization on the abundant host. Identification of the specific ecological conditions that provide additional fitness is a current challenge for ecologists. It has been already shown that larval performance (growth, size and survival) and adult fitness (Thiéry and Moreau 2005; Rodrigues and Freitas 2013) were enhanced when growing on rare host plants, but only few studies have attempted to integrate parameters of immunological defences to explain these different adaptations to host plants (but see Yang et al. 2008). Indeed, herbivore resistance to infections mostly depends on the immune system (Zuk and Stoehr 2002). In addition, several recent studies showed that the immune systems of phytophagous insects were highly dependent on host plant quality (Ojala et al. 2005; Haviola et al. 2007; Smilanich et al. 2009; Diamond and Kingsolver 2011; Vogelweith et al. 2011). Therefore, variation in the immune response as it relates to host plant quality coupled with differential predation success has the potential to influence the evolution of diet breadth (Smilanich et al. 2009; Lampert 2012).

The European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Denis and Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae), is the major grapevine pest in the Palearctic region (Bovey 1966). Its adaptation to grapes is considered to be relatively recent, because intense damage of vineyards was only reported at the beginning of the twentieth century (Thiéry 2005). Despite the abundance of vineyards across Europe, this insect is a generalist feeder, feeding on flowers and fruits of various plant species (Thiéry 2005). Females oviposit on various plants, including rosemary (*Rosmarinus officinalis*) (Lamiales: Lamiaceae) and *Daphne gnidium* (Malvales: Thymelaeaceae). Furthermore, larvae can complete their development on more than 35 species, belonging to 26 phylogenetically distant families, ranging from eudicotyledons to monocotyledons. This means that *L. botrana* is a 'true generalist' species, feeding on more than 20 families of plants (Bernays and Graham 1988). In addition, *L. botrana* is an ideal species with which to test the role of the immune system in the maintenance of polyphagy, because previous research indicated that different grape cultivars have different effects on the immune system (Vogelweith et al. 2013) and life history traits (Moreau et al. 2006; Thiéry et al. 2014). Given the abundance and predictability of grapes as a food source, *L. botrana* is a good species for examination of the ability of generalist populations or individuals to evolve specialization on particular host plants, because theoretical studies suggest that specialized phytophagous

species generally use predictable, abundant, and easily found plants (reviews by Jaenike 1990; Mayhew 1997; but see Futuyma 1976; Beccaloni and Symons 2000). In other words, *L. botrana* could have evolved towards specialization on grapes, but the fact that it remains polyphagous allows us to examine the factors that underlie the maintenance of polyphagy.

An initial study showed that alternative host plants (AHP; i.e., species of host plants other than the principal host on which larvae are able to complete their entire life cycle) enhanced larval performance and adult reproductive success of *L. botrana* (Thiéry and Moreau 2005). In this study, larvae fed wild host plants exhibited lower mortality, shorter development time, greater pupal weight, better growth rate, longer life span and higher fecundity, longer egg-laying duration and better mating success. This suggests that the use of AHPs may be maintained in the host range because it greatly improves fitness. In the present study, we tested the effect of different host plants on the immune systems of *L. botrana* larvae. Based on our previous study (Thiéry and Moreau 2005), we hypothesize that the immunocompetence of larvae would be higher when they are raised on host plants other than grape. Thus, we compared the basal levels of immune defence of larvae (haemocyte count, activity of PPO cascade, antimicrobial activity) that were raised on different AHPs with those raised on two different cultivars of grape.

Materials and methods

Study organisms

An inbred strain of *L. botrana* (INRA Bordeaux) was used in this study. This culture is based on a great number of caged adults (several thousand per week) to which wild adults are periodically added. This laboratory strain has conserved genetic variability because considerable variation is found in immune parameters among larvae (Vogelweith et al. 2011). The stock colony was maintained without diapause on an artificial diet [1,000 mL water, 15 g agar, 84.63 g maize flour, 41.25 g wheat germ, 45.48 g yeast, 6.03 g ascorbic acid, 3.35 g Wesson salts, 0.32 mL Scala, 5 mL ethanol (95 %), 2.65 g benzoic acid, 2.76 g Nipagin; as described by Thiéry and Moreau (2005)], and maintained at 22 ± 1 °C, 60 ± 10 % relative humidity, and under a 16-h light:8-h dark photoperiod. All tests were performed in a climate-controlled chamber.

Plants, larval diets and general procedure

We tested six different plants that were all suitable hosts for first-generation *L. botrana*, which mostly appeared

during May. The plant hosts included berries of Chardonnay (CHA) and Gewürztraminer (GEW) grape cultivars that were collected from young grape bunches (*Vitis vinifera*) (Vitales: Vitaceae) (VIT) at the beginning of the growing season, stage 27 (Eichhorn and Lorenz 1977) in an experimental vineyard close to Bordeaux (INRA Bordeaux-Aquitaine). The four other hosts were flowers and berries of yarrow (*Achillea millefolium*) (Asterales: Asteraceae) (ACH) collected in Dijon (Burgundy), berries of strawberry tree (*Arbutus unedo*) (Ericales: Ericaceae) (ARB) collected in Martillac close to Bordeaux, flowers and berries of flax-leaved daphne (*Daphne gnidium*) (Malvales: Thymelaeaceae) (DAPH) picked in a sand dune of Soulac, and flowers of tansy (β -thujone chemotype) (*Tanacetum vulgare*) (Asterales: Asteraceae) (TAN) collected in our INRA research centre (see above). Depending on the AHP, the first-generation *L. botrana* larvae grow either on the flower or the fruit in natura. For each of these plants, the corresponding parts were used to make the artificial diet. All plant materials were deep frozen (-18 °C) immediately after collection and then freeze dried.

The influence of host plant species on larval performance and immunity was tested by feeding larvae ad libitum with equivalent amounts of food. Larvae were raised individually in centrifuge tubes filled with 1.5 mL of one of the seven diets made of agar with plant material added from the different species for the six diets. The last diet, the control diet, is highly nutritious and has the same composition as the semi-artificial diet. The six other diets were made with the same composition of the artificial diet but contained only 20 % of the previous amounts of maize flour and wheat germ. The 80 % missing diet was substituted with freeze-dried host plant material from different species ground into fine powder. This procedure has been successfully employed in previous experiments and presents at least three main advantages: (1) larvae are fed in isolation, thus biases due to competition and subsequent food deprivation are prevented; (2) differences in bunch compactness, which has an effect on larval feeding behaviour, are prevented; (3) incidences of infections by fungi, which naturally grow on harvested bunches and can modify larval fitness, are prevented (Savopoulou-Soultani and Tzanakakis 1988; Mondy and Corio-Costet 2000; Moreau et al. 2006).

Each centrifuge tube was filled with the diet and a newly hatched larva (younger than 24 h) was transferred into the tube with a fine brush. Two hundred individual larvae were put on each of the seven diets for a total of 1,400 larvae. The lids of the centrifuge tubes were pierced to allow air circulation. Larval development was monitored weekly. After 2 weeks, larvae were checked every second day to determine when they reached the fifth larval instar. Immune parameters and larval size were measured at this time.

Haemolymph collection

A sample of haemolymph was collected from each larva for the quantification of immune parameters (Vogelweith et al. 2011). Each larva was chilled on ice for 15 min before collection of a 3- μ L sample. A perforation in the posterior part of the ventral side of the abdomen was made with an insulin syringe (Terumo), and haemolymph was collected in a sterile glass capillary (Hirschmann Laborgeräte). One microlitre was placed into a microcentrifuge tube containing 25 μ L of buffer (0.01 M sodium cacodylate, 0.005 M CaCl_2 ; pH 6.5). Ten microlitres of this solution was immediately used for the determination of haemocyte count and the remainder was stored at -27°C for subsequent determination of PO-PPO activity. The other 2 μ L from the capillary was placed into a 0.5 μ L *N*-phenylthiourea (Sigma P7629) coated microcentrifuge tube that contained 3 μ L of the same buffer, a treatment that inhibits PO-PPO activity. This solution was stored at -27°C for the subsequent determination of antimicrobial activity.

Immune parameters

Haemocyte count

The haemocyte count was measured by transfer of 10 μ L of the haemolymph solution into a Neubauer improved haemocytometer and examination by phase contrast microscopy at $400\times$ (Nikon Eclipse E200).

PO and total PO activities

Enzymatic activities of the PO-PPO system were measured with a spectrophotometric assay, as described by Cornet et al. (2009). PO activity was quantified without further activation. Total activity was measured following activation of PPO into PO with chymotrypsin. After thawing and centrifugation (6,500 r.p.m., 15 min, 4°C), the activity of naturally activated PO enzymes was quantified by adding 5 μ L of the sample to a solution consisting of 140 μ L distilled water and 20 μ L phosphate buffered saline (8.74 g NaCl, 1.78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 L distilled water; pH 6.5). Total enzymatic activity (PO and PPO activities) was measured after activation with a chymotrypsin solution (Sigma C7762; 0.007 mg/mL distilled water). Then, 20 μ L of an L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) solution (Sigma D9628; 4 mg/mL distilled water) was added into each well of a 96-well microplate (655161; Greiner Bio-one). The conversion of L-DOPA to dopachrome was allowed to proceed for 40 min at 30°C in a microplate reader (Versamax; Molecular Devices). Readings were taken every 15 s at 490 nm and the results were analysed using SOFT-MaxPro 4.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Enzyme activity

was measured as the slope ($V_{\max}$) of the reaction curve during the linear phase of the reaction and reported as activity per 1 μ L of haemolymph.

Antimicrobial activity

Antimicrobial activity in the haemolymph was measured using a zone of inhibition assay (Moret and Schmid-Hempel 2000). Petri dishes (9-cm diameter; Sterlin) were prepared by addition of 6 mL of a suspension of *Arthrobacter globiformis* (10^5 cells/mL) in 6 mL of a sterile broth medium (10 g bactotryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 1000 mL distilled water, pH 7.5) with 1 % bacto-agar. There were 14 wells per plate and a Pasteur pipette fitted with a ball pump was used to add 2 μ L of the extract solution to each well. A positive control (Tetracycline; Sigma T3383) was included on each plate. The plates were incubated for 48 h at 30°C . Inhibition of *A. globiformis* growth was quantified as the presence/absence of a clear circular zone around each well.

Head capsule size

The body size of each larva was evaluated by measuring its head capsule size. In particular, the distance between the most distant lateral sides of the head capsule was measured with a stereoscopic microscope (Nikon SMA-10A) coupled with a video analysis system (Linkam Scientific Instruments). This estimate of larval body size is commonly used in Lepidoptera and is well acknowledged to categorize instars and body sizes even though weight variation may exist within a single category of size (Godin et al. 2002; Panzavolta 2007; Delbac et al. 2010). In *L. botrana*, body length and weight measurements were not used because sizing and weighing living larvae is extremely difficult, especially in the case of older larvae, which move vigorously and are thus difficult to handle. In fact, measurement of head capsule width of dead larvae is the most reliable measurement of size in *L. botrana*.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using R Software version 2.15.0 (R Development Core Team 2011). The responses of larvae to different host plants were assessed by: (1) measuring the effect of each of the seven different diets; and (2) measuring the effect of diet with a priori pooling into three diet groups—the AHP (ARB, DAPH, TAN, and ACH) group, the VIT (CHA and GEW) group, and the control group.

1. Survival of larvae until the last larval stage in the seven diet groups was compared using Pearson's χ^2 -test. The

effect of diet on head size of larvae was tested with a one-way ANOVA followed by Tukey's test. Log transformation of haemocyte count and square root transformation of basal PO and total PO activities were used to normalize the data before subsequent analysis. These parameters were analysed according to diet using a one-way ANOVA followed by Tukey's test. The presence of antimicrobial activity in the haemolymph was tested with Pearson's χ^2 -test.

- For each variable in the analysis, effect sizes were calculated to provide a standardised measure of differences between the three diet groups. We used Cohen's d -statistic to compare differences in group means standardised by their pooled SD. For each mean d -statistic, we determined the 95 % bootstrap confidence interval (CI) (Nakagawa and Cuthill 2007). Effect sizes were considered to be significantly different from zero if the CI did not bracket the zero value. A greater d -value indicates a larger effect.

Correlations of immune parameters (concentration of haemocytes, PO and total activities) were assessed using Spearman's test on raw data. For each coefficient ρ , the 95 % bootstrap CI was determined. Anti-microbial activity was not considered here because it is a non-continuous variable.

Results

Growth performance: larval survival and head size

The percentage of larvae that survived to the fifth instar was different for larvae fed the different diets (Pearson $\chi^2 = 292.61$; $p < 0.0001$). In particular, survival on the control diet was about 75 %, and was significantly higher than survival on AHP diet or the VIT diet (Table 1).

Larval head capsule width (a proxy for overall size) was also different for larvae fed the different diets ($F_{6,199} = 10.61$; $p < 0.0001$) (Table 1), but there were no differences among the four non-grape species. The last instars of larvae reared on AHP were much larger than those reared on VIT cultivars, but had the same size as larvae reared on the control diet (Fig. 3).

Immune parameters

Analysis of larval haemocyte concentration indicated positive correlations with PO activity [Spearman, $\rho = 0.40$ (95 %CI = 0.33; 0.64); $p < 0.0001$] and total PO activity [Spearman, $\rho = 0.66$ (95 %CI = 0.50; 0.77); $p < 0.0001$]. These two activities were also positively correlated with

Table 1 Effect of diet on performance [percent survival and head capsule size (mm; mean $\pm$ SEM)] of *Lobesia botrana* larvae

Larval diet	Larval performance	
	Survival ($n = 200$ for each diet) (%)	Head capsule size
Yarrow	19.999 ab	1.041 $\pm$ 0.010 a (28)
Strawberry tree	31.000 c	1.016 $\pm$ 0.009 a (50)
Daphne	19.436 ab	1.014 $\pm$ 0.009 a (24)
Tansy	26.679 bc	1.022 $\pm$ 0.008 a (32)
Chardonnay	14.549 a	0.9671 $\pm$ 0.008 b (20)
Gewürztraminer	13.995 a	0.9415 $\pm$ 0.010 b (20)
Control	75.147 d	1.025 $\pm$ 0.007 a (31)

Diets with the *same letter* were not significantly different ($p > 0.05$) based on Pearson's χ^2 -test (survival) and a one-way ANOVA followed by a Tukey's test (head capsule size). The number of larvae fed each diet for head capsule size is given in parentheses

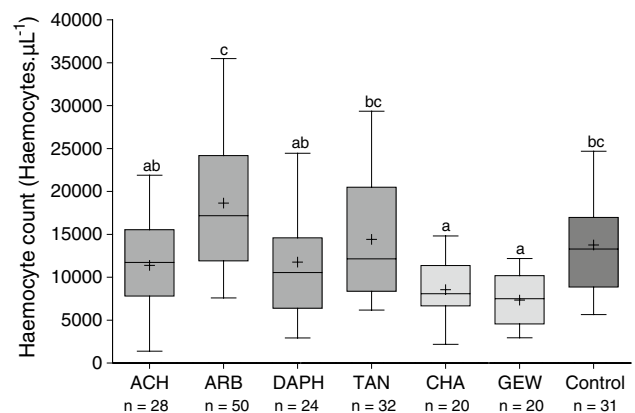


Fig. 1 Effect of diet on haemocyte concentration of fifth-instar larvae of *Lobesia botrana*. Top of each box indicates the first quartile, bottom of each box the third quartile, central line the median, cross the mean, lines above the rectangle the maximum, lines below the rectangle the minimum. Comparisons with Tukey's test were performed on the seven diets, six supplemented with plants [*Achillea millefolium* (ACH), *Arbutus unedo* (ARB), *Daphne gnidium* (DAPH), *Tanacetum vulgare* (TAN), Chardonnay (CHA), *Gewürztraminer* (GEW)] and the control diet. Boxes with the *same letter* are not significantly different ($p > 0.05$). The number of larvae fed each diet appears below the x-axis

each other [Spearman, $\rho = 0.60$ (95 %CI = 0.53; 0.72); $p < 0.0001$].

The haemocyte concentration of haemolymph was different in larvae fed the seven different diets ($F_{6,198} = 11.31$; $P < 0.0001$) (Fig. 1). In particular, larvae fed the two different grape cultivars had the lowest concentrations of haemocytes (Fig. 1). There was also variability among the different host plants. Larvae fed ARB contained nearly 20,000 haemocytes/ μ L, whereas larvae fed ACH or DAPH had fewer than 15,000 haemocytes/ μ L (Fig. 1). Larvae reared

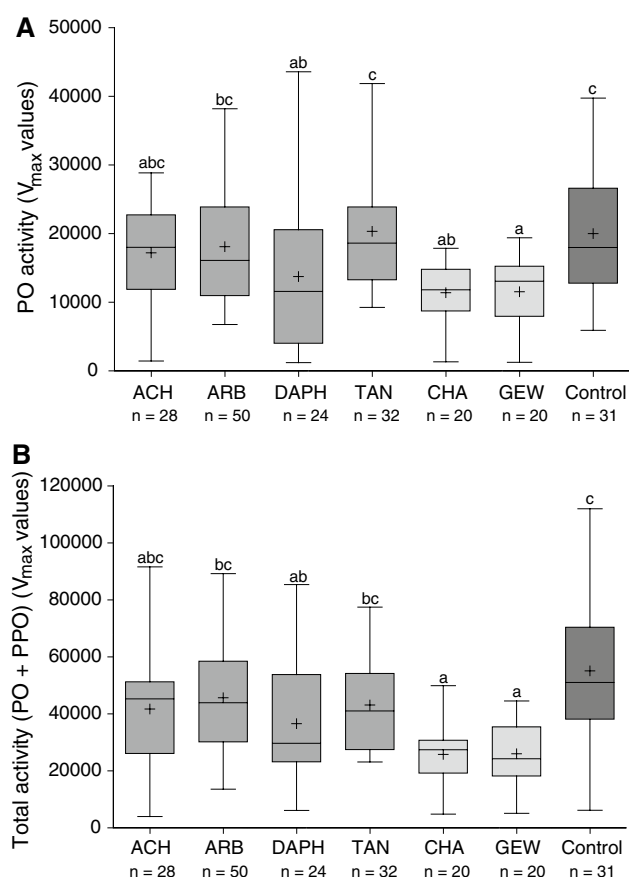


Fig. 2 Effect of diet on phenoloxidase (PO) and prophenoloxidase (PPO) activity ($V_{\max}$) in the haemolymph of fifth-instar larvae of *L. botrana*. Top of each box indicates the first quartile, bottom of each box the third quartile, central line the median, cross the mean, line above the box the maximum, lines below the box the minimum. Comparisons with Tukey's test were performed on the seven diets, six supplemented with plants and the control diet. Boxes with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$). The number of larvae fed each diet appears below the x-axis. For other abbreviations, see Fig. 1

on AHP had more haemocytes than those reared on VIT, but had the same haemocyte count as larvae reared on the control diet (Fig. 3).

Diet also had a significant effect on PO activity ($F_{6,198} = 5.48$, $p < 0.0001$) and total PO activity ($F_{6,198} = 7.05$, $p < 0.0001$) (Fig. 2). There was variability among the different host plant alternatives, and larvae fed CHA and the GEW had the lowest PO and total activities. As previously, activities of both enzymes were higher for larvae reared on AHPs than those reared on VIT cultivars (Fig. 3). PO activity did not differ for larvae fed AHPs and the control diet, but total activity was higher in larvae fed a control diet than the AHP diet (Fig. 3).

Except for the haemolymph of larvae that were fed ACH, which had no evident antimicrobial effect, haemolymph antimicrobial activity ranged from 12 to 20 % for larvae fed the different diets (data not shown). There were

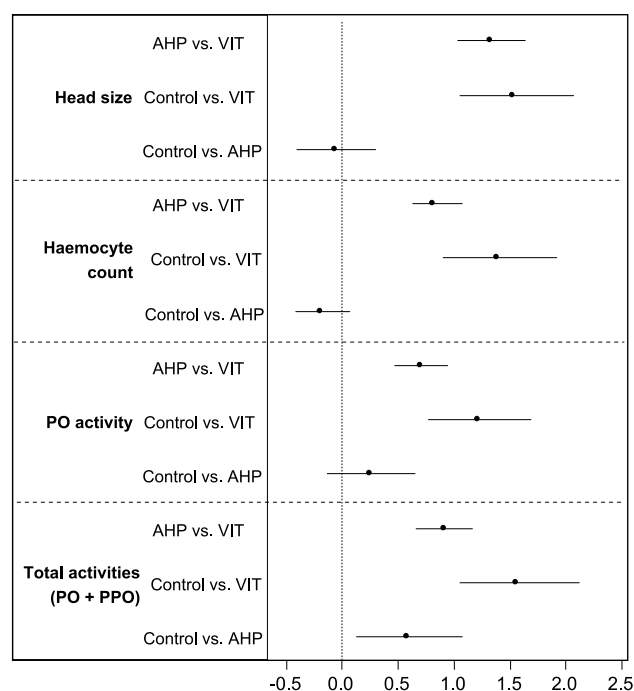


Fig. 3 Cohen's d and 95 % confidence intervals (CI) for head capsule size and larval immune parameters [haemocyte count, PO and total (PO + PPO) activities] in larvae fed alternative host plants (AHPs), *Vitis vinifera* (VIT), or the control diet. Effect sizes were considered to be significantly different from zero if the CI did not bracket the zero value. For other abbreviations, see Figs. 1 and 2

no significant differences among the seven experimental diets ($\chi^2_6 = 7.159$, $p = 0.3064$).

Discussion

The results of the present study support the hypothesis that AHPs are more beneficial than VIT cultivars for the general performance of *L. botrana* larvae, including basal levels of immune defences. In particular, larval performance (survival and growth estimated by head capsule width after molting to the fifth instar) was better when larvae fed on several AHPs rather than VIT cultivars. In addition, the basal activity of the larval immune system (haemocyte count and activities of PO and total PO) was greater when larvae fed on AHPs rather than VIT cultivars. However, we found no difference in the antimicrobial activity of haemolymph of larvae fed AHPs or VIT cultivars. Finally, the development and immunocompetence (except for PO activity), of larvae fed AHPs were similar to those of larvae fed the control diet, which is highly nutritious.

We found that mortality was lower and size was greater when larvae were fed AHPs rather than VIT cultivars. These results are consistent with the results of Thiéry and Moreau (2005) who studied the same species of moth used

in this study. Thiéry and Moreau (2005) found that larvae fed wild host plants had lower mortality and reduced development time, and also had greater pupal weight, growth rate, female longevity, female fecundity, egg-laying duration, and mating success. Taken together, the results of these two studies suggest that AHPs support higher fitness for *L. botrana* larvae than VIT cultivars. This conclusion is reinforced by the fact that larval performance was similar on AHP diets and the control diet, which provides the best source of nutrients. Interestingly, the two grape cultivars used in our study (CHA and GEW) appeared to be of reduced food quality for *L. botrana* larvae. This may be explained by the presence of diverse secondary metabolites in grapes (Conde et al. 2007) that could be toxic to larvae during their early developmental stages (Moreau et al. 2006). For example, high concentrations of condensed and hydrolysable tannins negatively affect growth and development in some Lepidoptera species (Reese et al. 1982; Manuwoto and Scriber 1986). Grape berries contain abundant polyphenols, especially tannins (Hegarty et al. 1991). The lack of certain essential nutrients, such as amino acids or proteins, in grape berries may also explain the poor performance of larvae that fed on VIT cultivars because proteins are essential for larval growth and development (De Bruyn et al. 2002).

Our finding that AHPs provide better immunocompetence to *L. botrana* larvae is consistent with a study in the moth, *Epirrita autumnata* (Lepidoptera: Geometridae). In this latter species, immunity is similar or better in individuals fed AHPs than the main host plant, the mountain birch (*Betula pubescens*) (Fagales: Betulaceae) (Yang et al. 2008). Our findings indicate a strong effect of host plant on the innate immune system. In agreement, recent studies have reported that plant nutritive quality (levels of sugars, proteins, and fatty acids), amount of water, and multiple defence compounds are often positively correlated with immune activity, such as encapsulation rate (Ojala et al. 2005; Haviola et al. 2007) and haemocyte count (Shikano et al. 2010) or PO activity (Klemola et al. 2007). Previous research indicated that host plants with low levels of tyrosine (a major substrate for PO) may adversely affect the ability of phytophagous insects to resist parasitoid attacks through encapsulation and egg melanization (Renault et al. 2002). Hence, it is possible that AHPs may have contained more tyrosine than the two grapevine cultivars. Another possible explanation is that secondary metabolites in our two grape cultivars could have negatively affected the larval immune system due to a direct toxic effect or by forcing larvae to devote energy to detoxification rather than immune function (Smilanich et al. 2009; Lampert 2012 and references therein). For example, in *E. autumnata*, there is a negative relationship between the amount of hydrolysable tannins in the foliage consumed by larvae and immune

response (measured as the melanotic encapsulation rate) (Haviola et al. 2007). Moreover, high PO activity is an indication of good overall health of phytophagous insects (González-Santoyo and Córdoba-Aguilar 2012).

Our results showing enhanced basal levels of immune defence (haemocyte count and PPO activity) on AHPs add to those of Thiéry and Moreau (2005) on general fitness (better growth rate and reproductive rate on AHPs) and support the idea that *L. botrana* is poorly adapted to cultivated grapevines compared to various AHPs. Indeed, if AHPs are likely to provide a competitive advantage to *L. botrana* in terms of growth and reproduction, this advantage might be strengthened in the presence of natural enemies such as parasites and parasitoids. The parasitism rate in *L. botrana* can reach 50 % in some vineyard plots (Xuéreb and Thiéry 2006), and even if abundance and diversity of larval parasitoids may vary between years and geographic regions (Moreau et al. 2010), parasitism pressure coupled with exposure to entomopathogenic fungi appears to be a rather constant trend among most European vineyards. This means that the positive effects of AHPs in terms of survival and growth combined with immunocompetence should be advantageous to the moth under heavy selective pressure by various parasites.

Our laboratory results lead to the hypothesis that the feeding upon AHPs by phytophagous insects in nature may be maintained because dietary diversity increases insect fitness. This may be explicated as follows. Recently mated females must find a host plant for oviposition, and the availability of suitable host plants is an important factor in the choice of oviposition site (West and Cunningham 2002). For example, a study demonstrated that fall webworm females (*Hyphantria cunea*) (Lepidoptera: Arctiidae) are under selection to reduce the time needed to find oviposition sites, and that they choose the most abundant host in their environment (Mason et al. 2011). In the case of *L. botrana*, grapevines are a highly predictable and abundant resource, so females should be able to easily and quickly find a suitable grape host. In this context, we hypothesized that only a small number of mated females would lay eggs on AHPs, and indeed this was the case (Thiéry and Moreau 2005). However, larvae developing on AHPs had better survival, greater growth rate, and shorter development time than those developing on VIT cultivars. Moreover, larvae from AHPs also have stronger immune responses against parasitoid attacks, the highest biotic source of mortality among phytophagous insects (Hawkins et al. 1997). Development time appears to be an important component of fitness in the field because slow development increases the duration of exposure to predators and parasites (Benrey and Denno 1997). Furthermore, Smilanich et al. (2009) argued that the immune response of lepidopteran larvae is one of the most important defence systems against parasitoids.

Thus, larvae that feed on AHPs could have a selective advantage because a functional immune system is essential for the encapsulation of parasitoid eggs (Eslin and Prevost 1996). Finally, adult females of *L. botrana* have a greater reproductive success in terms of longevity and fecundity when grown on AHPs than Vitaceae (Thiéry and Moreau 2005). Under the strong selective pressure exerted by parasitoids in this system, even if AHPs are rare in nature, the fitness benefits and especially the immune benefits they provide to *L. botrana* may be sufficient to prevent the formation of host-specific sub-populations that specialize on grapes. This hypothesis requires testing in the field.

This study highlights the importance of knowing the effect of host plants on the pest immune system to customize biological control programs and improve their success. One interesting application could, for example, rely on adapting a number of parasitoids released as a function of larval host-plant characteristics. It now becomes clear that extending our knowledge of the specificity of the interactions between host plants and the immune system of phytophagous insects in the context of tritrophic systems should provide important insights that should help us to propose solutions for the successful biological control of pests.

In summary, this study demonstrated a strong positive effect of AHPs on the life history traits and immune defences of the European grapevine moth, *L. botrana*. This species may have a diverse diet because such a diet improves immune responses and important life history characteristics. Therefore, this study emphasizes the importance of viewing insect-plant relationships from a tritrophic perspective. Plant chemistry and natural enemies, which can each elicit immune responses, could also interact with each other to influence the diet breadth of herbivores. Indeed, AHPs, which are rarely used by *L. botrana* in the field, could confer many advantages to larvae when the selective pressure exerted by natural enemies is considered. We suggest that additional studies should further examine the role of the immune system in the maintenance of polyphagy in phytophagous insects.

Acknowledgments We thank L. Delbac for technical assistance. This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006). We also thank the Conseil Régional of Aquitaine and the Conseil Régional of Bourgogne. This study has been carried out in the framework of the Cluster of Excellence COTE.

References

- Beccaloni GW, Symons FB (2000) Variation of butterfly diet breadth in relation to host-plant predictability: results from two faunas. *Oikos* 90:50–66
- Benrey B, Denno R (1997) The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology* 78:987–999
- Bernays EA, Graham M (1988) On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecology* 69:886–892
- Bovey P (1966) Super-famille des Tortricidae. In: Balachowsky AS (ed) *Entomologie appliquée à l'agriculture*. Masson, Paris, pp 456–893
- Cerenius L, Söderhäll K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198:116–126
- Conde C, Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Delrot S, Gerós H (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1:1–22
- Cornet S, Biard C, Moret Y (2009) Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia* 159:257–269
- De Bruyn L, Scheirs J, Verhagen R (2002) Nutrient stress, host plant quality and herbivore performance of a leaf-mining fly on grass. *Oecologia* 130:594–599
- De Moraes CM, Mescher MC (2004) Biochemical crypsis in the avoidance of natural enemies by an insect herbivore. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8993–8997
- Delbac L, Lecharpentier P, Thiéry D (2010) Larval determination for the European grapevine moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head capsule widths. *Crop Prot* 29:623–630
- Diamond SE, Kingsolver JG (2011) Host plant quality, selection history and trade-offs shape the immune responses of *Manduca sexta*. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:289–297
- Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18:586–608
- Eichhorn KW, Lorenz DH (1977) Phonologische Entwicklungsstadien der Rebe Nachrichtenbl. Pflanzenschutz (Braunschweig) 29:119–120
- Eslin P, Prevost G (1996) Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Aso-bara tabida* larval parasitoid. *J Insect Physiol* 42:549–555
- Forister ML, Dyer LA, Singer MS, Stireman JO, Lill JT (2012) Revisiting the evolution of ecological specialization, with emphasis on insect-plant interactions. *Ecology* 93:981–991
- Futuyma DJ (1976) Food plant specialization and environmental predictability in Lepidoptera. *Am Nat* 110:285–292
- Futuyma DJ, Moreno G (1988) The evolution of ecological specialization. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 19:207–233
- Godin J, Maltais P, Gaudet S (2002) Head capsule width as an instar indicator for larvae of the cranberry fruitworm (Lepidoptera: Pyralidae) in southeastern New Brunswick. *J Econ Entomol* 95:1308–1313
- González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A (2012) Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomol Exp Appl* 142:1–16
- Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J (2008) Antimicrobial defense and persistent infection in insects. *Science* 322:1257–1259
- Haviola S, Kapari L, Ossipov V, Rantala MJ, Ruuhola T, Haukioja E (2007) Foliar phenolics are differently associated with *Epirrita autumnata* growth and immunocompetence. *J Chem Ecol* 33:1013–1023
- Hawkins BA, Cornell HV, Hochberg ME (1997) Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology* 78:2145–2152
- Hegarty MP, Hegarty EE, Gentry AH (1991) Secondary compounds in vines with an emphasis on those with defensive functions. In: Putz FE, Mooney HA (eds) *The biology of vines*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 287–310
- Iwanaga S, Lee BL (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 38:128–150

- Jaenike J (1990) Host specialization in phytophagous insects. *Annu Rev Ecol Syst* 21:243–273
- Jeffries MJ, Lawton JH (1984) Enemy free space and the structure of ecological communities. *Biol J Linn Soc* 23:269–286
- Kacsoh BZ, Schlenke TA (2012) High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. *PLoS One* 7:e34721
- Klemola N, Klemola T, Rantala MJ, Ruuhola T (2007) Natural host-plant quality affects immune defence of an insect herbivore. *Entomol Exp Appl* 123:167–176
- Lampert E (2012) Influences of plant traits on immune responses of specialist and generalist herbivores. *Insects* 3:573–592
- Lavine MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1295–1309
- Logarzo GA, Casalnuovo MA, Piccinali RV, Braun K, Hasson E (2011) Geographic host use variability and host range evolutionary dynamics in the phytophagous insect *Apagomerella versicolor* (Cerambycidae). *Oecologia* 165:387–402
- Manuwoto S, Scriber JM (1986) Effects of hydrolyzable and condensed tannin on growth and development of two species of polyphagous lepidoptera: *Spodoptera eridania* and *Callosamia promethea*. *Oecologia* 69:225–230
- Mason PA, Wilkes SR, Lill JT, Singer MS (2011) Abundance trumps quality: bi-trophic performance and parasitism risk fail to explain host use in the fall webworm. *Oikos* 120:1509–1518
- Mayhew PJ (1997) Adaptive patterns of host-plant selection by phytophagous insects. *Oikos* 79:417–428
- Mondy N, Corio-Costet MF (2000) The response of the grape berry moth (*Lobesia botrana*) to a dietary phytopathogenic fungus (*Botrytis cinerea*): the significance of fungus sterols. *J Insect Physiol* 46:1557–1564
- Mooney KA, Pratt RT, Singer MS (2012) The tri-trophic interactions hypothesis: interactive effects of host plant quality, diet breadth and natural enemies on herbivores. *PLoS One* 7:e34403
- Moreau J, Benrey B, Thiéry D (2006) Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bull Entomol Res* 96:205–212
- Moreau J, Villemant C, Benrey B, Thiéry D (2010) Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae): the influence of region and cultivar. *Biol Control* 54:300–306
- Moret Y, Schmid-Hempel P (2000) Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290:1166–1168
- Nakagawa S, Cuthill IC (2007) Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol Rev Camb Philos Soc* 82:591–605
- Ojala K, Julkunen-Tiitto R, Lindström L, Mappes J (2005) Diet affects the immune defence and life-history traits of an arctiid moth *Parasemia plantaginis*. *Evol Ecol Res* 7:1153–1170
- Panzavolta T (2007) Instar determination for *Pissodes castaneus* (Coleoptera: Curculionidae) using head capsule widths and lengths. *Environ Entomol* 36:1054–1058
- R Development Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available at: <http://www.r-project.org/>
- Renault S, Petit A, Benedet F, Bigot F, Bigot Y (2002) Effects of the *Diadromus pulchellus* ascovirus, DpAV-4, on the hemocytes encapsulation response and capsule melanization of the leek moth pupa, *Acrolepiopsis assectella*. *J Insect Physiol* 48:297–302
- Rodrigues D, Freitas AV (2013) Contrasting egg and larval performances help explain polyphagy in a florivorous butterfly. *Arthropod Plant Interact* 7:159–167
- Savopoulou-Soultani M, Tzanakakis ME (1988) Development of *Lobesia botrana* (Lepidoptera Tortricidae) on grapes and apples infected with the fungus *Botrytis cinerea*. *Environ Entomol* 17:1–6
- Schmid-Hempel P (2003) Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc R Soc B Biol Sci* 270:357–366
- Schoonhoven LM, Loon JJA, Dicke M (2005) Insect–plant biology. Oxford University Press, Oxford
- Shikano I, Ericsson JD, Cory JS, Myers JH (2010) Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. *Basic Appl Ecol* 11:15–22
- Singer MS, Stireman JO (2005) The tritrophic niche concept and adaptive radiation of phytophagous insects. *Ecol Lett* 8:1247–1255
- Singer MS, Rodrigues D, Stireman JO, Carrière Y (2004) Roles of food quality and enemy-free space in host use by a generalist insect herbivore. *Ecology* 85:2747–2753
- Smilanich AM, Dyer LA, Chambers JQ, Bowers MD (2009) Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth. *Ecol Lett* 12:612–621
- Thiéry D (2005) Les vers de la grappe. Les connaître pour s'en protéger. Vignes et Vins International, Bordeaux
- Thiéry D, Moreau J (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia* 143:548–557
- Thiéry D, Monceau K, Moreau J (2014) Different emergence phenology of European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae) on six varieties of grapes. *Bull Entomol Res* 104:277–287
- Vencl FV, Nogueira-de-Sá F, Allen BJ, Windsor DM, Futuyma DJ (2005) Dietary specialization influences the efficacy of larval tortoise beetle shield defenses. *Oecologia* 145:404–414
- Vogelweith F, Thiéry D, Quaglietti B, Moret Y, Moreau J (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Funct Ecol* 25:1241–1247
- Vogelweith F, Dourneau M, Thiéry D, Moret Y, Moreau J (2013) Geographical variation in parasitism shapes larval immune function in a phytophagous insect. *Naturwissenschaften* 100:1149–1161
- West SA, Cunningham JP (2002) A general model for host plant selection in phytophagous insects. *J Theor Biol* 214:499–513
- Wiklund C (1974) The concept of oligophagy and the natural habitats and host plants of *Papilio machaon* L. in Fennoscandia. *Entomol Scand* 5:151–160
- Xuéréb A, Thiéry D (2006) Does natural larval parasitism of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) vary between years, generation, density of the host and vine cultivar? *Bull Entomol Res* 96:105–110
- Yang S, Ruuhola T, Haviola S, Rantala MJ (2008) Effects of host-plant shift on immune and other key life-history traits of an eruptive Geometrid, *Epirrita autumnata* (Borkhausen). *Ecol Entomol* 33:510–516
- Zuk M, Stoehr AM (2002) Immune defense and host life history. *Am Nat* 160:S9–S22

